

68  
2Ej.

LIBRO DE REGISTRO  
EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**"COMPROBACION IN VIVO DEL ANTAGONISMO  
QUE PRESENTAN CEPAS DE ACTINOMICETOS A  
Phytophthora infestans"**



**EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
P R E S E N T A :  
**AVE MARIA PEREZ GARCIA**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

México, D. F.

1988



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## CONTENIDO

			Pág.
CAPITULO	I	Introducción	1
CAPITULO	II	Objetivos.	2
CAPITULO	III	Antecedentes de la enfermedad.	3
CAPITULO	IV	Generalidades	
	4.1	Características agronómicas del cultivo de la papa.	5
	4.1.1	Preparación del suelo.	5
	4.1.2	Preparación de la semilla	5
	4.1.3	Abonos y Fertilizantes.	6
	4.1.4	Métodos de siembra.	6
	4.1.5	Densidad de siembra.	6
	4.1.6	Rendimiento.	7
	4.1.7	Áreas de adaptación.	7
	4.1.8	Cosecha.	8
	4.1.9	Características agronómicas de la variedad de papa "alfa".	9
	4.2	Enfermedades más importantes del cultivo de la papa en México.	14
	4.3	Características generales de la enfermedad.	16
	4.4	Ciclo biológico de <u>Phytophthora</u> - <u>infestans</u>	18

4.5	Características generales del - patógeno.	23
4.6	Producción de esporangios y zoosporas.	25
4.7	Distribución e importancia económica.	28
4.8	Métodos de inoculación.	31
4.9	Control	33
4.10	Generalidades sobre los microorganismos antagonistas.	35

CAPITULO V.                    Materiales y Métodos.

5.1	Material Biológico.	37
5.2	Medios de cultivo utilizados para el aislamiento de <u>Phytophthora</u> - <u>infestans</u> .	38
5.3	Medio de cultivo sintético para - la obtención del principio activo.	40
5.4	Medios de cultivo para la conservación de esporas	41
5.5	Muestreo del material enfermo	44
5.6	Obtención de la suspensión de esporangios y zoosporas.	46
5.7	Método para el estudio de microor-	

	ganismos antagonistas.	47
CAPITULO VI.	Desarrollo Experimental	
6.1	Activación de las cepas y comprobación de pureza.	49
6.1.1	Selección de cepas con base en su efecto antagonico.	50
6.1.2	Determinación del efecto antagonico de las cepas seleccionadas de actinomicetos en presencia de suelo.	51
6.1.2.1	Muestreo del suelo.	51
6.1.2.2	Cuantificación y observación de bacterias, hongos y actinomicetos del suelo por el método de dilución en placa.	52
6.1.2.3	Inoculación de suelo estéril y no estéril.	54
6.1.2.4	Extracción de esporas del suelo.	56
6.2	Biosíntesis del principio activo.	58
6.2.1	Parámetros que rigen la fermentación.	58
6.2.2	Obtención del filtrado.	60
6.3	Aspersión de la suspensión de esporangios de <u>P. infestans</u> en hojas de papa.	62

6.3.1	Inoculación de hojas de papa con- <u>P. infestans</u> .	63
6.3.2	Inoculación de hojas de papa con- <u>P. infestans</u> + el filtrado del -- cultivo del actinomiceto.	63
6.3.3	Hojas testigo.	64
6.4	Inoculación de plantas completas.	65
6.4.1	Inoculación con <u>P. infestans</u> .	65
6.4.2	Inoculación de <u>P. infestans</u> + fil- trado	66
6.4.3	Plantas testigo	66
6.4.4	Esquemas	67
CAPITULO VII.	Resultados	76
7.1	Tablas	80
7.2	Gráficas	92
7.3	Discusión de resultados	101
CAPITULO VIII.	Conclusiones y recomendaciones	106
CAPITULO IX.	Bibliografía	108

## INDICE DE ESQUEMAS

	Pág.
ESQUEMA 1 Plan de trabajo	67
ESQUEMA 2 Plan de trabajo	68
ESQUEMA 3. Muestreo del material enfermo	63
ESQUEMA 4. Obtención de suspensión de esporangios y zoosporas de <u>Phytophthora infestans.</u>	70
ESQUEMA 5. Determinación de actividad antagónica (Método del disco de papel).	71
ESQUEMA 6. Selección de cepas con base en su efecto Antagónico.	72
ESQUEMA 7. Inoculación de suelo estéril y no estéril	73
ESQUEMA 8. Extracción de esporas del suelo.	74
ESQUEMA 9. Obtención del filtrado del cultivo de - - actinomicetos.	75

## INDICE DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1. Resultados de la comprobación de pureza - de las cepas de actinomicetos.	80
TABLA 2. Resultados del efecto antagónico de diferentes bacterias a <u>P. infestans</u> .	81
TABLA 3. Resultados de la determinación de flora - nativa.	82
TABLA 4. Número de esporangios de <u>P. infestans</u> por gramo de suelo estéril en presencia del-- actinomiceto.	83
TABLA 5. Número de esporas por gramo de suelo <u>esté</u> ril e inoculado con actinomicetos.	84
TABLA 6. Resultados de la determinación del pH en cultivos de fermentación.	85
TABLA 7. Resultados de la determinación del peso - del micelio en mg. $\bar{x}$ .	86
TABLA 8. Determinación del crecimiento (Unidades - Klett).	87
TABLA 9. Diámetro del halo de las zonas de inhibi-- ción del filtrado de las cepas de actinomi cetos ( mm.).	88
TABLA 10. Resultado de la interacción Planta- <u>P. in-- festans</u> - filtrado, en presencia de suelo. (observación de 25 plantas por tratamiento)	89

TABLA 11. Características de las hojas y tamaño de las lesiones producidas por <u>P. infestans</u> sin y con adición del filtrado de actinomicetos.	90
TABLA 12. Resultados del número de esporangios de <u>P. infestans</u> por lesión en hojas inoculadas con el hongo.	91

## INDICE DE GRAFICAS

	Pág.
GRAFICA 1. Número de esporangios de <u>P. infestans</u> por gramo de suelo estéril en presencia de los actinomicetos a diferentes tiempos.	92
GRAFICA 2. Número de esporas de Actinomicetos - por gramo de suelo estéril.	93
GRAFICA 3. Determinación del pH del cultivo en fermentación de los actinomicetos a diferentes tiempos.	94
GRAFICA 4. Peso micelial de los actinomicetos en el cultivo en fermentación a diferentes tiempos.	95
GRAFICA 5. Curva de crecimiento de los actinomicetos a diferentes tiempos de incubación.	96
GRAFICA 6. Diámetro del Halo de las zonas de inhibición del filtrado de la cepa $M_3^8$ a diferentes tiempos de incubación.	97
GRAFICA 7. Diámetro del halo de las zonas de inhibición del filtrado de la cepa $M_3^{10}$ a diferentes tiempos de incubación.	98
GRAFICA 8. Diámetro del halo de las zonas de inhibición del filtrado de la cepa $IM_2^8$ a diferentes tiempos de incubación	99
GRAFICA 9. Número de esporangios promedio por lesión en hojas de papa.	100

## CAPITULO I

### INTRODUCCION

Ante el uso de los pesticidas concebidos en su origen como la panacea de la agricultura y a pesar de aplicarse cada año mayor volumen de tales sustancias químicas en los campos mexicanos, no sólo ha aumentado el número de plagas que destruyen los cultivos sino que además la producción de alimentos sigue siendo insuficiente para abastecer a la población. Hoy en día, se sabe que los fungicidas afectan tanto a los recursos naturales como al hombre. En México se aplican sin control alguno, casi todos los plaguicidas prohibidos, incluso en los países donde fueron desarrollados. Ante tal situación, se han desarrollado métodos alternativos de investigación basados en el control biológico; sin embargo, hasta el momento se han empleado muy pocos recursos tendientes a buscar soluciones acordes con la naturaleza. (Maldonado, 1957).

Por lo anterior, en el Laboratorio de Microbiología Experimental, se efectuó un estudio "in vivo", sobre la determinación del efecto antagónico de cepas de actinomicetos sobre Phytophthora infestans, hongo fitopatógeno de plantas de papa.

## **CAPITULO II**

### **OBJETIVOS**

**Objetivo General :**

Comprobación del antagonismo "in vivo" de -  
cepas antagónicas a Phytophthora infestans.

**Objetivo particular :**

Comprobación del antagonismo a Phytophthora  
infestans de cepas de actinomicetos aisla--  
dos.

Selección de las mejores cepas antagónicas-  
a P. infestans por su efectividad.

## CAPITULO III

### ANTECEDENTES DE LA ENFERMEDAD

La papa, junto con el maíz, son las plantas de mayor interés alimentario que el Continente Americano ha dado a conocer al Antiguo Mundo. El origen de la papa se remota a algunas zonas del Perú, Bolivia y México, donde se cree que fue cultivada en tiempos de la civilización Azteca e Incaica. Fue introducida en Europa en la segunda mitad del siglo XVI. En los primeros años, se le consideró como una planta ornamental, motivo que retardo su difusión; sin embargo, transcurridos algunos decenios, se tuvo conocimiento de su alto valor nutritivo y muy pronto se intuyó que la papa sería un gran elemento para la alimentación del hombre. (60 y 62)

El cultivo de la papa es afectado por factores que merman los rendimientos en su producción tales como: enfermedades, sequías, heladas, granizo y vientos fuertes. Una de las enfermedades que más daños ha causado a este cultivo es el tizón tardío causado por el hongo Phytophthora infestans. El tizón tardío se conoce desde 1830, apareciendo simultaneamente en América y Europa. Anton DeBary (1831-1888), fué quien primero estudió la patogenicidad, ciclo biológico y esporangios del hongo, sus estudios fueron consecuencia de la epifitía de 1845 que arrasó los cultivos de papa en Irlanda causando la muerte por hambre a cerca de un millón de personas y la emi--

gración de millón y medio en regiones donde la papa era la --  
fuente principal de la alimentación. (9 y 67)

En la actualidad, los medios para controlar al patógeno son inadecuados, debido a su incoesteabilidad y toxicidad -- tanto para la planta como para el hombre. Consecuentemente, -- se han estudiado ciertas clases de actinomicetos en los que -- se ha visto, presentan antagonismo a Phytophthora infestans; -- sin embargo, se desconoce cual de ellos presenta mayor efecti -- vidad, así como también su influencia sobre el desarrollo de -- la planta. Por tal motivo, es necesario encontrar la metodo -- logía adecuada para el control de dicho hongo, la que a su -- vez debe ser inócua para la planta y para el hombre.

## CAPITULO IV

### GENERALIDADES

#### 4.1 Características Agronómicas del Cultivo de la Papa.

##### 4.1.1 Preparación del suelo.

El modo de preparación del suelo, depende del tipo de suelo y de las condiciones de humedad; por ejemplo, para suelos arcillosos, se ara durante el otoño, en condiciones secas y a una profundidad de 25 cm. y en primavera, se pasa una rastra. Para suelos arenosos, el arado y la rastra se pueden realizar antes de la siembra para evitar la compactación del suelo.

##### 4.1.2 Preparación de la semilla.

Se considera que en el período de latencia, las yemas de los tubérculos no inician su crecimiento, aún estando en condiciones favorables para su desarrollo. La duración de este período depende de varios factores tales como; variedad, madurez fisiológica, condiciones ambientales durante su crecimiento, condiciones de almacenamiento, etcétera. En el prebrotamiento, los tubérculos poseen un brote más o menos bien desarrollado, poco antes del período de siembra.

#### 4.1.3 Abonos y Fertilizantes.

La cantidad de abono o fertilizante que se aplica, es -  
ta en función del período de siembra. Este cultivo, -  
tiene fuerte respuesta a la adición de nitrógeno y fós -  
foro, no así a la de potasio.

#### 4.1.4 Métodos de Siembra.

La siembra se hace a mano, depositando el tubérculo en  
el fondo del surco, con una distancia promedio de 30 a  
50 cms. entre ellos y de 90 cm. entre surco y surco, -  
procurando que los tubérculos no queden en contacto -  
con el fertilizante. También se puede hacer uso de la  
máquina sembradora de papas, procurando que esta sea -  
de copas y no de clavos, con el propósito de no trans -  
mitir enfermedades bacterianas al pinchar los tubércu -  
los enfermos y sanos.

#### 4.1.5 Densidad de Siembra.

La densidad de siembra es muy variable, se sugiere -  
utilizar de 1100 a 1500 kg. de semilla por hectárea, -  
además se recomienda sembrar tubérculos de 28 a 35 mm.  
de diámetro y entre 50 y 60 g. de peso. (3)

#### 4.1.6 Rendimiento.

Para la siembra de la papa, se usan los tubérculos como semilla para la producción de papa, siendo de vital importancia, que el productor utilice semillas certificadas que poseen garantía en cuanto a calidad, pureza de variedad, sanidad y vigor; además, aseguran un alto rendimiento (45). Las pérdidas en el rendimiento de la papa causado por el tizón tardío debido a tubérculos podridos, no se pueden estimar debido a que esto es afectado por el tipo de suelo, cantidad de lluvia, susceptibilidad del cultivo, y cantidad de tubérculos sembrados. (29)

#### 4.1.7 Areas de Adaptación.

Dependiendo del lugar geográfico en donde la papa se cultive, producirá una buena o deficiente cosecha, ya que cada variedad de cultivo posee características agronómicas diferentes. Para siembras de primavera-verano; en el Estado de México, Tlaxcala, Hidalgo y Distrito Federal, se usan las variedades: Alfa, Tollocan, Greta, Atzimba, Rosita, Murca, Juanita y Patrones; se siembra entre Marzo y Junio. Para siembras de otoño-invierno, en las regiones citadas se siembran las va--

riedades: Alfa, Tollocan, Greta, Atzímiba, Rosita, Murca, Patrones, Yema y López entre el 15 de diciembre y 15 de Marzo. (29)

#### 4.1.8 Cosecha.

Para obtener la cosecha máxima posible, la recolección se efectúa cuando las hojas toman un color amarillento y se vuelven quebradizas. Cuando se trata de obtener papa muy temprana, la recolección se practica cuando las matas están aún verdes, resultando el rendimiento menor y la calidad mejor. (16)

#### 4.1.9 Características Agronómicas de la Variedad de Papa Alfa.

El tubérculo de papa, es una extremidad hinchada de -- una raíz, en la cuál se almacena la fécula en gran cantidad y son estas las que se utilizan para la producción de la planta y que constituyen el procedimiento de multiplicación de la misma, para conservar las cualidades propias de sus ascendientes. En estado seco, en un tubérculo de papa, se encuentra un promedio de 66 % de almidón, que es el principal elemento desde el punto de vista calórico; 4 % de azúcares; 9 % de sustancias protéicas y 0.5 % de sales (potasio y fósforo) y grasas. Su valor vitamínico es muy bueno, debido a que contiene vitamina C, Tiamina, Riboflavina y Niacina. Algunas variedades ricas en agua, son cultivadas para obtener forrajes, otras por su rico contenido en almidón, se destinan a la extracción de fécula y preparación de alcohol. (16 y 45)

Actualmente en México, se cultivan catorce variedades de papa, las más importantes son cinco: Alpha, López, Amarilla de Puebla, White Rose y Criolla del Nevado. Estas variedades cubren un 95% de la superficie total-

cultivada.

Existe un gran número de especies de papa, pero en la producción se usan casi sólo las especies tuberosum y andigenum. La especie tuberosum; tiene plantas, hojas y tubérculos más grandes que la andigenum, por esta razón se cultiva más la especie tuberosum. (45)

Las variedades de la papa corriente se dividen de --- acuerdo con características fisiológicas, morfológicas y culinarias.

En México, la siembra se realiza en tres fechas diferentes y en varias zonas con distintas condiciones ecológicas. Las diferentes localidades, fechas de siembra y cosecha así como las principales características de las tres zonas se muestran en seguida. (11)

ZONA	FECHA DE SIEMBRA Y COSECHA	CARACTERISTICAS PRINCIPALES
I	León, Guanajuato Enero-Febrero Junio-Julio	Cultivo de invierno bajo riego.  Altura 1885 msnm.



Variedad de papa "Alfa"

(Solanum tuberosum L. subespecie tuberosum)

Origen: Holandesa.

Maduración: Intermedia (120 días).

Rendimiento: Muy bueno.

Tubérculos: Grandes, de forma oval redondeada, ojos bastante superficiales, carne amarillo claro y bastante harinosa.

Follaje: De desarrollo lento, algo abierta al principio, - más tarde de tallos fuertes y robustos que cubren bien los surcos, resisten a la sequía.

Materia

seca: Contenido bastante alto.

Planta: Tallos poco numerosos, robustos, de color morado-pálido extendiéndose poco, hojas grandes, rígidas, verde grisáceo, folíolos primarios ovales, con peciolo largos y nervios profundos, floración abundante, inflorescencias grandes, flores de color rojo morado claro con bordes blancos.

Brote: Aparrado, al principio esférico, más tarde periforme, de color morado marrón pálido, en la base verde;

muy poco peloso, yema terminal pequeña, predominantemente verde.

**Resistencia a:**

- Virus del enrollado: Medianamente sensible.  
Virus A: Poco sensible.  
Virus X: Poco sensible.  
Virus Y: Medianamente sensible.  
Phytophthora de la hoja: Medianamente sensible.  
Sarna Verrugosa: Infección crónica.  
Phytophthora del tubérculo: Poco sensible.  
Nemátodo dorado: Resistente.  
Seqüía: Poco sensible.

(16 y 65)

#### 4.2 Enfermedades más importantes del cultivo de la papa en México.

Las enfermedades más importantes del cultivo de la papa en México, son las causadas por los hongos:

Phytophthora infestans ("Tizón Tardío") y Rhizoctonia solani. Las causadas por bacterias como: Erwinia carotovora ("Podredumbre blanda"), Pseudomonas solanacearum que causa la "Marchitez Bacteriana".

Las enfermedades virosas como el enrollamiento de la hoja (PCRV) transmitida por áfidos, principalmente - Myzus persicae, mosaicos común y rugoso (PVY, PVX y PVA) y la punta morada (PVS) que se presenta en casi todas las zonas productoras de papa.

De las enfermedades causadas por nemátodos, la más importante es la originada por el "Nemátodo Dorado" Heterodera rostochiensis, el cuál está presente en algunos municipios del estado de Guanajuato.

Entre las principales plagas que dañan al cultivo de la papa están: Rayador o pulga saltona (Epitrix cucumeris Harris), Gallina ciega (Phyllophaga sp.), Palomi--

IIa (Pthorimen operculella Zeller) y Pulgón (Myzuspersi  
cae sulzer). (16,45,56 y 62)

#### 4.3 Características Generales de la Enfermedad.

El tizón tardío de la papa, Phytophthora infestans cuya distribución puede considerarse universal, es la especie fungosa que causa los mayores perjuicios a la papa (Solanum tuberosum L.), al tomate común (Lycopersicon esculentum Mill.), al tomate verde (Physalis sp.)- y a la berenjena (Solanum melongena). (14,20,58 y 68)

Esta enfermedad aparece generalmente después de la floración de la papa, presentandose en las hojas, peciolos, tallos y tubérculos. En las hojas de la papa infectada, inicialmente se observan manchas irregulares de color verde más claro rodeadas por un halo de color verde oscuro, las que con el tiempo presentan un fino algodoncillo grisáceo en sus bordes. (58). En los tubérculos, la epidérmis se torna café morada, se observan también áreas hundidas con manchas claras o ligeramente oscuras. Cuando se presenta contaminación por otros hongos o bacterias saprofitas, se desarrolla un olor desagradable debido a pudriciones acuosas de origen bacteriano, si la pudrición es seca, las lesiones no progresan.

En el campo, el grado en la severidad de la infección-

depende de las condiciones ambientales, ésta es más se  
vera cuando se presentan períodos frescos lluviosos y  
húmedos en las mañanas, seguidos de períodos más cálî-  
dos, estas condiciones promueven la formación y germi-  
nación de las zoosporas. (15, 25 y 58)

#### 4.4 Ciclo Biológico de Phytophthora infestans.

Los hongos fitopatógenos invaden los tejidos de sus hospederos por diferentes vías naturales, ya sea por lesiones o por penetración directa del tejido vivo. La invasión del tejido hospedero se atribuye a la atracción - del micelio del hongo hacia exudados químicos estimuladores de las raíces u hojas, a la atracción del hongo hacia un gradiente nutritivo o por simple oportunidad. - (5, 8 y 74)

Pristou (1954) y Stakman (1957), observaron que al inocular en el hospedero zoosporas móviles, la penetración ocurría directamente a través de la epidermis, pero rara vez a través de los estomas.

El hongo sobrevive en los tubérculos infectados y desechos en el campo como micelio, ocasionando las primeras infecciones a la planta. Algunas de las teorías que -- tratan de explicar el porque el hongo sobrevive de un -- año para otro son:

- Persistencia del micelio en el suelo.
- Permanencia del micelio en tubérculos enfermos.
- Producción de esporas de resistencia.

- Permanencia latente del micelio en la planta de papa.
- Activación del micelio durante la germinación de los tubérculos semilla, este micelio fructifica y se establece en la plántula, que al emerger transporta a las esporas a la superficie quedando latente en la superficie del tallo y hojas, en donde permanecen hasta el momento en que las condiciones favorecen el desarrollo de la infección. (3,9,15 y 58)

La lluvia y el viento, diseminan las esporas y consecuentemente la enfermedad puede invadir toda una plantación en pocos días si existen condiciones favorables para el patógeno. (15, 46 y 60)

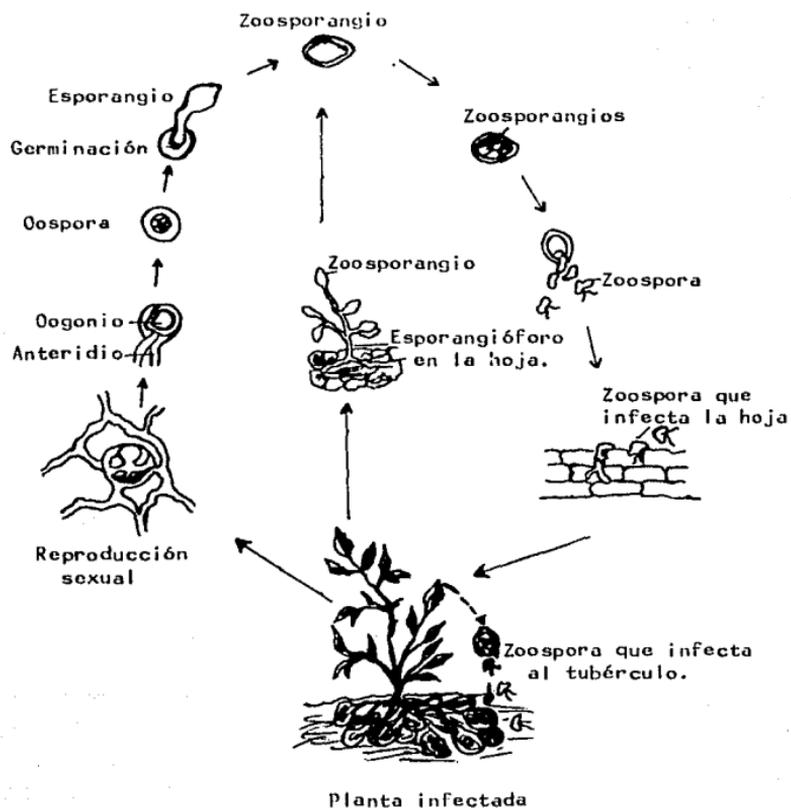
Boyd (1980), Easton (1982) y Hide (1981), comprobaron que las zoosporas de Phytophthora sp. en el suelo, infectan partes de las plantas sumergidas en el agua de riego sirviendo como propágulos infectivos en la naturaleza.

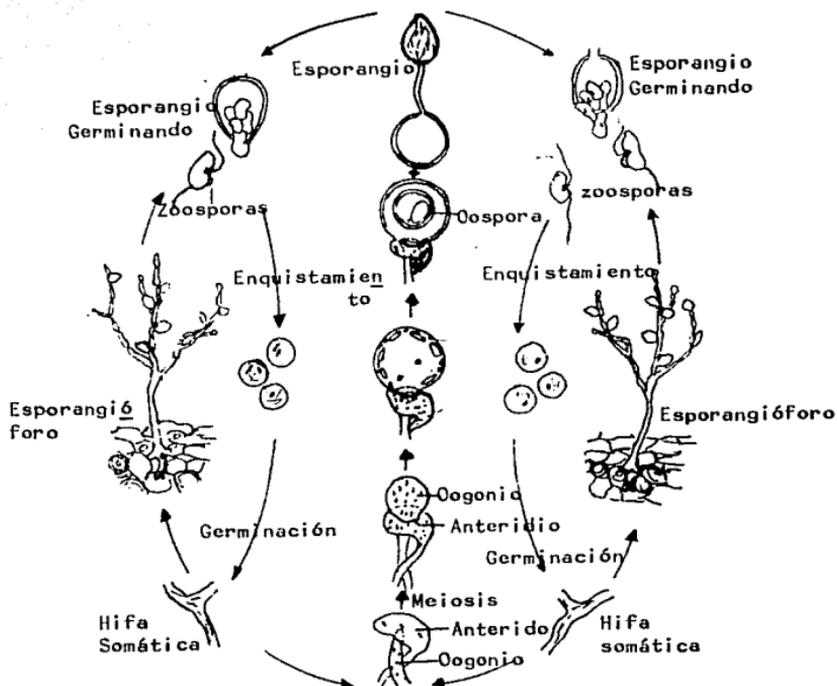
Respecto a la fase sexual de P. infestans, el primer informe fué publicado por Clinton en 1911. Clinton observó en cultivos puros, las oosporas, encontrando -

que la reproducción sexual se realiza por intermedio --  
del oogonio y el anteridio. La fase sexual es muy rara  
en el mundo, y sólo se ha encontrado en Toluca, México.

(58)

CICLO DE LA ENFERMEDAD DEL TIZON TARDIO DE LA PAPA CAUSADO -  
 POR Phytophthora infestans. (58)





CICLO BIOLÓGICO DE Phytophthora infestans  
(Alexopoulos) (52)

#### 4.5 Características Generales del Patógeno.

Como consecuencia de la epifitía ocasionada por el tizón tardío en Irlanda y en otros países europeos, se realizaron estudios para identificar al agente causal y métodos para su erradicación.

En 1845, Montagne identificó al patógeno asignándole el nombre de Botrytis infestans. Más tarde, Anton de Bary (1831-1888) descubrió su ciclo biológico, patogenicidad y esporangios comprobando que este hongo era efectivamente el patógeno, pero que su clasificación era incorrecta y como ninguno de los géneros hasta ese momento conocidos podía incluir con propiedad al hongo mencionado, en 1875 se propuso el género Phytophthora, desde entonces lleva por nombre Phytophthora infestans (Mont.) De Bary.

El hongo Phytophthora infestans, pertenece a la clase, - Phycomycetes; subclase Oomycetes; orden Peronosporales; familia Pythiaceae; género Phytophthora; especie infestans.

Se caracteriza por su micelio cenocítico inter e intracelular muy ramificado, hialino, blanco, algodonoso, -

los esporangióforos salen a través de los estomas en las hojas, y por las lenticelas en los tubérculos; llevando en cada esporangióforo un esporangio de forma alimonada cuyas dimensiones varían de 22 a 36 micras de largo por 14 a 23 micras de ancho con una papila apical mediana de 3 micras.

Los esporangios al principio son terminales, después laterales por el crecimiento indeterminado del esporangióforo, por eso la maduración no es uniforme. Cuando un esporangio esta cerca de la madurez, la hifa se hincha en su extremo basal y ésta es enviada hacia un lado de la prolongación del esporangióforo.

La hinchazón a intervalos, es característica de una hifa en fructificación, indicando los puntos donde la esporulación ha tenido lugar. Este tipo de rama fructífera es característico de Phytophthora infestans y sirve para distinguirlo de géneros y especies muy relacionados con él. (14,54 y 58)

#### 4.6 Producción de Esporangios y Zoosporas.

Varios investigadores, han estudiado los efectos de diversos factores sobre la formación de esporangios. Wilson considera como principales factores: Sustrato, humedad, aire, luz, temperatura y edad del cultivo (39 y 60)

En la región Norte Central de los Estados Unidos, James et al. en 1972, establecieron que la incidencia de enfermedad sobre el hospedero, es función de cuatro factores: Agente patógeno, hospedero, medio ambiente y tiempo.

Waggoner, en 1952; afirmó que la influencia del desarrollo del tizón tardío, depende de las fluctuaciones de temperatura y humedad.

Las condiciones favorables para la esporulación de P. infestans corresponden a: Humedad relativa por arriba del 90%, temperatura de 16 a 20°C por diez horas y una precipitación total de tres cm. o más durante tres días. (29 y 69)

Dependiendo de la temperatura, los esporangios de P. infestans, pueden germinar en forma directa a través de un tubo germinativo (12-22°C) e indirectamente, por libera-

ción de zoosporas biflageladas ( $12^{\circ}\text{C}$  o menos). (31, 46, 59 y 60)

Waggoner en 1952, observó que las cepas de P. infestans son capaces de sobrevivir a altas temperaturas. Rotem en 1974, para explicar el desarrollo del tizón tardío - bajo condiciones de temperatura diaria mayor de  $30^{\circ}\text{C}$ , - propuso dos hipótesis: 1) La aparición de cepas con temperatura óptima de desarrollo alta; 2) Habilidad de las cepas comunes para resistir o igualar los beneficios de las condiciones calientes secas.

Sarasola (1975), cita que Wallin y Hoyman en 1958 comprobaron que la luz o la obscuridad no alteran la formación de esporangios.

Mac Donald (1978), menciona a Balckwell y Waterhouse, - los que comprobaron que las zoosporas pueden ser expelidas del esporangio como una masa en una fina vesícula, la - cuál, finalmente estalla dejando libres a las zoosporas, aunque en algunas especies de Phytophthora, las zoosporas salen del esporangio separadamente.

Wallin en 1953, comprobó que las esporas sobreviven lar

gos períodos de tiempo en condiciones desfavorables, -  
ésto es; temperatura del aire de 24 a 32°C con humedad  
relativa de 40 a 50 %.

Dowley et al. en 1975, mantuvieron cultivos de P. infes-  
tans, a una temperatura de 10°C durante cinco horas pa-  
ra posteriormente observar la formación de zoosporas.

#### 4.7 Distribución e Importancia Económica

Los problemas en la producción de alimentos a que se enfrenta el sector agrícola del país son numerosos. La transferencia de recursos de este sector hacia otros componentes de la economía debilita la capacidad productiva agrícola, en particular la de alimentos estratégicos en la dieta nacional. Así mismo, provoca la incapacidad del medio rural para absorber la mano de obra que genera y la consiguiente migración del campo hacia la ciudad en busca de empleo. (51)

En México, uno de los problemas agrícolas más importantes en el cultivo de la papa, es sin duda alguna el -- causado por el hongo Phytophthora infestans, comúnmente conocido como "Tizón tardío de la papa".

Actualmente, la distribución de la enfermedad en los cultivos de papa es mundial, el daño causado por el hongo del tizón tardío es uno de los factores limitantes en la producción económica del cultivo; por lo -- cuál, en las áreas donde se cultiva esta solanácea, el control del hongo es indispensable para tener éxito.

La política del INIA sobre la papa, es la de proporcionar al agricultor variedades de papa resistentes al tizón para evitar los gastos de equipo, substancias químicas y pérdidas en la producción, ya que esto es una limitante para establecer ciertos cultivos en algunas áreas.

Las mejores zonas paperas de México, al aprovechar sus magníficas condiciones de suelo y temporal, se encuentran en constante peligro al ataque de esta enfermedad y con ello, expuestas a pérdidas cuantiosas. La mayor producción de papa en México, se obtiene en los valles altos (Tlaxcala, Toluca y Puebla), en donde las condiciones climatológicas son apropiadas para el buen desarrollo del cultivo y consecuentemente a la formación de tubérculos vigorosos; esto es, a temperatura de 15 a 18°C y una precipitación pluvial de 375 a 450 mm durante el periodo de cultivo.

También se cultiva papa en los estados de Baja California Norte, Guanajuato, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Sinaloa, Michoacán, Veracruz y Zacatecas.

En los estados de México, Tlaxcala, Hidalgo y el Dis--

trito Federal, durante el periodo de 1975- 1980, se --  
sembraron en promedio 5800 hectáreas con papa, se ob-  
tuvo una producción aproximada de 48000 toneladas y un  
rendimiento promedio de 8.23 toneladas por hectárea. -  
(10,11 y 16)

En Hermosillo Sonora, en abril de 1987 y en una super-  
ficie de 2000 Ha. se cosecharon aproximadamente 40000-  
toneladas con un rendimiento de 17 a 20 toneladas por-  
Ha. ("Excelsior", martes 21 de abril de 1987).

#### 4.8 Métodos de Inoculación.

Los medios por los que un microorganismo patógeno alcanza el interior de los tejidos de un vegetal, pueden ser artificiales o naturales.

Para inocular artificialmente patógenos que dañan al follaje, o a las partes aéreas de una planta, el microorganismo de interés, se propaga en un medio de cultivo que estimula la producción de esporas o de cualquier otro propágulo. (16)

Las inoculaciones artificiales, pueden hacerse a través de heridas efectuadas expofeso, o depositando el inóculo directamente sobre los tejidos del hospedante. (8, 20 y 54)

Dowley et al. en 1975, utilizaron atomizadores para inocular hojas sueltas y plantas completas con suspensiones esporangiales o miceliales. Montecillo en 1982, para inocular esporas móviles, utilizó técnicas tales como: Atomización, inundación, inmersión y la aplicación discreta de gotas de inóculo sobre la planta. En otros casos, se inyecta la suspensión en los peciolos-

o en los tallos, con una jeringa hipodérmica. Smoot et al. en 1958, inyectaron con aguja hipodérmica, una sus pensión de zoosporas y esporangios dentro de la cavi-- dad central del tallo.

#### 4.9 Control.

Para pronosticar cualquier enfermedad y sus métodos de control, es necesario conocer como y donde el hongo sobrevive al invierno, medio de diseminación, influencia del medio ambiente, viabilidad, germinación, influencia y subsecuente germinación de las esporas; así como la interacción de los cultivos con el tratamiento de fertilizantes, prácticas culturales, tratamientos de herbicidas, condiciones de intemperie, estado fisiológico en el momento de la cosecha, así como también la influencia del nivel de contaminación e infección progresiva o latente por los patógenos que causan enfermedades postcosecha y condiciones impropias de cosecha, transporte y almacenamiento favorecen el desarrollo de epidemias. (3, 8, 15 y 24)

En la naturaleza, las plantas sintetizan altas cantidades de componentes químicos con propiedades tóxicas. Se cree que esta función se realiza como un mecanismo de defensa contra agentes externos como bacterias, hongos e insectos. (51)

En EEUU., el cultivo de la papa blanca ha sido obstacu

lizado por el hongo del tizón tardío Phytophthora in--  
festans, aunque se han buscado cultivares con altos ni--  
veles de resistencia, la producción no ha crecido sig--  
nificativamente. (6)

Broadbent et al., en 1971 y Mitchell en 1961, han he--  
cho intentos para suprimir patógenos de plantas nati--  
vas del suelo por medio del control biológico. En ta--  
les intentos, se involucra la inoculación dentro del -  
suelo, de organismos que antagonizan a los patógenos -  
"in vitro". Así, modificando el hábitat, es posible -  
alterar la composición de la microflora, y tales alte--  
raciones microbiológicas, pueden destruir a los patóge--  
nos de plantas nativas del suelo.

#### 4.10 Generalidades Sobre Actinomicetos Antagonistas.

Los *Streptomyces* sp., en virtud de su amplia distribución, tolerancia térmica, crecimiento filamentoso activo en suelo y producción de antibióticos, participan activamente en el equilibrio microbiológico en suelos y son un factor en el control de la incidencia de ciertos patógenos nativos del suelo. (49)

Debido a que los actinomicetos comprenden un gran número de organismos que tienen la propiedad de inhibir el crecimiento de bacterias, hongos y aún especies de los mismos actinomicetos aprovechables terapéuticamente y por encontrarse ampliamente distribuidos en la naturaleza, se ha tratado de aislar algunas especies de -- ellos y de éstos, los correspondientes principios activos.

Se considera que el efecto inhibitorio, sobre el desarrollo de bacterias y de hongos, está íntimamente relacionado con la producción de agentes tóxicos, a los -- que se les conoce con el nombre de antibióticos.

Un antibiótico, se define como aquella substancia que

mica que es producida por síntesis o por un organismo, que actúa en muy bajas concentraciones en detrimento de las funciones vitales de otros microorganismos, pudiendo manifestarse por la inhibición o muerte del organismo contra el cual actúa.

Los antibióticos, son producidos por varios microorganismos particularmente bacterias, hongos y actinomicetos y la propiedad de formarlos no es característica de todos los géneros, ni es igual en todas las especies, sino particular de ciertos organismos.

En 1921, se probaron un gran número de actinomicetos por su acción antibacteriana, siendo Lieske el que estableció que el proceso antagónico en la naturaleza, se puede considerar como selectivo, es decir; que dicha acción varía de acuerdo con la especie de actinomiceto.

Aunque los antibióticos, solamente en un número pequeño de casos han sido aislados del medio, estas propiedades antibacterianas no sólo se presentan en los medios de cultivo artificiales, sino también en el suelo, estando además relacionadas con la mayor o menor cantidad de materia orgánica presente en él. (26,27,41,50 y 55)

## CAPITULO V

### MATERIALES Y METODOS

### 5.1 Material Biológico.

Las cepas de Phytophthora infestans usadas en esta investigación, fueron donadas por el Dr. Jorge Galindo - A., Investigador de la Oficina de Estudios Especiales - S.A.G., Chapingo.

Las cepas se transfirieron a diferentes medios de cultivo, con el fin de obtener abundantes estructuras vegetativas y reproductivas del hongo.

Los tubérculos de papa, variedad "Alfa", fueron proporcionados por el Ing. Manuel Villarreal, investigador -- del Centro de Orientación para el Desarrollo de la -- Agricultura y la Ganadería del Estado de México, CODA-GEA.

Las cepas de actinomicetos, ( $M_13$ ,  $M_3S$ ,  $M_310$  y  $IM_28$ ) -- aisladas por Arias y Patiño (52), fueron proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química, UNAM.

5.2 Medios de Cultivo Utilizados para el Aislamiento de --  
Phytophthora infestans.

No es fácil cultivar a Phytophthora sp. sobre medios químicos definidos, pero puede crecer axénicamente con buen éxito sobre medios de agar suplementados con sustratos tales como: Centeno, trigo, avena, chícharos y mijo. (59 y 64)

Dentro de los medios que se utilizan para cultivos de micelios de P. infestans se encuentran:

A. Jugo V-8 agar. (28,30,33,39 y 59)

Composición en g./l.

Jugo V-8	300.0 ml.
CaCO <sub>3</sub>	4.5 g.
Agar	20.0 g.
Agua destilada	1000.0 ml.

b. Papa Dextrosa Agar. (18 y 57)

Composición en g./l.

Papas	200.0 g.
Dextrosa	20.0 g.
Agar	15.0 g.
Agua destilada	1000.0 ml.

**C. Maíz molido Agar (1S)****Composición en g./l.**

Maíz molido	20.0 g.
Agar	20.0 g.
Agua destilado	1000.0 ml.

**Esterilizar los medios de cultivo en autoclave a 15 lb/pg<sup>2</sup> de presión a - 121°C, durante 30 minutos.**

5.3 Medio de cultivo sintético para la obtención del principio activo.

La selección de un sustrato idóneo para el cultivo de un microorganismo, es fundamental, ya que debe poseer una composición química adecuada, así como una estructura que permita buena aereación y una capacidad de retención de agua en beneficio del crecimiento del microorganismo. (23)

Se han utilizado medios con diferentes componentes químicos que han sido infructuosos debido a su alto costo o baja capacidad para inducir la producción de antibiótico. Uno de los medios que hasta la fecha ha tenido gran éxito es el de Lumb, cuya composición es la siguiente: (26)

MEDIO DE LUMB

Composición en g/l		Composición mg/l	
Glucosa	20.0	FeSO <sub>4</sub>	2.0
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	10.0	MgSO <sub>4</sub>	1.0
Citrato de sodio	10.0	CuSO <sub>4</sub>	1.0
Glicina	5.0	ZnSO <sub>4</sub>	1.0
NaCl	5.0	Molibdato	
CaCl <sub>2</sub>	5.0	de sodio	0.1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5		

#### 5.4 Medios de Cultivo para la Conservación de Esporas.

La desecación de los cultivos y el envejecimiento de los mismos, hacen necesario transferir el cultivo de un sustrato a otro a intervalos regulares, proceso que ofrece el riesgo de variación de la población microbiana original ocasionada por mutaciones y en ocasiones por contaminación, este problema ha sido eliminado mediante la utilización de métodos adecuados para mantener los cultivos de colección en buenas condiciones físicas y fisiológicas de los que se lleva un registro permanente. (36 y 49)

Entre los métodos de conservación más comunes están:

##### A. Liofilización o congelación seca.

Este método es usado ampliamente en Microbiología, el cual permite la preservación de microorganismos durante un tiempo prolongado, consistiendo en una desecación y congelación al vacío. (37)

##### B. Conservación en Aceite Mineral.

Mediante esta técnica, los aislamientos pueden durar períodos prolongados de hasta diez años sin experimentar cambios en sus propiedades biológicas. Es un método fácil, barato y no requiere de aparatos -

especiales, es de aplicación amplia para cepas de formas unicelulares, Phytophthora y géneros relacionados, pero es conveniente revisarlos periódicamente para comprobar su patogenicidad y pureza. (18).

C. Conservación en suelo estéril.

Los métodos de preservación en suelo estéril, han incrementado significativamente el período de vida de los cultivos, reduciendo los cambios morfológicos a un mínimo y no se requieren de aparatos especiales. (61)

D. Conservación en extracto de semillas.

Los aislamientos de P. infestans, usados como inóculo, han sido mantenidos en varios sustratos artificiales tales como: Agar-Frijol-Lima, Agar Papa Dextrosa, Agar Garbanzo (12), Agar Harina de Centeno - (18), y frecuentemente en tubérculos y hojas de papa. (7 y 66)

Un método para conservar y mantener a P. infestans en condiciones viables y patogénicas por más de 12-meses sin transferencias, es el extracto de granos de maíz. (20) Otro medio que se ha utilizado para -

el mantenimiento de P. infestans, es el extracto de semillas de centeno. (13, 14, 20 y 69)

Medio de Conservación de Extracto de Granos de Maíz.

Composición en g/l

Granos de maíz	15.0 g.
Agua destilada	25.0 ml.

Esterilizar en autoclave a 15 lb/pg a 121°C durante 40 minutos.

Un medio utilizado para propagar las cepas de actinomicetos es el Agar Extracto de Glucosa y Tripticaseína - (AEGT), (5<sup>2</sup>)

Agar Extracto de Glucosa y Tripticaseína

Composición en g/l

Peptona de caseína	5.0
Extracto de carne de res	3.0
Dextrosa	1.0
Agar	15.0
Agua destilada	1000.0 ml.
pH	7 ± 0.2

Esterilizar en autoclave a 15 lb/pg<sup>2</sup> a 121°C, durante 15 minutos.

### 5.5 Muestreo del Material enfermo. (Esquema No. 3)

En el muestreo, se recolecta follaje de plantas dañadas por el tizón tardío, con lesiones recientes no muy avanzadas en las que se observa un vello blanquecino. (31)

Se elige la parte de los tejidos de los que se realizará el aislamiento, escogiendo hojas con esporangios de lesiones libres de humedad. (46)

Se cortan las manchas necróticas de las hojas con tijeras esterilizadas, se colocan en cajas de Pétri con agua destilada estéril; luego, con pinzas estériles, se toman los pedacitos de hoja y se desinfectan en una solución de hipoclorito de sodio al 3-5% durante 15 minutos. En seguida, se enjuagan tres veces en agua destilada estéril.

El tejido desinfectado, se coloca en cámara húmeda (caja de Pétri estéril con agua destilada estéril), a temperatura de 18;20°C por 18 horas, para favorecer la es-

porulación. En seguida, se toman con pinzas estériles los pedacitos de hoja con esporangios y se colocan en cajas de Pétri que contienen el medio de cultivo Agar - Papa Dextrosa al 2%. A cada caja se le agrega 2 a 3 gotas de ácido láctico al 25% para obtener un pH de aproximadamente 4.5 a 5.0, rango en el que las bacterias de tienen su desarrollo. Las cajas se incuban a temperatura ambiente hasta observar desarrollo del micelio. (18)

5.6 Obtención de la suspensión de esporangios y zoosporas.  
(Esquema 4).

Utilizar un cultivo de Phytophthora infestans que presente abundante crecimiento micelial (7 a 14 días) en caja de Pétri.

Agregar 15 ml. de agua destilada estéril, homogenizar el inóculo con un agitador de vidrio esterilizado, se deja reposar durante 24 horas a temperatura ambiente (15 a 22°C), para obtener esporangios.

La suspensión esporangial obtenida, se coloca en el refrigerador a una temperatura de 10 a 12°C para favorecer la germinación de los esporangios y la liberación de las zoosporas en un tiempo de 90 minutos. (8,15 y 38)

## 5.7 Método para el Estudio de Microorganismos Antagonistas.

### Método del disco de papel (Esquema 5)

Para la prueba del disco de papel, se preparan cajas - de Pétri con el medio de cultivo, Agar Extracto de Glucosa y Tripticaseína en el que se siembra cada uno de - los microorganismos de prueba (Bacillus subtilis y Escherichia coli), en forma masiva con un hisopo estéril.

Discos de papel filtro Whatman No. 2 de 7 mm. de diámetro, se esterilizan a calor seco (180°C durante 30 minutos), se impregnan con la sustancia de prueba y se coloca uno de ellos sobre cada caja de Pétri sembrada.

Las cajas se mantienen en refrigeración durante 2 horas para permitir la difusión de la sustancia de prueba presente en los discos y evitar que el microorganismo - se desarrolle antes de la difusión de la sustancia.

En seguida, las placas se incuban a 37°C durante 18 horas. Se hacen las lecturas respectivas, que en caso de actividad, se referirán a los halos de inhibición cuyo diámetro dependerá de la actividad antibiótica.

En el caso de P. infestans, se usan cajas de Pétri con-

medio de agar Jugo V-8.

En el centro del agar, se coloca un disco de papel impregnado con el filtrado del actinomiceto correspondiente ( $M_3S$ ,  $M_310$ , o  $IM_2S$ ), en los bordes del agar se colocan trozos miceliales de un cultivo activo de P. infestans, las placas se refrigeran durante 2 horas (10 a -- 12°C); después, se mantienen a temperatura ambiente durante siete días, midiendo posteriormente los halos de inhibición en milímetros. (2, 27 y 49)

## **CAPITULO VI**

### **DESARROLLO EXPERIMENTAL**

### 6.1 Activación de las cepas y comprobación de pureza.

Las cepas de Actinomicetos empleadas en este estudio fueron: La  $M_13$ ,  $M_38$ ,  $M_310$  y la  $IM_28$ ; conservadas en suelo estéril.

Su propagación se hizo en Agar Extracto de Glucosa y -- Trypticaseína (AEGT), incubándose a 28°C durante siete días.

Para los microorganismos de prueba, B. subtilis y E. coli, se utilizaron cultivos jóvenes de 24 horas de desarrollo sembrándolos en caldo nutritivo e incubados a -- 28°C.

Phytophthora infestans, se resembró en agar jugo V-8, a partir del medio de conservación (Extracto de Granos de Maíz) e incubó a temperatura ambiente durante siete -- días. (ver página 52)

La pureza de tales organismos, se verificó mediante exá -- men microscópico y observación macroscópica en agar -- (morfología colonial).

## 6.1.1 Selección de cepas con base en su efecto antagonístico.

(Esquema 6)

Del margen del cultivo micelial de P. infestans en - - agar Jugo V-8 de siete días de desarrollo, se cortan bloques del agar con micelio de aproximadamente  $1\text{ cm}^2$ , éstos se colocan en cajas de Pétri conteniendo medio de cultivo Jugo V-8 agar (cuatro porciones por caja a distancias equidistantes), en la parte central de la - misma caja, se siembran esporas del actinomiceto en estudio o del microorganismo antagonista según el caso.- Se incuban las cajas a  $25^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas, en seguida se dejan a temperatura ambiente durante siete días.

Se seleccionan las cepas con mayor efecto antagonístico a Phytophthora infestans.

Phytophthora infestans -----

Microorganismo antagonista -----



Agar Jugo V-8

## 6.1.2 Determinación del efecto antagónico de las cepas seleccionadas de actinomicetos en presencia de suelo.

### 6.1.2.1 Muestreo del suelo.

En el suelo, los microorganismos desempeñan una función esencial, representando un medio natural dinámico tanto para la vida microbiana como vegetal. Sus características se deben primordialmente a la naturaleza y disposición de los diferentes componentes (agua, aire, partículas, materia orgánica, etcétera), así como su dinámica de interacción dentro del mismo sistema. (1)

El muestreo tiene como propósito fundamental, obtener la información que satisfaga una necesidad definida. En este caso, el suelo se muestreo de diversas partes de la parcela experimental, colectándolo a 15 cm. de profundidad del perfil. Todas las porciones se juntaron y mezclaron, se dejaron secar al aire por un día, y se tamizaron con cernidores de malla fina (2 mm.), se colocaron en bolsas de polietileno y se procesaron lo más pronto posible. (4 y 30)

6.1.2.3 Cuantificación y observación de Bacterias, Hongos y Actinomicetos del suelo por el método de dilución en placa.

Debido a que en el suelo tenemos un medio ambiente -- dinámico y competitivo, las poblaciones de microorganismos cambian de acuerdo al número de factores físicos, químicos y biológicos. (2)

El método de dilución y siembra en placa, es el más sencillo de los métodos para el estudio de poblaciones microbianas. Consiste en suspender un peso conocido de suelo en agua estéril, hacer una serie de diluciones con blancos de agua y sembrar las diluciones seleccionadas en agar. (2 y 71)

Mediante este método, se han aislado del suelo numerosos hongos, tales como: Pythium, Mortierella, Mixomicetes, y Basidiomycetes. (27 y 35)

La desventaja del método de dilución y siembra en placa, es que consume tiempo, es algo tedioso si se procesan muchas muestras, además se requiere de mucho material de vidrio estéril. (2, 21, 27 y 28). Para determinar la flora total del suelo, se emplea el método

de dilución y siembra en placa, utilizándose los medios de cultivo Agar Extracto de suelo, agar caseína - almidón y el medio de Martin en los que se cuantificaron bacterias, actinomicetos y hongos.

#### 6.1.2.4 Inoculación de suelo estéril y no estéril.

Tsao, en 1960 mencionó que las zoosporas de Phytophthora, son consideradas importantes en la diseminación e infección, los factores que influyen en la liberación de zoosporas de esporangios en suelo no están bien definidos.

En el laboratorio, la liberación de zoosporas es inducida sometiendo a los esporangios a sistemas acuosos y cambios rápidos de temperatura, sin embargo; en condiciones naturales, no es posible que en el suelo ocurran cambios de temperatura de la magnitud deseada.

Broadbent et al. en 1971, señalan que los actinomicetos son más inhibitorios a Phytophthora, además; que el porcentaje de efectividad antagonística entre los actinomicetos es más alto que entre los Bacillus.

Mitchell en 1961, observó que en suelo no estéril, la adición de bacterias micolíticas no altera el equilibrio microbiano y que en suelo estéril, el micelio de Fusarium oxisporum fué digerido al adicionar cepas de Bacillus liticus.

Inoculación de suelo con: (Esquema 7)

A. Phytophthora infestans.

Se prepararon frascos con 15 gramos de suelo tamizado, la mitad de ellos se esterilizaron en autoclave a 15 lb/pg<sup>2</sup> de presión a 121°C durante una hora. La otra mitad no se esterilizó. (19, 33 y 76)

Se hace una suspensión de esporas de P. infestans ( $3.6 \times 10^4$  esporangios/ml.) y se inoculan los frascos con suelo estéril y no estéril, añadiendo 2 ml. de inóculo en cada uno de ellos. Se mezclan durante 15 minutos e incuban a temperatura ambiente (18 a 22 °C), (72).

B. Phytophthora infestans + Actinomiceto.

En otros frascos, se inocula a P. infestans de la misma manera, y además se adiciona a cada frasco 2 ml de una - - suspensión de esporas del actinomiceto seleccionado conteniendo ( $2.5 \times 10^5$  esporas por ml).

C. A cada uno de los frascos testigo; tanto de suelo estéril - como de no estéril, se les agregan 4 ml. de agua destilada - estéril.

#### 6.1.2.5 Extracción de esporas del suelo. (Esquema 8)

Para analizar a los hongos del suelo, se usan técnicas que establecen la relación del hongo con el medio ambiente mediante la observación directa, montando simplemente o tiñiendo partículas de suelo y estudiando bajo el microscopio la presencia de micelio o fragmentos de hifas. (2). Para ello, se preparan suspensiones de suelo, se agita para remover las hifas de las partículas del suelo; se eliminan los residuos orgánicos y el material fino y se procede a la observación microscópica de la muestra en las que se buscan hifas individuales que son transferidas a un medio de cultivo sólido para favorecer su desarrollo. (71)

### Técnica para la extracción de esporas del suelo (51)

- Tomar cinco gramos de suelo
- Mezclarlo con 100 ml. de agua y 5 ml. de oxalato de sodio y 5 ml. de metasilicato de sodio durante 5 minutos.
- Dejar reposar la mezcla durante 15 minutos.
- Eliminar el agua por decantación, y al sedimento agregar - 50 ml. de agua y 5 ml. de las soluciones de oxalato y metasilicato al 3 y 5% respectivamente. Mezclar durante 5 minutos y dejar reposar 10 minutos.
- Utilizando un sifón, eliminar la mayor parte de la suspensión, dejando un volumen que no exceda de los 5 ml. Agitar la suspensión, hacer cuantificación de esporangios con la cámara de Neubauer.

## 6.2 Biosíntesis del Principio Activo.

### 6.2.1. Parámetros que rigen la fermentación.

En los procesos de fermentación, se realiza una serie de transformaciones microbianas en el sustrato; durante ésta, todos los materiales orgánicos, son utilizados para el crecimiento de los actinomicetos. (24)

La técnica de cultivo sumergido, se emplea en aquellos casos en que la producción de la substancia activa que hace en gran escala, en este caso, las colonias de actinomicetos toman el aspecto de laminillas.

Dentro de las condiciones físicas que afectan la fermentación están: Aereación, agitación, temperatura, pH, tamaño y edad del inóculo. (4,27, 41 y 49.

Con el incremento de la aereación, el valor del pH aumenta y el rompimiento de las proteínas es más rápido.

La temperatura óptima varía con la cepa, pero el-

valor fluctúa entre 24 y 31°C.

El pH óptimo es de 7 a 8, ya que hay evidencias que las reacciones de biosíntesis son óptimas en este valor.

El tamaño y edad del inóculo afectan la actividad de un compuesto. El uso de inóculo demasiado pequeño, hace que la prueba se prolongue antes de que ocurra un crecimiento detectable. El empleo de una gran cantidad de inóculo, provoca que la progenie de un muy pequeño número de células viables puedan causar turbiedad, haciendo difícil la interpretación.

Para seguir el curso de la fermentación, se optó por de terminar: La masa micelial, el pH y la velocidad de crecimiento.

La determinación del peso del micelio, se hizo gravimétricamente, pesando el micelio contenido en cada matríz cada 24 horas en un crisól Gooch tarado y pesado.

El pH se determinó cada 24 horas con un potenciómetro.

La velocidad de crecimiento se determinó turbidimétricamente cada 12 horas, tomando lecturas en el nefelómetro marca Klett.

### 6.2.2 Obtención del filtrado (Esquema 9)

Las cepas de actinomicetos seleccionadas y conservadas en suelo estéril, se resembraron en AEGT y se verificó su pureza, mediante exámen microscópico y observación de la morfología colonial.

La comprobación de la actividad antagónica se realizó - mediante la técnica de estría modificada de Garré, en la que se sembró al microorganismo de prueba en forma - masiva sobre el medio AEGT; en seguida, se inocularon - esporas del actinomiceto seleccionado en tres puntos - equidistantes entre sí.

Una vez que se comprobó la actividad antagónica, con ca da cepa se procedió a la fermentación para obtener el principio activo. Para ello se inocularon matraces con teniendo el medio de cultivo líquido de Lumb.

El inóculo del actinomiceto se prepara a partir de cul - tivos en medio inclinado en tubos a los que se les agre - ga 10 ml. de agua destilada estéril, se raspa el culti - vo con una asa de platino para obtener una suspensión - abundante de esporas. De esta suspensión, se tomaron 2 ml. para inocular matraces nefelométricos de 250 ml -

conteniendo 100 ml. de medio de cultivo de Lumb. Los matraces se incuban en agitadores rotatorios a 250 rpm. a 28°C durante 7 días. La densidad final de esporas fué de  $1.5$  a  $2.0 \times 10^3$  esporas/ ml de medio.

Para obtener el filtrado con el principio activo, se tomaron muestras de 10 ml. cada 24 horas de los cultivos de los matraces. Las muestras se centrifugaron a 2500 rpm. durante 10 mi nutos y se filtró al vacío con membrana de "millipore" de 0.22 micras, el diámetro del poro.

El filtrado obtenido, se envasó en condiciones de asépsia en - tubos de cultivo con tapón de rosca estériles. Para su posterior utilización en los ensayos in vitro e in vivo.

6.3 Aspersión de la suspensión de esporangios de Phytophthora infestans en hojas de papa.

Se sembraron tubérculos de la variedad de papa alfa, - de los que nacieron plantas con abundante follaje. Cuando las plantas tenían una edad aproximada de 40 días, y una altura de unos 20 cm. con 10 a 15 hojas aproximadamente, se seleccionaron algunas de ellas de la parte media de la planta y fueron desprendidas de la planta. - (7)

Las hojas se lavaron con agua destilada y se desinfectaron superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 5 minutos; en seguida, se lavaron tres veces con agua destilada estéril, se colocaron sobre mallas de plástico en cajas de Pétri estériles - con algodón húmedo. (13)

### 6.3.1 Inoculación de hojas de papa con P. infestans

El inóculo consistió en una suspensión de esporangios de un cultivo de P. infestans a una concentración de  $1 \times 10^4$  esporangios /ml. (6, y 38)

Se inocularon 0.05 ml. de la suspensión de esporangios a cada lado de la nervadura central del haz de las hojas. Después de la inoculación, se dejaron a temperatura ambiente de 18 a 20°C durante 36 horas; posteriormente, se trasladaron a un lugar fresco con temperatura que varió de 20 a 23°C, observándose periódicamente para detectar la aparición de las primeras lesiones visibles en las hojas. (7). Continuando con las lecturas hasta los 7 días.

### 6.3.2 Inoculación de hojas de papa con P. infestans + el -- filtrado del cultivo del Actinomiceto.

La inoculación de las hojas de papa con P. infestans - se realizó de la manera antes descrita. Después de dejarlas a temperatura ambiente (18 a 22°C) durante 36 - horas, se aplicó la misma cantidad de filtrado del actinomiceto seleccionado (0.05 ml) y se dejaron las hojas a temperatura ambiente durante 6 días.

### 6.3.3 Hojas testigo.

En cajas de Pétri, se colocaron hojas de papa como se mencionó en el punto 6.3; a cada hoja se le aplicaron 0.05 ml. de agua destilada estéril y se dejaron a temperatura ambiente durante 6 días.

#### 6.4 Inoculación de plantas completas.

##### 6.4.1 Inoculación con Phytophthora infestans

Plantas completas de papa que tenían entre 30 y 50 hojas y de 8 a 10 semanas de crecimiento, se inocularon con una suspensión de esporangios de un cultivo de P. infestans. (8,13 y 31)

La concentración de esta suspensión fué de  $1.4 \times 10^4$  - esporangios/ml de agua destilada; se aplicaron 25 ml. a cada planta con un rociador operado manualmente.

Las plantas se cubrieron con bolsas de polietileno durante 48 horas para después descubrir las, permaneciendo a temperatura ambiente.

Se evaluó el porciento de infección en el momento en que aparecieron los primeros síntomas de la enfermedad.

Se recolectaron hojas lesionadas para comprobar la presencia del patógeno.

#### 6.4.2 Inoculación con P. infestans + filtrado

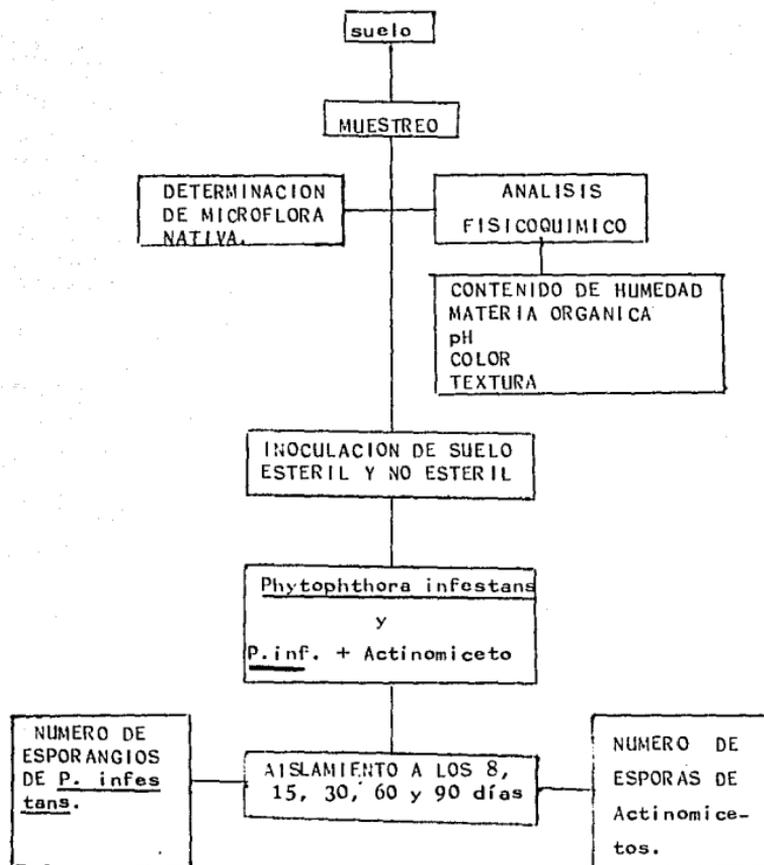
Las plantas se inocularon con P. infestans en la forma antes descrita. Después de retirar las bolsas de las plantas, éstas se rociaron con el filtrado del actinomiceto seleccionado (25 ml. de filtrado).

Los resultados se evaluaron a partir del tercer día.

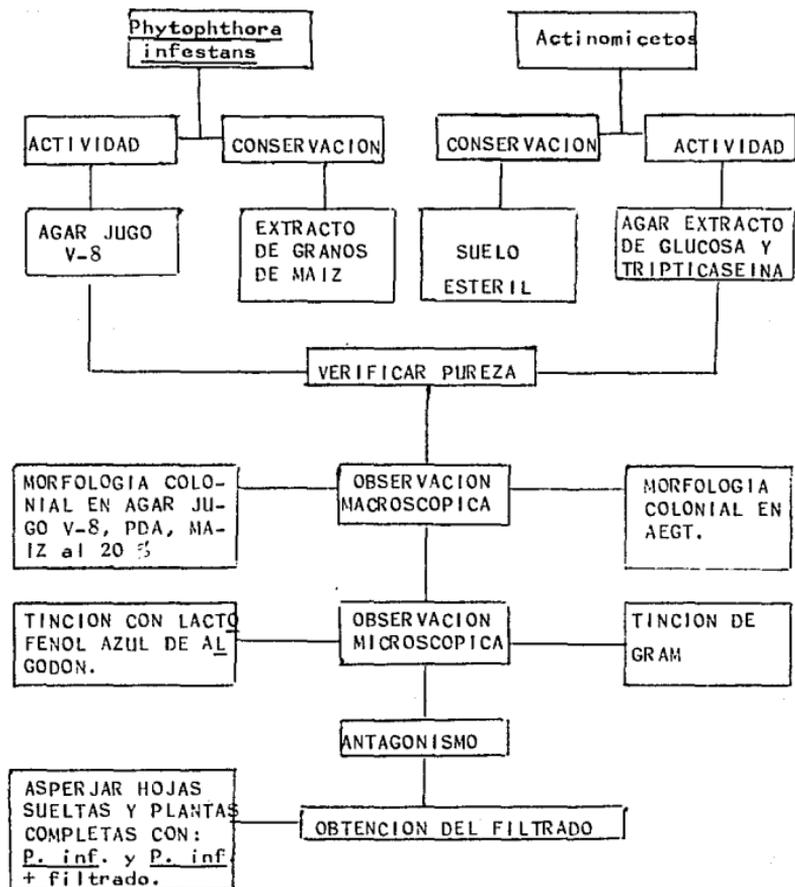
#### 6.4.3 Plantas testigo.

Las plantas testigo, se rociaron con agua destilada es téril, se cubrieron con las bolsas de polietileno por 48 horas, dejándose posteriormente sin las bolsas. Eva luándose los resultados a partir del tercer día.

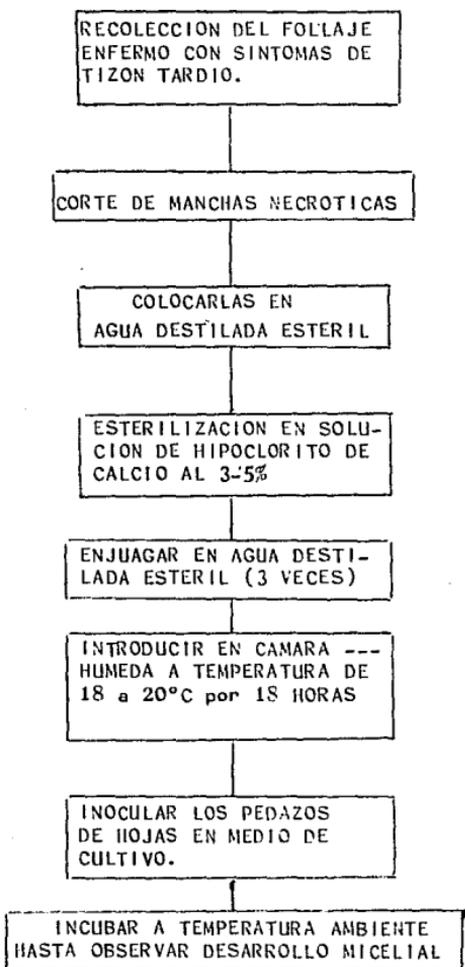
Esquema 1. PLAN DE TRABAJO



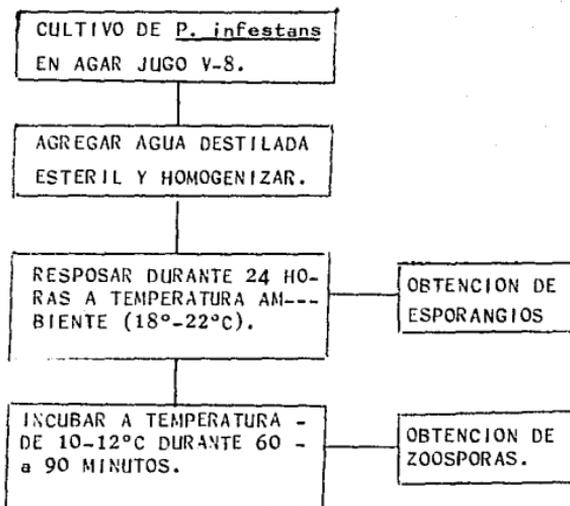
Esquema 2



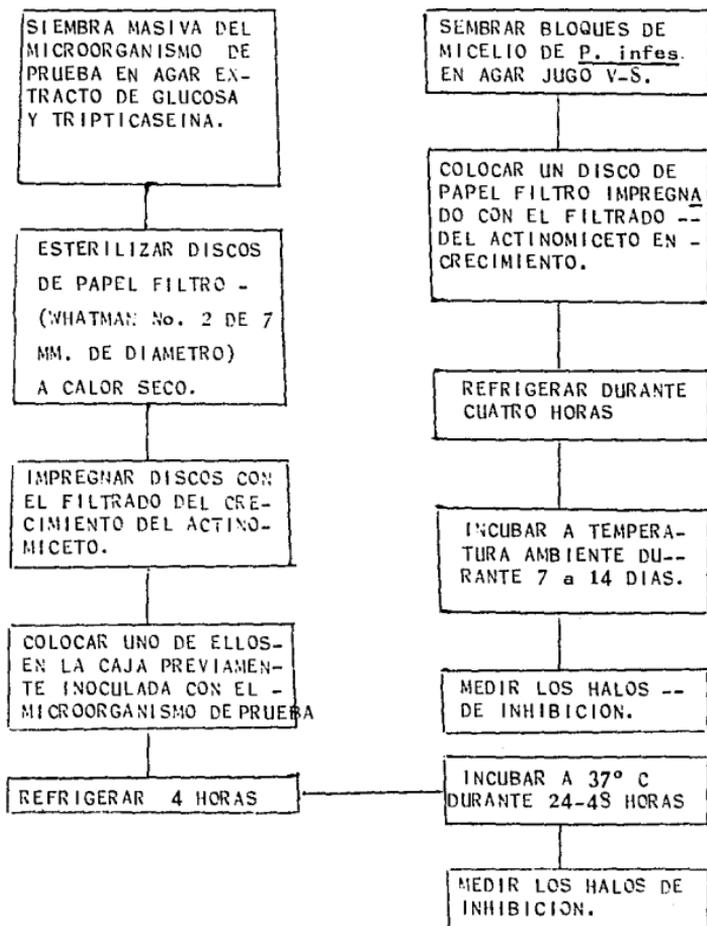
Esquema 3. MUESTREO DEL MATERIAL ENFERMO



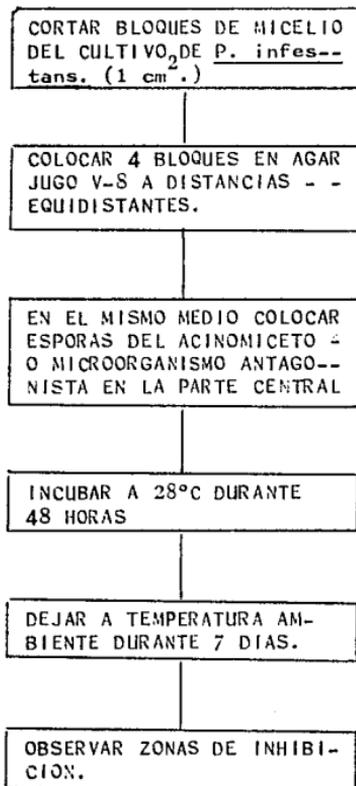
Esquema 4. OBTENCION DE SUSPENSION DE ESPORANGIOS  
Y ZOOSPORAS DE Phytophthora infestans.



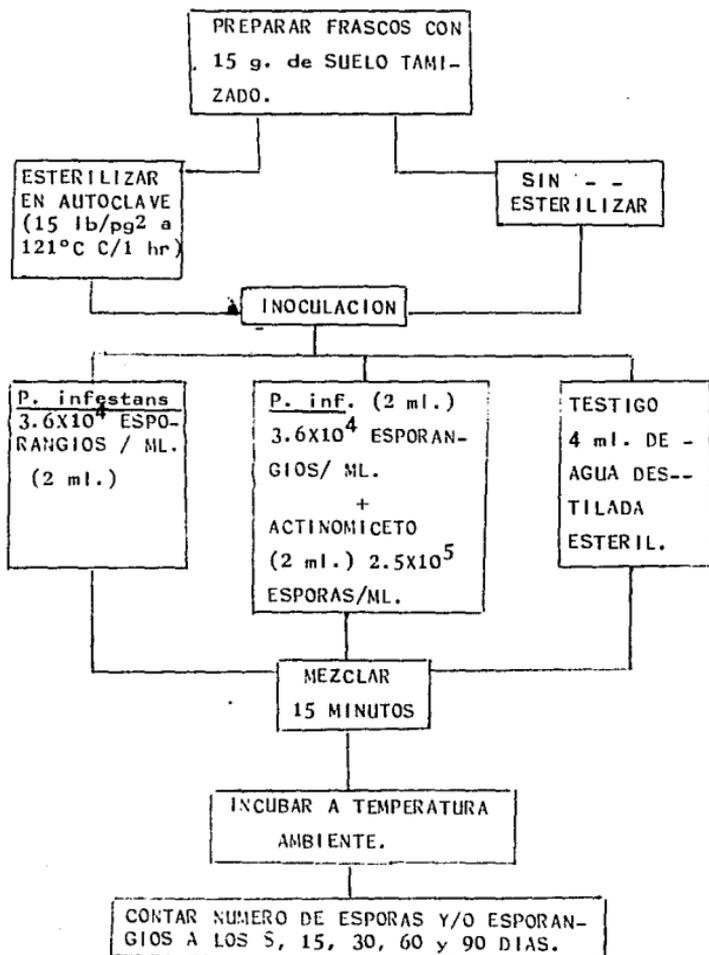
Esquema 5. DETERMINACION DE ACTIVIDAD ANTAGONICA (METODO DEL DISCO DE PAPEL).



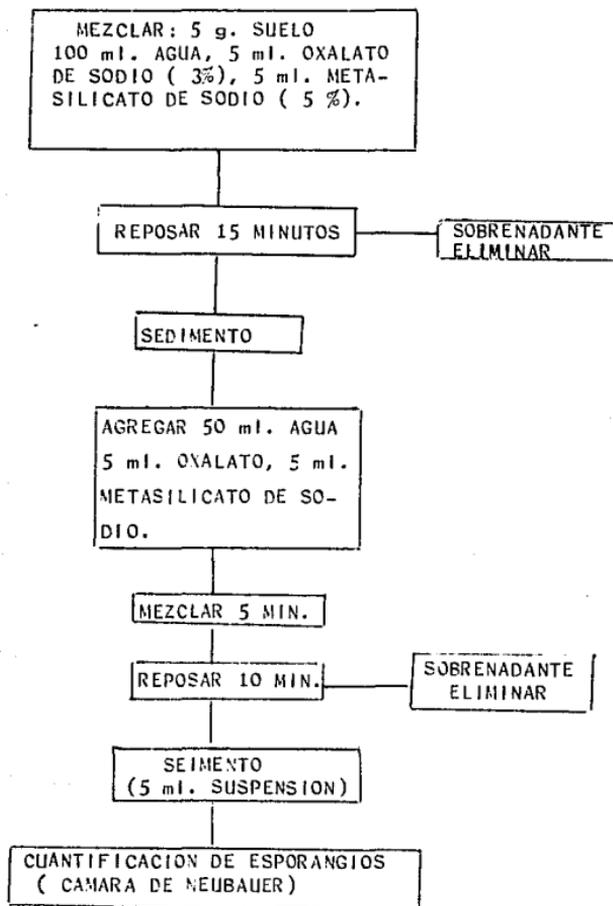
Esquema 6. SELECCION DE CEPAS CON BASE EN SU EFECTO ANTAGONICO.



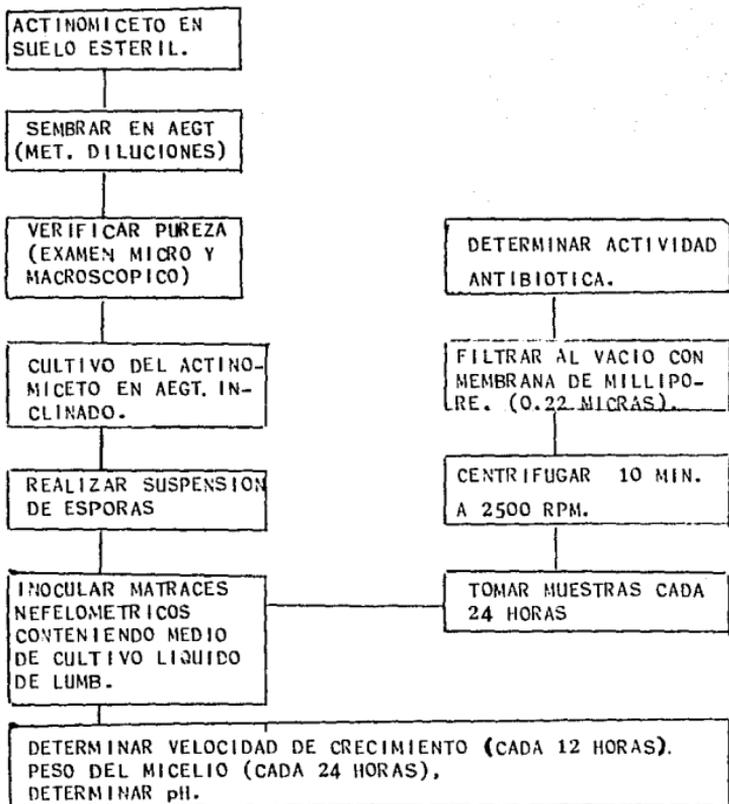
Esquema 7. INOCULACION DE SUELO ESTERIL Y NO ESTERIL



## Esquema S. EXTRACCION DE ESPORAS DEL SUELO



Esquema 9. OBTENCION DEL FILTRADO DEL CULTIVO DE ACTINOMICETOS.



## **CAPITULO VII**

### **RESULTADOS**

CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS DE P. infestans EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.

A. Agar Jugo V-8.

Desarrollo del esporangio abundante, algunas veces se observaron con tubo germinal, algunos vacíos y otros llenos de protoplasma, lo que indica un desarrollo a diferentes tiempos.

En cultivos viejos de 80 días, se observaron esporangios con aspecto seco, arrugados, contraídos, algunos llenos con protoplasma otros completamente vacíos con su membrana en ocasiones arrugada.

B. Papa Dextrosa Agar.

Desarrollo del esporangio escaso o raro y los que se observaron, estaban sin protoplasma.

C. Maíz molido al 20%.

En este medio, hubo formación de esporangios en número reducido, de forma más o menos esféricos u ovoides unipapilados.

CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS DE P. infestans EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.

A. Medio de conservación (Extracto de granos de maíz)

La adaptación del hongo a este medio, se observó aproximadamente a los trece días, a partir de su inoculación mantenido a temperatura ambiente, observando un crecimiento micelial algodonoso abundante y blanquecino.

B. Agar Jugo V-8.

En este medio, P. infestans crece rápidamente, observándose desarrollo tanto profundo como superficial, con hifas irregularmente ramificadas, de consistencia algodonosa muy húmeda. Entre los ocho y diez días, llena la superficie de la caja de Pétri.

C. Agar Papa Dextrosa.

Desarrollo superficial muy escaso, desarrollo lento, micelio delgado, húmedo, desarrollo micelial profundo y superficial; a los once días, se observa 3 cm. de diámetro de desarrollo micelial de 15 a 20 días, llena la superficie del medio en caja de Pétri.

**D. Maíz Molido al 20%.**

**Desarrollo micelial abundante, superficial, húmedo, algodonoso. A los doce días de crecimiento, llenó la superficie del medio de cultivo.**

## EFECTO ANTAGONICO EN PRESENCIA DE SUELO.

Para la determinación del efecto antagónico de las cepas seleccionadas ( $M_3^{10}$ ,  $M_3^8$  y  $IM_2^8$ ) en presencia de suelo, se realizaron algunas pruebas físicas y químicas del suelo encontrándose lo siguiente:

A. Contenido de humedad:	16.36%
B. Materia Orgánica:	1.82%
C. pH:	5.9
D. Color: Suelo seco	10YR 3/3 café oscuro.
Suelo húmedo	10YR 2/1 negro.
E. Textura: Arena	87.82%
Arcilla	2.80%
Limo	10.00%
Textura:	Arenosa.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Tabla 1. Resultados de la comprobación de pureza de las cepas de actinomicetos.

CLAVE DE LA CEPA	CARACTERISTICAS	
	MICROSCOPICAS	MACROSCOPICAS
M <sub>1</sub> 3	Micelio filamentoso micro-sifonado, esporas -- terminales, Grampositivo.	Colonias de color crema traslúcidas, abultadas, crecimiento escaso.
M <sub>3</sub> 8	Micelio curvado, micro-sifonado con artrosporas. Gram positivo.	Colonias blancas, secas abultadas, compactas, - producen pigmento amarillo claro.
M <sub>3</sub> 10	Micelio lineal micro-sifonado con artrosporas, Gram positivo.	Colonias color crema, - apelmazadas, contorno - globoso.
IM <sub>2</sub> 8	Micelio lineal, micro-sifonado curvado, con artrosporas, Gram positivo.	Colonias color blanco - verdoso, opacas, abultadas, crecimiento abundante, produce pigmento verde seco.

TABLA 2. Resultados del efecto antagónico de diferentes bacterias a P. infestans.

MICROORGANISMO	DIAMETRO DEL HALO DE LA ZONA DE INHIBICION (MM.)
Actinomiceto clave M <sub>1</sub> 3	2.16
Actinomiceto clave M <sub>3</sub> S	14.52
Actinomiceto Clave M <sub>3</sub> 10	6.71
Actinomiceto clave IM <sub>2</sub> S.	19.84
<u>Bacillus</u> <u>Subtilis.</u>	4.35
<u>Escherichia</u> <u>coli.</u>	0.50

TABLA 3. Resultados de la determinación de  
flora nativa.

GRUPO MICROBIANO	NUMERO DE MICROORGANISMOS POR GRAMO DE SUELO.
Bacterias	$3.5 \times 10^7$
Actinomicetos	$1.05 \times 10^5$
Hongos	$4.19 \times 10^4$

TABLA 4. Número de esporangios de P. infestans por gramo de suelo estéril en presencia del actinomiceto- (Gráfica 1).

ORGANISMO	TIEMPO DE INCUBACION (DIAS)					
	0	5	15	30	60	90
<u>P. infestans</u>	$3.6 \times 10^4$	$9.8 \times 10^3$	$6.3 \times 10^3$	$3.9 \times 10^3$	$3.3 \times 10^3$	$1.4 \times 10^3$
<u>P. inf.</u> + M <sub>3</sub> S	$3.6 \times 10^4$	$4.2 \times 10^3$	$1.4 \times 10^3$	$7.1 \times 10^2$	$3.6 \times 10^2$	$3.2 \times 10^2$
<u>P. inf.</u> + M <sub>3</sub> T	$3.6 \times 10^4$	$6.4 \times 10^3$	$2.5 \times 10^3$	$1.4 \times 10^3$	$9.4 \times 10^2$	$7.6 \times 10^2$
<u>P. inf.</u> + M <sub>2</sub> S	$3.6 \times 10^4$	$1.8 \times 10^3$	$7.4 \times 10^2$	$1.9 \times 10^2$	$5.1 \times 10^1$	$3.3 \times 10^1$

INOCULACION DE SUELO NO ESTERIL CON:

- A. Phthophthora infestans
- B. Phthophthora infestans + Actinomiceto seleccionado

En suelo no estéril, tanto P. infestans como los actinomicetos en estudio, no pudieron ser recuperados debido a -- que la flora nativa del suelo natural fué muy abundante, observandose crecimiento de colonias bacterianas, de hongos y -- de actinomicetos.

**TABLA 5. Número de esporas por gramo de suelo estéril e inoculado con actinomicetos (Gráfica 2).**

ACTINOMICETO	TIEMPO DE INCUBACION (DIAS)					
	0	8	15	30	60	90
Cepa M <sub>3</sub> <sup>8</sup>	$2 \times 10^5$	$1.7 \times 10^5$	$1.6 \times 10^5$	$1.0 \times 10^5$	$1.3 \times 10^5$	$1.9 \times 10^5$
Cepa M <sub>3</sub> <sup>10</sup>	$2 \times 10^5$	$5.1 \times 10^4$	$3.2 \times 10^4$	$1.0 \times 10^4$	$3.2 \times 10^3$	$3.0 \times 10^3$
Cepa IM <sub>2</sub> <sup>8</sup>	$2 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$	$7.0 \times 10^4$	$4.5 \times 10^4$	$2.6 \times 10^4$	$3.1 \times 10^4$

TABLA 6. Resultados de la determinación del pH en los cultivos de -  
 fermentación ( Gráfico 3)

CEPA	TIEMPO DE INCUBACION (DIAS)								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
$M_3^8$	7.35	7.34	7.48	7.19	7.80	7.97	8.10	8.45	8.19
$IM_2^8$	7.35	7.43	7.64	7.75	7.93	8.22	8.30	8.35	8.49
$M_3^{10}$	7.35	7.30	7.39	7.54	7.64	7.70	7.87	8.05	8.11

TABLA 7. Resultados de la determinación del peso del micelio en mg % -  
 (Gráfica 4)

CEPA	TIEMPO DE INCUBACION (DIAS)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
M <sub>3</sub> <sup>8</sup>	87	890	1050	1056	1064	1031	963	920
IM <sub>2</sub> <sup>8</sup>	92	750	900	943	945	912	881	783
M <sub>3</sub> <sup>10</sup>	51	543	726	775	764	690	602	587

TARLA 8. Determinación del crecimiento (Unidades Klett) (Gráfica 5).

CEPA	TIEMPO DE INCUBACION (HORAS)											
	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	156
M <sub>3</sub> <sup>8</sup>	25	22	31	56	79	85	92	100	109	113	107	100
M <sub>3</sub> <sup>10</sup>	11	18	17	24	65	69	83	92	98	86	85	80
IM <sub>2</sub> <sup>S</sup>	20	39	61	84	96	108	123	125	131	123	119	110

TABLE 9. Diámetro del halo de las zonas de inhibición del filtrado de las cepas de actinomicetos (milímetros). - (Gráficas 6, 7 y 8).

CEPA M <sub>3</sub> <sup>S</sup>	TIEMPO DE INCUBACION (DIAS)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<u>P. infestans</u>	-	4.2	9.8	14.3	15.1	14.8	8.3	3.2
<u>B. subtilis</u>	-	3.5	4.0	8.3	8.8	7.2	5.1	2.1
<u>E. coli.</u>	-	2.4	2.7	3.6	5.2	2.7	-	-
CEPA M <sub>3</sub> <sup>10</sup>								
<u>P. infestans</u>	-	3.9	6.3	8.1	9.7	4.4	1.2	-
<u>B. subtilis</u>	-	3.0	3.7	4.9	5.2	3.6	2.4	-
<u>E. coli.</u>	-	2.1	2.8	3.3	3.6	1.7	-	-
CEPA M <sub>2</sub> <sup>S</sup>								
<u>P. infestans</u>	-	6.7	8.8	15.8	16.1	15.5	10.1	4.9
<u>B. subtilis</u>	-	4.4	7.1	9.4	10.3	7.2	6.5	3.2
<u>E. coli</u>	-	2.0	2.8	3.1	2.9	1.4	-	-

TABLA 10. Resultado de la interacción planta- Phytophthora infestans - filtrado, en presencia de suelo. (Observación de 25 plantas por tratamiento)

TRATAMIENTO	CARACTERISTICAS		
	COLOR	HOJAS	TALLOS
Planta (testigo)	Verde	-	-
Planta + filtrado M <sub>2</sub> S	Verde	-	-
Planta + filtrado M <sub>3</sub> S	Verde	-	-
Planta + <u>P. infestans</u> + filtrado.	Amarillo Verdosa**	4	2
Planta + <u>P. infestans</u> .	** *	7	3

\* Después de la inoculación, las plantas se tornaron amarillentas y algunas desarrollaron síntomas de tizón, - los que desaparecieron quedando las hojas que habían sido afectadas de color amarillo; en tanto que el resto de la planta vuelve a verdear.

\*\* Tres días después de la inoculación, aparecieron los -- síntomas de la enfermedad.

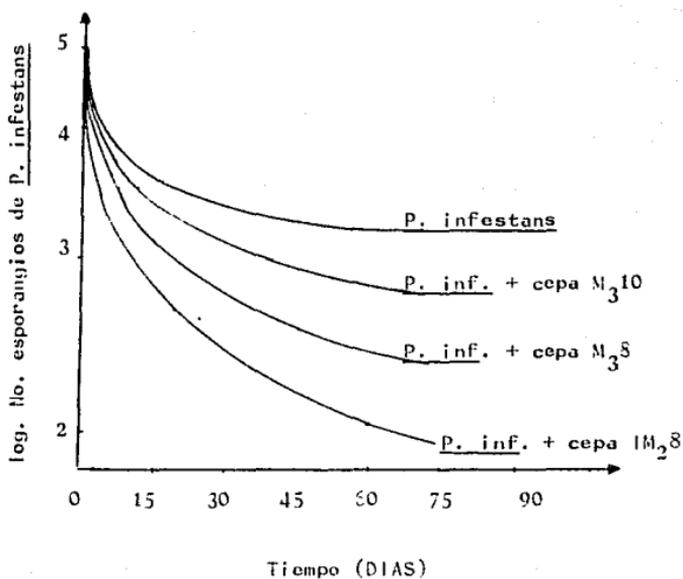
Tabla II. Características de las hojas y tamaño de las lesiones producidas por P. infestans sin y con adición del Filtrado de actinomicetos.

TRATAMIENTO	TIEMPO DE INOCULACION (DIAS)				
	2	3	4	5	6
Testigo	Sin lesiones y con color verde				
Filtrado IM <sub>2</sub> <sup>8</sup>	Verde	Verde Limón	Amarilla	Amarilla	Grasa Amarilla
<u>P. infestans.</u>	2.7X2.2	3.1X2.3	3.5X2.8	3.9X2.9	5.3X4.1
<u>P. inf.</u> + IM <sub>2</sub> <sup>8</sup>	1.1X1.0	1.6X1.5	2.1X1.6	2.2X1.9	2.2X2.0
<u>P. inf.</u> + M <sub>3</sub> <sup>8</sup>	1.5X1.0	1.8X1.8	2.7X3.0	3.0X3.4	3.5X2.3

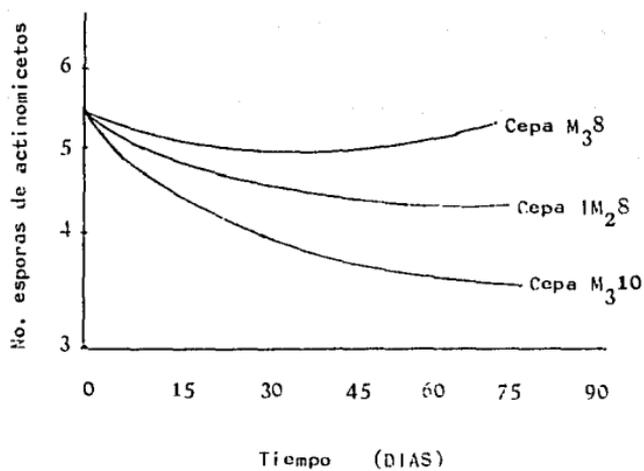
TABLA 12. Resultados del número de esporangios de P.infestans por lesión en hojas inoculadas con el hongo.

NUMERO DE ESPORANGIOS POR LESION	TIEMPO DE INCURACION ( HORAS )						
	24	72	96	120	148	172	196
-	7300	7800	25400	40200	63500	55600	

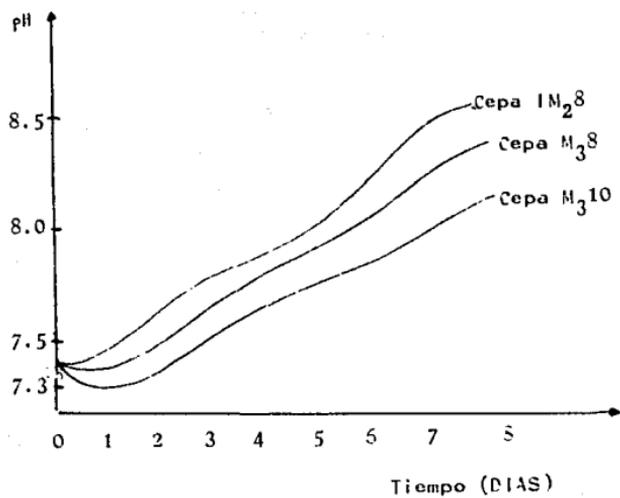
GRAFICA 1. Número de esporangios de P. infestans por gramo de suelo estéril en presencia de los actinomicetos a diferentes tiempos.



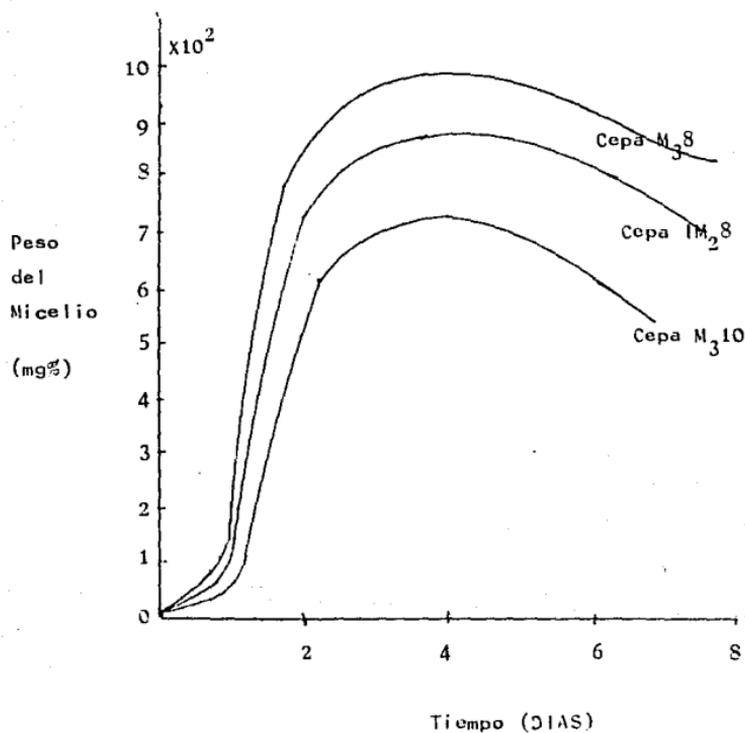
GRAFICA 2. Número de esporas de actinomicetos por gramo de suelo estéril.



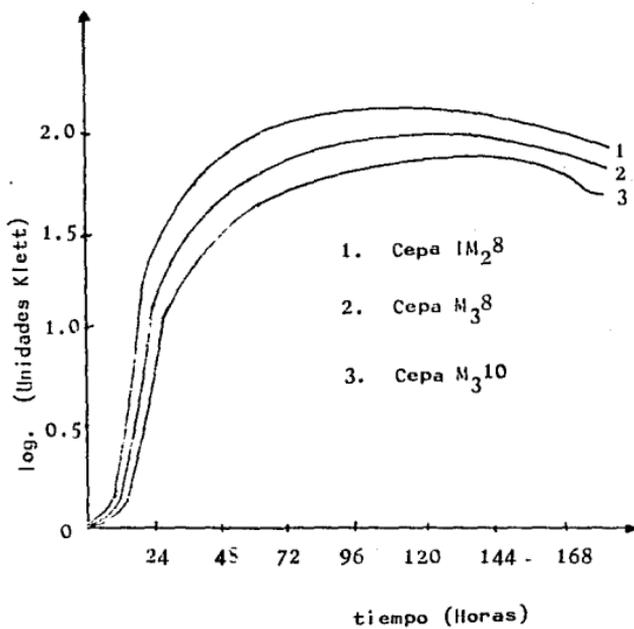
GRAFICA 3. Determinación del pH del cultivo en fermentación de los actinomicetos a diferentes tiempos.



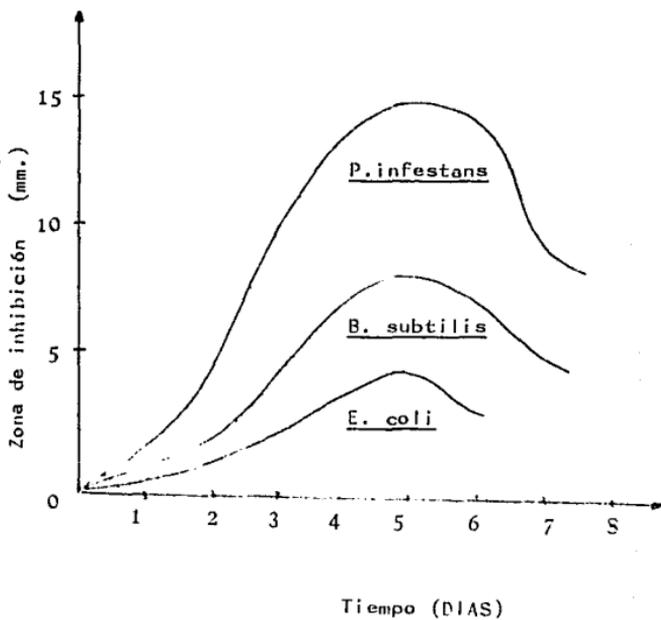
GRAFICA 4. Peso micelial de los actinomicetos en el cultivo -  
en fermentación a diferentes tiempos.



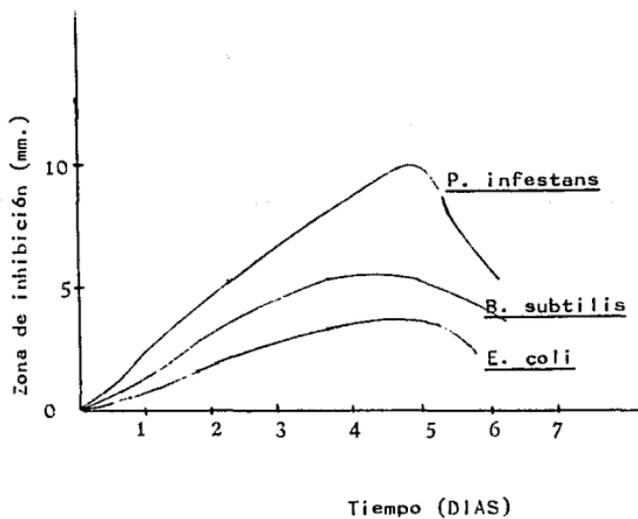
GRAFICA 5. Curva de crecimiento de los actinomicetos a diferentes tiempos de incubación.



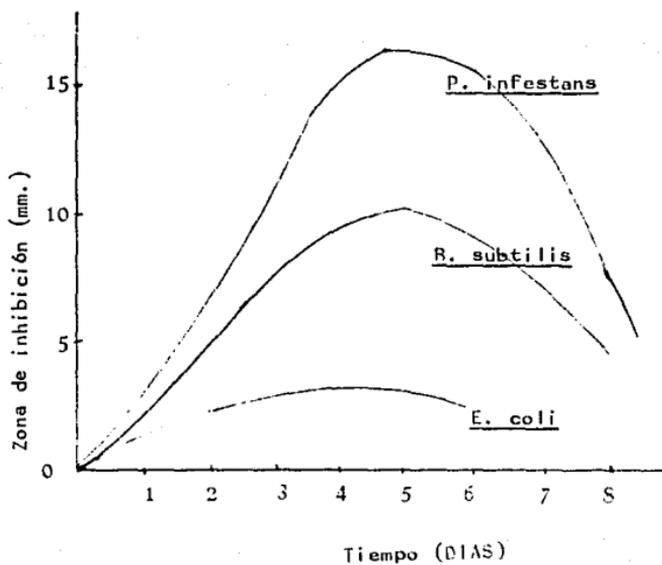
GRAFICA 6. Diámetro del halo de las zonas de inhibición del filtrado de la cepa M<sub>3</sub>S a diferentes tiempos de incubación.



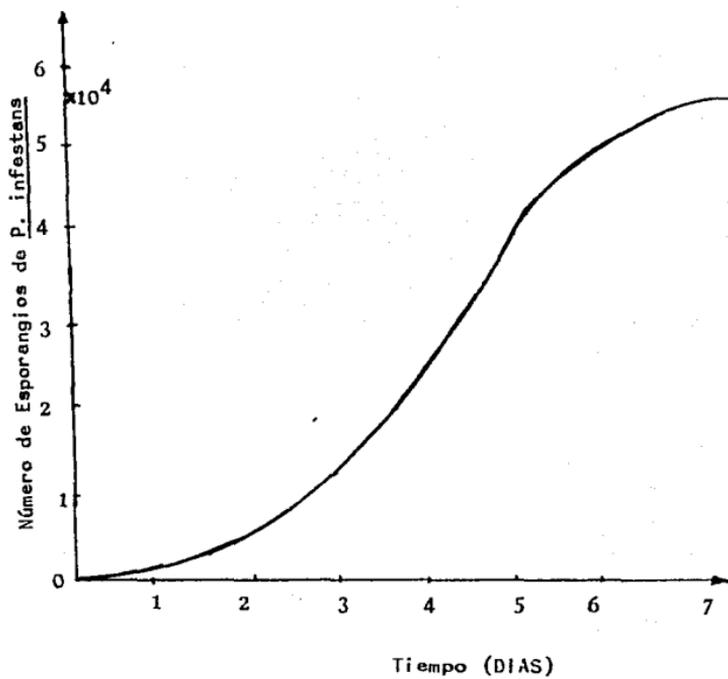
GRAFICA 7. Diámetro del halo de las zonas de inhibición del -  
filtrado de la cepa M<sub>3</sub>10 a diferentes tiempos de -  
incubación.



GRAFICA 8. Diámetro del halo de las zonas de inhibición del filtrado de la cepa IM<sub>2</sub>S a diferentes tiempos de incubación.



GRAFICA 9. Número de esporangios promedio por lesión en hojas de papa.



### Discusión de resultados.

Las cepas de actinomicetos, se conservaron en suelo es t $\acute{e}$ ril y el hongo fitopat $\acute{o}$ geno, en extracto de granos de ma $\acute{z}$ ; observando que ambos medios fueron adecuados para prolongar el tiempo de vida de los cultivos y reducir los cambios morfo l $\acute{o}$ gicos. Su uso, redujo el n $\acute{u}$ mero de transferencias requeri-- das para mantenerlos, que a su vez evit $\acute{o}$  contaminaciones y - disminuy $\acute{o}$  tiempo y material necesarios para mantenerlos aisl $\acute{a}$  dos.

En la determinaci $\acute{o}$ n de la poblaci $\acute{o}$ n de bacterias, acti micetos y hongos, por la t $\acute{e}$ cnica de cuenta en placa, se ob- serva una mayor incidencia de las bacterias que de los actino micetos y hongos. Adem $\acute{a}$ s debemos tomar en cuenta que el n $\acute{u}$ me ro de  $\acute{e}$ stos se ve influenciado por ciertas determinantes eco- l $\acute{o}$ gicas tales como: Contenido de materia org $\acute{a}$ nica, pH, hume-- dad y temperatura. (Tabla N $\acute{u}$ m. 3).

Las pruebas sobre antagonismo, in vitro, indican que - las cepas de actinomicetos act $\acute{u}$ an sobre P. infestans en dife- rente proporci $\acute{o}$ n, observ $\acute{a}$ ndose que las cepas M $_2$ S y la M $_3$ S, - fueron m $\acute{a}$ s antagonicas que las cepas M $_3$ 10 y la M $_1$ 3 respectiva mente. (Tabla N $\acute{u}$ m. 2)

Los resultados obtenidos en el suelo estéril inoculado con P. infestans y con P. infestans y los actinomicetos seleccionados ( $M_2^8$ ,  $M_3^{10}$  y  $M_3^8$ ), indican la pérdida de viabilidad de P. infestans, especialmente en presencia de los actinomicetos.

En la tabla núm.4 y gráfica 1, se observa que el número de esporangios por gramo de suelo de P. infestans recuperados, fué menor al utilizar la cepa  $M_2^8$  y mayor con la cepa -  $M_3^{10}$ . En la recuperación de esporas de actinomicetos en presencia de suelo estéril (Tabla núm. 5 y gráfica 2), se observa un proceso de adaptación mayor en la cepa  $M_3^8$  y menor en la  $M_3^{10}$ .

En suelo no estéril, no se pudieron recuperar las esporas de las cepas de actinomicetos ni los esporangios de P. infestans debido al predominio de otros microorganismos presentes en el suelo.

Estos resultados indican que las cepas con mayor actividad antagonica y por tanto más convenientes para este trabajo, corresponden a las cepas  $M_2^8$  y la  $M_3^8$ .

Los parámetros evaluados en la fermentación para obtener el principio antagónico indican:

En cuanto a la determinación del pH en el cultivo, se observó una elevación gradual de éste conforme el tiempo de incubación transcurría, elevándose de 7.35 al inicio de la fermentación, a 8.3 como promedio a los ocho días, siendo mayor en la cepa  $M_2^8$  y ligeramente menor en la cepa  $M_3^8$  (Tabla 6 y gráfica 3).

En la tabla 7 y gráfica 4, se observa un incremento gradual del peso del micelio a partir del segundo día, alcanzando un máximo a los cuatro días de incubación; a partir del cuál, dicho peso permaneció relativamente constante, siendo mayor en la cepa  $M_3^8$  y menor en la cepa  $M_3^{10}$ .

En la tabla 8 y gráfica 5, se observa que las tres cepas de actinomicetos se mantuvieron en la fase log entre las 12 y 24 horas, después de las cuales se inició la fase estacionaria que se mantuvo hasta el sexto día, en el que se inició un descenso leve de la turbiedad.

Respecto a la actividad inhibitoria del filtrado obtenido del actinomiceto en crecimiento, se corroboró la mayor actividad antagónica de las cepas  $M_2^8$  y  $M_3^8$ ; y se observa --

que los filtrados obtenidos a partir de éstos, fueron más eficientes y que la acción antagónica fué mayor para Phytophthora que para las dos bacterias probadas, resultando este efecto - mayor sobre B. subtilis que sobre E. coli. (Tabla 9 y gráficas 6, 7 y 8)

Debido a que la mayor actividad se presentó con las cepas IM<sub>2</sub>8 y la M<sub>3</sub>8, de aquí en adelante se optó por emplearlas para determinar la interacción: Planta-hongo-actinomiceto- -- principio activo.

Los resultados de la inoculación del hongo en las hojas, indican que los esporangios del microorganismo, aparecen a partir del segundo día después de la inoculación y que el número de éstos, aumenta progresivamente (Tabla 12 y gráfica-9), esto coincide con los resultados expuestos en la tabla 11 en los que se observa que a medida que transcurre el tiempo - de incubación, el tamaño de la lesión aumenta. En esta misma tabla, se observa que la adición de los filtrados obtenidos - del crecimiento de los actinomicetos, controla en cierto grado el desarrollo de las lesiones producidas por el hongo, y - que la adición del filtrado afectó ligeramente la coloración - de las hojas.

En la tabla 10, se observa que con la inoculación de P. infestans y bajo las condiciones experimentales de cultivo, se logró inducir la infección y desarrollo de la sintomatología del tizón tardío, y que con la adición del filtrado de -- los actinomicetos fué posible controlar la enfermedad, ya que el número de plantas dañadas fue menor y las lesiones desaparecieron iniciandose la recuperación de las plantas.

## **CAPITULO VIII**

### **CONCLUSIONES**

**Y**

### **RECOMENDACIONES**

- 1.- Los medios de cultivo seleccionados para actinomicetos y Phytophthora infestans, corresponden a AEGT y jugo V-8 -- respectivamente.
- 2.- Las cepas de actinomicetos probadas, inhiben a P. infestans en diferentes proporciones.
3. Las cepas con mayor actividad antagónica a P. infestans - corresponden a IM<sub>2</sub>8 y M<sub>3</sub>8, lo que se demostró in vitro en la interacción; Microorganismo-Microorganismo y Microorganismo-filtrado; in situ en la interacción Microorganismo-Microorganismo-Suelo y en vivo en la interacción Microorganismo- Filtrado-Planta-Suelo.
4. Las tres cepas probadas en el cultivo de fermentación mostraron una cinética de crecimiento similar.
- 5.- La adición del filtrado (del cultivo de actinomicetos) a plantas inoculadas, detiene el desarrollo de la enfermedad y este además resultó inócuo para la planta.
6. La cepa M<sub>3</sub>8 mostró adaptación y sobrevivencia en el suelo.
7. Se recomiendan más estudios, a fin de ratificar o rectificar los resultados obtenidos del efecto del filtrado sobre el control de la enfermedad, así como determinar las consecuencias de la adaptación y persistencia en el suelo mostradas por la cepa M<sub>3</sub>8 y el efecto de las características del suelo sobre el desarrollo de este microorga-

nismo y la producción del o los metabolitos de interés en condiciones naturales.

## CAPITULO IX

## BIBLIOGRAFIA

1. Alexander, M., (1981), "Introducción a la Microbiología - del Suelo", Trad. de la 2a. ed. en Inglés, Editorial AGT., México D. F., p. 491.
2. Booth, C., Norris, N. and Ribbons, D., (1974), "Methods in Microbiology", Volume 4, Second Printing, Academic Press - London and New York, Chapter XIV, pp. 405-426.
3. Boyd, A.E., (1950), "Development of Potato Blight (Phytophthora infestans) after planting infected seed tubers", - Ann. Appl. Biol., Vol. 95, pp. 301-309
4. Broadbent, P., Baker, K., and Waterworth, Y., (1971), "Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australian soils", Aust. J. Biol. Sci., Vol. 24, p p. 925-943.
5. Brown, E. M., (1973), "Soil Bacteriostasis limitation in - growth of soil and rhizosphere bacteria", Can. J. Microbiol Vol. 19, pp. 195-199.
6. Bruck, R. L., Fry E., and Apple, A. E., (1980), "Effect of Metalaxyl, and Acylalanine fungicide, on developmental - - stages of Phytophthora infestans", Phytopathology Vol. 70, pp. 597-601.

7. Coffey, D., and Wilson, E., (1983), "An ultrastructural study of the late-blight fungus Phytophthora infestans -- and its interaction with the foliage of the potato cultivars possessing different levels of general field resistance"., Can. J. Bot., Vol. 61, pp. 2669-2685.
8. Cooke, R.L., Derek, R., and Holgate, M., (1981), "Control of potato late blight (Phytophthora infestans) with systemic fungicides", Pestic Sci., Vol. 21, pp. 678-684.
9. Dávila, G.E., (1969), "Reacción de los tubérculos de variedades de papa con follaje resistente al tizón tardío", Agricultura Técnica, pp. 21-22.
10. Davis, Dulbelcco, Eisen, Ginsberg y Wood., (1978), "Tratado de Microbiología", Segunda Edición, Editorial Salvat S. A., España, p. 1559
11. Delgado, S., y Carreto, H., (1968). "Evaluación de un nuevo enfoque en el programa de mejoramiento de la papa en México", Agricultura Técnica, pp. 394-395.
12. Duke, N., (1982), "A Further study on the role of hypersensitivity in resistance of potato cultivars to infection by an incompatible race of Phytophthora infestans", Physiological Plant Pathology, Vol. 21, pp. 85-95.

13. Doke, N., and Furuichi, N., (1982), "Response of proto- -  
plast to hyphal wall components in relationship to resis-  
tance of potato to Phytophthora infestans", Physiological  
Plant Pathology, Vol. 21, pp. 23-30.
14. Dowley, L., Routley, G., and Peirce L.G., (1975), Ontogene-  
tic predisposition of tomato foliage to race 0 of Phyto--  
phthora infestans", Phytopathology, Vol. 65, pp. 1422- -  
1424.
15. Easton, G.D., (1982), "Late blight of potatoes and predic-  
tion of epidemics in arid Central Washington State", Plant  
Disease, Vol. 66, pp. 452-455.
16. Folleto, (1981), "Guía para la asistencia técnica agrí--  
cola, área de influencia del campo agrícola experimental --  
Valle de México", Chapingo, México, pp. 46-51.
17. Gallegly, M.E., (1962), "Greenhouse tests for multigenic-  
resistance to Phytophthora infestans", Phytopathology, --  
Vol. 52, pp. 1218-1223.
18. García, T.A., (1981), "Experimentos en Microbiología del-  
suelo", Primera edición, Compañía Editorial Continental,-  
S.A., México, D. F., p. 75
19. Gindrat, D., (1983), "Posibilités et limites de l'utilisa

- tion des antagonistes dans la lutte biologique", Les Colloques de l'Inra Microbial Antagonism Societe Francaise de Phytopathologie, pp. 333-339.
20. Goth, R.W., (1981), "An efficient technique for prolonged storage of Phytophthora infestans", American Potato Journal, Vol. 58, pp. 257-258.
21. Gottlieb, D., and P. Siminoff., (1952), "The production and role of antibiotics in the soil, II, Chloromycetin" Phytopathology, Vol. 42, pp. 91-97.
22. Gottlieb, D., Siminoff, P., and Martin, M., (1952), "The production and role of antibiotics in soil. IV Actidione and Clavacin", Phytopathology, Vol. 42, pp.
23. Guzmán, G. y Martínez C., (1985), "Planta productora de hongos comestibles sobre pulpa de café", Ciencia y Desarrollo, año 11, núm. 65, CONACYT, México, pp. 41-48.
24. Hartill, W.T., (1980), "Spray and seed tuber treatments -- for late blight control in potatoes", Plant Disease, Vol. 64, pp. 764-766.
25. Hide, G.A., (1981), "Fungus diseases on potato seed tuber plants in England and Wales, 1963-1967", Ann. Appl. Biol. Vol. 93, pp. 377-393.

26. Hockenull, D.J., (1960), "Progress in Industrial Microbiology", Volume II, Interscience Publishers Inc. New York, pp. 105-128, 133-165
27. Hsu, S.C., and Lockwood, S.L.m (1969), "Mechanism of inhibition of fungi in agar by Streptomycetes", J. Gen. Microbiol. Vol. 57, pp. 149-158.
28. Hughes, J.C., and Swain, T., (1960), "Scopolin production in potato tubers infected with Phytophthora infestans", - Phytopathology, Vol. 50, pp. 398-400.
29. James, W. C., et al., (1972), "The quantitative relationship between late blight of potato and loss in tuber yield" Phytopathology Vol. 62, pp. 92-96.
30. Jones, D., Unwin, C., and Ward, E.W., (1975), "The significance of capsidiol induction in Pepper fruit during an incompatible interaction with Phytophthora infestans", - Phytopathology, Vol. 65, pp. 1286-1288.
31. Kable, P., and Mackenzie, D.R., (1980) "Survival of Phytophthora infestans in potato stem lesions at high temperatures and implications for disease forecasting", Plant Disease, Vol. 64, pp. 165-167.

32. Kalakutskii, V., and Nikitina, N.I., (1968), "The germination in Actinomycetes", Microbiology, Vol. 35 No. 5, pp. 707-712.
33. Kelley, N.D., et al., (1976), "Competition between Phytophthora cinnamomi and Trichoderma spp. in autoclaved soil" Can. J. Microbiol., Vol. 22, pp. 1120-1127.
34. Kiraly, Z., (1970), "Modified carbohydrates translocation in bean and potato plants to compensate for fungal infection", Current Topics in Plant Pathology, pp. 133-141.
35. Király, Z., Barna, B., and Érsek, T., (1972), "Hypersensitivity as a consequence, not the cause of plant resistance to infection", Nature, Vol. 239, pp. 456-457.
36. Kirsop, B., and Snell, J., (1984), "Maintenance of fungi. In Maintenance of microorganisms", Chap. 11, Academic Press London. pp. 83-107.
37. Kuznetsov, V.D., and Pivovarova E., (1965), "The Technique of plating out freeze-dried spores of some antibiotic producing actinomycetes", Microbiology, Vol. 34 No. 1, pp. 144-147.

38. Latin, R., Mackenzie, D., and Cole, H., (1981), "The influence of host and pathogen genotypes on the apparent infection rates of potato late blight epidemics", Phytopathology, Vol. 71, pp. 82-85.
39. Le Grand-Pernot, F., (1981), "Facteurs influant sur le processus d'établissement de thalles monozoospores chez Phytophthora infestans", Can. J. Bot., Vol. 59, pp. 836-841.
40. Lingappa, Y., and Lockwood, L., (1962), "Chitin media for selective isolation and culture of actinomycetes", Phytopathology, Vol. 52, pp. 317-323.
41. Litvinenko, S. N., (1966), "The effect of growth stimulators on the development of a Streptomycin-producing organism", Microbiology, Vol. 35, No. 5, pp. 672-674.
42. MacDonald, J., and Duniway, J. M., (1978), "Influence of the matrix and osmotic components of water potential on zoospores discharge in Phytophthora", Phytopathology, Vol. 68, pp. 751-757.
43. Maldonado, M., (1987), "El centro de ecodesarrollo contra el deterioro ambiental", Información Científica y Tecnológica, Vol. 9 Núm. 127, CONACYT, México, pp. 59-60.

44. Manual de Operaciones Laboratorio. Planta Industrializada  
ra de Desechos Sólidos. Departamento del Distrito Fede--  
ral, (1976), Taller de Servicios Unidos de Artes Gráficas  
S. A., México, p. 441.
45. Manuales para Educación Agropecuaria, (1982), "Papas" - -  
Area producción vegetal 17, Editorial Trillas, Primera --  
Edición, México., p. 54.
46. Minogue, K., and Fry, W.E., (1981), "Effect of temperatu-  
re, relative humidity, and rehydration rate on germina- -  
tion of dried sporangia of Phytophthora infestans", Phyto  
pathology, Vol. 71, pp. 1181-1184.
47. Mitchell, R., and Alexander, M., (1961), "The mycolytic-  
phenomenon and biological control of Fusarium in soil", -  
Nature, Vol. 4770, pp. 109-110.
48. Montecillo, C, M. et al., (1982), "An improved technique-  
for inoculating plant surfaces with fungal zoospores", --  
Phytopathology, Vol. 72, pp. 403-406.
49. Norris, J.N., and Ribbons, W., (1974), "Preservation of -  
fungi", Methods in Microbiology, Volume 4, Second Prin- -  
ting, Chapter IV, Academic Press London and New York, pp.  
113-149.

50. Norris, J.N., and Ribbons, W., (1972), "Laboratory Assessment of Antibacterial Activity", Methods in Microbiology, Volume 7B, Chapter IV, Academic Press London and New York pp 211-233.
51. Paredes, L.O., (1986), "La biotecnología de plantas: Una herramienta estratégica en los programas agroalimentarios de México", "Ciencia y Desarrollo", año 12, número 68, -- CONACYT, México., pp. 27-43.
52. Patiño, M.M, y Arias, C.A., (1984), "Microorganismos que presentan antagonismo en la rizosfera de suelos agrícolas para el cultivo de papa", Tesis Facultad de Química, México., UNAM.
53. Pérez, R. M., (1976) "Técnicas para la extracción de esporas de *Phytophthora* del suelo", Tesis Facultad de Ciencias, México, UNAM.
54. Pristou, R., and Gallegly M.E., (1954), "Leaf Penetration by *Phytophthora infestans*", Phytopathology, Vol. 44, pp. - 81-85.
55. Rangaswami, G., and Ethiraj, S., (1962), "Antibiotic production by *Streptomyces* sp. in unamended soil", Phytopathology, Vol. 52, pp. 989- 992.

56. Reddick, D., (1932), "Some Diseases of wild potatoes in - México", Phytopathology, Vol. 22, pp. 609-612.
57. Rotem, J., and Cohem, Y., (1974), "Epidemiological pa- -- tterns of Phytophthora infestans under semi - arid condi- tions", Phytopathology, Vol. 64, 711-714.
58. Sarasola, A. A. y Rocca, M., (1975), "Fitopatología", Cur- so Moderno, Editorial Hemisferio Sur, Argentina, pp. 189- 207 (Tomo I), 115-135 (Tomo II).
59. Smoot J. J., et al., (1958), "Production and germination- of oospores of Phytophthora infestans", Phytopathology, - Vol. 48, pp. 165-171.
60. Stakman, E. C., and Harror, J., (1957), principles of - - Plant Pathology, The Ronald Press Company, New York, p. - 724.
61. Suprun, T. P., (1965), "Preservation of Microscopic fungi in Sterile soil", Microbiology, Vol. 34 No. 3 pp. 461-466.
62. Tocagni, H., (1980), "Producción de papas", Editorial Al- batros, Argentina, P. 171.

63. Tasao, P. H., (1960), "A serial dilution end-point method for estimating disease potentials of citrus Phytophthora in soil", Phytopathology, Vol. 50, pp. 717 - 723.
64. Tverskoi, D. L., et al., (1981), "Medium for cultivating Phytophthora infestans conidia". Mikol. Fitopatol. (In -- Russ). Biological Abstract., Vol. 15, No. 3 pp. 247-250.
65. Victoria, J. I., and Thurston, D., (1974), "Light Intensity Effect on lesion size caused by Phytophthora infestans on potato leaves", Phytopathology, Vol. 74 pp. 753-754.
66. Villark, H., and Hijink, M., (1982), "Catálogo Holandes de variedades de patata", Apdo 17337, 2502, Ch., La Haya Holanda, NIVAA p. 176.
67. Villarreal, M. J., et al., (1984), "Puebla una nueva variedad de papa", Folleto Técnico No. 5 SARH.
68. Waggoner, P. E., and Wallin, J., (1952), "Variation in pathogenicity among isolates of Phytophthora infestans on tomato and potato", Phytopathology, Vol. 42, pp. 645-648.
69. Wallin, J. S., (1953), "The production and survival of sporangia of Phytophthora infestans on tomato and potato plants in the field", Phytopathology, Vol. 43, pp. 505-508

70. Waksman, S. and Lechevalier H., (1950), "Actinomycetes" - The Williams and Co. Baltimore, U.S.A., pp. 6-7
71. Warcup, J.H., (1950), "The Soil plate method for isolation of fungi from soil", Nature, Vol. 166, No. 4211, - pp.117-118.
72. Warcup, J. H., (1955), "Isolation of fungi hyphae present in soil", Nature, Vol. 28, No. 4465, pp. 953-954.
73. Watson, R. D., (1960), "Soil Washing improves the value of the soil dilution and the plate count method of estimating populations of soil fungi", Phytopathology, Vol. 50, pp. 792-794.
74. Zentmeyer, G.A., (1961), "Chemotaxis of zoospores for root exudates", Science, Vol. 133, pp. 1593-1596.