

Guatemala, 26 de febrero, 2021



Señor Director
Dr. Félix Alan Douglas Aguilar Carrera
Director General de Investigación
Universidad de San Carlos de Guatemala

Señor Director:

Adjunto a la presente el informe final “**Estudio poblacional de *Rhizoctonia solani* y estrategia de control biológico en zonas productoras de papa del altiplano occidental de Guatemala**” con número de proyecto B18-2020, coordinado por el PhD. Gregorio Amilcar Sánchez Pérez y avalado por el Instituto de Investigaciones Agronómicas (IIA) de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Este informe final fue elaborado con base en la guía de presentación de la Dirección General de Investigación, el cual fue revisado su contenido en función del protocolo aprobado, por lo que esta unidad de investigación da la aprobación y aval correspondiente.

Así mismo, el coordinador del proyecto, se compromete a dar seguimiento y cumplir con el proceso de revisión y edición establecido por Digi del **informe final y del manuscrito científico**. El manuscrito científico debe enviarse, por el coordinador del proyecto, para publicación al menos en una revista de acceso abierto (*Open Access*) indexada y arbitrada por expertos en el tema investigado.

Sin otro particular, suscribo atentamente.

“Id y enseñad a todos”

Firma

PhD. Gregorio Amilcar Sánchez Pérez
Coordinador del proyecto de investigación

Firma y sello

Director del Instituto de Investigaciones Agronómicas (IIA)
Facultad de Agronomía

Universidad de San Carlos de Guatemala
Dirección General de Investigación
Programa Universitario de Investigación en Ciencias Básicas

INFORME FINAL

Estudio poblacional de *Rhizoctonia solani* y estrategia de control biológico en zonas productoras de papa del altiplano occidental de Guatemala

Equipo de investigación

Ph.D. Gregorio Amílcar Sánchez Pérez¹

M.Sc. José Alejandro Ruiz Chután^{1,2}

Ing. Agr. Julio Ernesto Berdúo Sandoval¹

Ing. Agr. Walfer Wilfredo Martínez Xutuc³

Inga. Agra. Natalia Rosamaría Quixtán Rivera⁴

Guatemala febrero de 2021

Facultad de Agronomía, Instituto de Investigaciones Agronómicas y Ambientales¹

Department of Crop Sciences and Agroforestry, Czech University of Life Sciences²

Centro Universitario de Nor Occidente³

Federación de Cooperativas Agrícolas de Guatemala⁴

Dr. Félix Aguilar Carrera
Director General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar
Coordinador General de Programas

Ing. Agr. Julio Rufino Salazar
Coordinador del Programa de Ciencias Básicas

Ph.D. Gregorio Amílcar Sánchez Pérez¹
Coordinador del Proyecto

M.Sc. José Alejandro Ruiz Chután^{1,2}
Investigador

Ing. Agr. Walfer Wilfredo Martínez Xutuc³
Investigador

Ing. Agr. Julio Ernesto Berdúo Sandoval¹
Investigador colaborador

Inga. Agra. Natalia Rosamaría Quixtán Rivera⁴
Investigadora colaboradora

Facultad de Agronomía, Instituto de Investigaciones Agronómicas y Ambientales¹

Department of Crop Sciences and Agroforestry, Czech University of Life Sciences²

Centro Universitario de Nor Occidente³

Federación de Cooperativas Agrícolas de Guatemala⁴

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, 2021. El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores. Esta investigación fue cofinanciada por la Dirección General de Investigación de la Universidad de San Carlos de Guatemala a través del proyecto B18-2020. durante el año 2020 en el Programa Universitario de Investigación de Ciencias Básicas. Financiamiento aprobado por Digi: Q.299,019.1 Financiamiento ejecutado: Q. 195,864.6

Índice

1	Resumen	1
2	Palabras clave	1
3	Abstract.....	2
4	Introducción.....	3
5	Planteamiento del problema	4
6	Delimitación en tiempo y espacio	5
7	Marco teórico.....	6
7.1	El cultivo de la papa en Guatemala y la enfermedad de la rizoctoniasis.....	6
7.2	Síntomas, infección y desarrollo de la enfermedad.....	6
7.3	Taxonomía de <i>Rhizoctonia solani</i>	7
7.4	Patogenicidad de <i>Rhizoctonia solani</i>	8
7.5	Ecología y ciclo de vida de <i>Rhizoctonia solani</i>	9
8	Estado del arte	10
8.1	Caracterización de los grupos de anastomosis de <i>Rhizoctonia solani</i>	10
8.2	Manejo de la enfermedad a partir del control biológico.....	10
9	Objetivos.....	12
10	Hipótesis	12
11	Materiales y métodos.....	13
11.1	Enfoque y tipo de investigación	13
11.2	Recolección de información	13
11.3	Técnicas e instrumentos.....	14
11.4	Procesamiento y análisis de la información	19
12	Vinculación, difusión y divulgación.....	20

13	Productos, hallazgos, conocimientos o resultados.....	21
13.1	Identificar los grupos de anastomosis de <i>R. solani</i> presentes en las principales zonas productoras de papa del altiplano occidental de Guatemala.	21
13.2	Determinar la virulencia de los grupos de anastomosis de <i>R. solani</i> identificados, sobre 5 variedades de papa comercializadas en Guatemala.....	23
13.3	Describir la estructura genética de las poblaciones de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>T. viridae</i> aisladas de las principales zonas productoras de papa del altiplano occidental.....	30
13.4	Determinar el grupo filogenético de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>T. viridae</i> más efectivo para el control biológico de cada grupo de anastomosis de <i>R. solani</i>	32
14	Análisis y discusión de resultados	37
15	Conclusiones.....	40
16	Impacto esperado	41
17	Referencias	42
18	Apéndices	53

Índice de figuras

Figura 1. Mapa de ubicación de las zonas de estudio a partir de las cuales se aisló <i>Rhizoctonia solani</i> para las pruebas de identificación de grupos de anastomosis, ensayos de control biológico y resistencia de genotipos comerciales de papa	14
Figura 2. Productos amplificados por PCR con los cebadores AG-3 PT-F/ AG-3 PT-R; AG-4 HG-II-F/AG-4 HG-I-II-R y AG-5/ ThanaCera-R para la identificación de los grupos de anastomosis AG-3 PT, AG4-HGII y AG-5 de <i>R. solani</i> , respectivamente. Carriles 1-7 muestras positivas para el grupo AG-3 PT (480 pb). Carriles 8-10 muestras positivas para el grupo AG4-HGII (420 pb). Carriles 11 y 12 muestras positivas para el grupo AG-5 (350 pb). MP = marcador de peso molecular 250 pb invitrogen®.	21

Figura 3. Diagrama de cajas del índice de severidad de ocasionado por *Rhizoctonia solani* sobre las variedades de papa evaluadas. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza..... 23

Figura 4. Diagrama de caja del comportamiento del índice de severidad en función de los tres grupos de anastomosis identificados en *Rhizoctonia solani*. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas $p < .05$ 24

Figura 5. Diagrama de cajas del comportamiento del índice de severidad haciendo un agrupamiento por variedades de papa. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas $p < .05$ 25

Figura 6. Diagrama de cajas del comportamiento del índice de severidad haciendo un agrupamiento por grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani*. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas $p < .05$ 26

Figura 7. Incidencia de plantas enfermas por *Rhizoctonia solani* a nivel de variedades de papa. La proporción general de plantas enfermas se indica mediante la línea punteada.27

Figura 8. Incidencia de plantas enfermas por cada grupo de anastomosis de *Rhizoctonia solani*. La proporción general de plantas enfermas se indica mediante la línea punteada. 28

Figura 9. Indicencia de plantas enfermas en la interacción de las variedades de papa y grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani*. 30

Figura 10. Productos amplificados por PCR con los cebadores THITS-F2/THITS-R3 y THITS-F1/THITS-R1 para la identificación de *T. harzianum* y *T. viride* respectivamente. Carriles 1-7 muestras positivas para *T. harzianum* (395 pb). Carriles 8-11 muestras positivas para *T. viride* (330 pb). MP = marcador de peso molecular 250 pb invitrogen®. 31

Figura 11. Dendrograma de tipo Neighbor-Joining (NJ) con arreglo radial generado a partir del marcador molecular amplified fragment length polymorphism (AFLP) que muestra la diversidad genética y grupos filogenéticos de a) 25 aislados de *T. harzianum* y b) 29 aislados de *T. viride*. 31

Figura 12. Diagrama de cajas de la capacidad antagónica de *T. harzianum* y *T. viride* sobre *R. solani*. Se muestra el detalle del resultado de la prueba de t de Student, así como

el valor de la media de PICR e intervalo de confianza al 95% para ambas especies de Trichoderma..... 32

Figura 13. Diagrama de cajas de la capacidad antagonica de los grupos filogenéticos de T. viride sobre los grupos de anastomosis R. solani. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza. 33

Figura 14. Diagrama de cajas de la capacidad antagonica de los grupos filogenéticos de T. viride sobre los grupos de anastomosis R. solani. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas $p < .05$ 34

Figura 15. Diagrama de cajas de la capacidad antagonica de a) T. harzianum y b) T. viride sobre cada grupo de anastomosis de R. solani. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza 35

Figura 16. Diagrama de cajas de la capacidad antagonica de cada grupo filogenético de a) T. harzianum y b) T. viride sobre R. solani. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas $p < .05$ 36

Indice de Tablas

Tabla 1. Resumen de los cebadores utilizados para la identificación de los grupos de anastomosis de Rhizoctonia solani. Se muestra el número de aislados positivos y el porcentaje de incidencia para cada grupo de anastomosis del hongo..... 22

Tabla 2. Resultados de la prueba de Chi cuadrado sobre la indicencia de plantas enfermas de las variedades de papa evaluadas. 27

Tabla 3. Resultados de la prueba de Chi cuadrado sobre la indicencia de plantas enfermas por cada grupo de anastomosis de Rhizoctonia solani. 28

Tabla 4. Resultados de la prueba de Chi cuadrado sobre la indicencia de plantas enfermas en la interacción de las variedades de papa y grupos de anastomosis de Rhizoctonia solani. 29

1 Resumen

Rhizoctonia solani es un basidiomiceto presente en el suelo que actualmente afecta la producción del cultivo de papa en el altiplano occidental de Guatemala, causando la enfermedad conocida como costra negra. La clasificación actual de *R. solani* se basa en la capacidad de las hifas para fusionarse y formar un grupo de anastomosis (AG), reconociéndose hasta el momento 13 AG. Debido a los impactos negativos del control químico, la estrategia de control biológico, mediante especies de *Trichoderma*, se presentan como una alternativa viable. El objetivo de la investigación fue identificar molecularmente, los AG de *R. solani* presentes en el altiplano occidental guatemalteco y el nivel de virulencia sobre cinco variedades comerciales de papa. También se evaluó el potencial, como agentes de control biológico, de aislados nativos de *T. harzianum* y *T. viride* caracterizados mediante el marcador molecular AFLP. De los 78 aislados de *R. solani* se identificaron los grupos AG-3PT, AG-4-HG-II y AG-5 con una incidencia de 46.16, 14.10 y 17.96%, respectivamente, mientras que 17 aislados no pudieron ser asignados. Las cinco variedades de papa fueron igualmente susceptibles a los AG. Los aislados de *T. harzianum* mostraron un media del porcentaje de inhibición del crecimiento radial PICR de *R. solani* de 56.71% y *T. viride* 37.58% ($p < .001$). Se determinó que los grupos filogenéticos de *T. harzianum* y *T. virens* son igualmente efectivos contra los 3 AG identificados, destacándose el beneficio del uso de aislados nativos. Se sugiere el uso de secuenciación para la identificación de los aislados no asignados, así como evaluaciones en campo para evaluar la eficiencia de los aislados de *T. harzianum* y *T. virens*.

2 Palabras clave

Grupos de anastomosis, control biológico, diversidad genética, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*

3 Abstract

Rhizoctonia solani is a basidiomycetes present in the soil that currently affects the production of potato crops in Guatemala's western highlands, causing the disease known as black scab. The current classification of *R. solani* is based on the ability of the hyphae to merge and form an anastomosis group (AG), 13 AG being recognized so far. Due to the negative impacts of chemical control, the biological control strategy, using *Trichoderma* species, is presented as a viable alternative. The research objective was to identify the molecular level of *R. solani* AG present in the western highlands of Guatemala and the level of virulence of five commercial potato varieties. As biological control agents, the potential of native isolates of *T. harzianum* and *T. viride* characterized by the molecular marker AFLP was also evaluated. Of the 78 isolates of *R. solani*, the groups AG-3PT, AG-4-HG-II, and AG-5 were identified with an incidence of 46.16, 14.10, and 17.96%, respectively, while 17 isolates could not be assigned. All five potato varieties were equally susceptible to AG. Isolates of *T. harzianum* showed an average PICR radial growth inhibition percentage of *R. solani* of 56.71 % and *T. viride* 37.58 % ($p < .001$). We determined that the phylogenetic groups of *T. harzianum* and *T. virens* are equally effective against the 3 GA identified, highlighting the benefit of using native isolates. The use of sequencing for the identification of unassigned isolates is suggested, and field evaluations to assess the efficiency of *T. harzianum* and *T. virens* isolates.

Key words: anastomosis group, biological control, genetic diversity, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*

4 Introducción

Actualmente, la producción del cultivo de papa se ve fuertemente afectada por el ataque de la enfermedad rizoctoniasis, causada por el hongo *Rhizctonia solani* Khün, el cual es la fase asexual del basidiomyceto *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk (Cedeño et al., 2001). Los reportes del 2019 de la Federación de Cooperativas Agrícolas de Guatemala estiman pérdidas en la producción de papa que alcanzan hasta el 50% en varias zonas del departamento de San Marcos. El manejo del patógeno es complicado debido a su compleja composición poblacional (McCabe et al., 1999; Ogoshi, 1987) que generan cepas cada vez más agresivas por la diversidad genética del patógeno (Danies et al., 2013; Fry et al., 2015).

La información poblacional del patógeno es imprescindible para el desarrollo de estrategias de control que incluyan la selección de variedades menos susceptibles y uso de cepas nativas de hongos con capacidad biofungicida, como *Trichoderma spp* para el control de la enfermedad (Abbas, Jiang, & Fu, 2017; Rajendraprasad, Vidyasagar, Uma, & Koteswar, 2017). Dicha información es completamente desconocida en Guatemala, por lo que este estudio pretende conocer estos detalles para desarrollar un paquete tecnológico que ayude a los agricultores más vulnerables a mitigar los daños causados por esta enfermedad.

Para esto, se evaluó el efecto de virulencia de los diferentes grupos de anastomosis de *R. solani* presentes en las principales zonas de producción del cultivo de papa de la región del altiplano occidental de Guatemala. También fue evaluado el potencial de diversidad genética de cepas nativas de *T. harzianum* y *T. viridae*, como agentes de control biológico ante los grupos de anastomosis de *R. solani*. Se determinaron los grupos de anastomosis presentes mediante PCR específico (Das et al., 2014; Gondal et al., 2019) y se realizaron pruebas de virulencia sobre 5 variedades de papa. También se evaluó la capacidad de inhibición de crecimiento de *T. harzianum* sobre *R. solani* a través del método de cultivo dual (Reyes et al., 2008; Rodriguez & Flores, 2018), así como el potencial de parasitismo de *T. viridae* sobre esclerocios del patógeno en condiciones in vitro.

Se espera obtuvo la composición de grupos de anastomosis de *R. solani* presentes en la zona de estudio, la agresividad de dichos grupos sobre algunas variedades de papa ampliamente distribuidas en el país, así como una colección de cepas nativas de *T.*

harzianum y *T. viride*, caracterizadas molecularmente, con potencial para el control biológico del patógeno. Esta información será utilizada para realizar recomendaciones específicas a los agricultores, sobre la variedad de papa y la cepa nativa de *Trichoderma harzianum* y *T. viride* para el control de los grupos de anastomosis del patógeno presentes en sus zonas de producción.

5 Planteamiento del problema

A nivel mundial, el cultivo de la papa es atacado por una amplia lista de enfermedades causadas por hongos y bacterias (Arora & Khurana, 2004; Secor & Gudmestad, 1999). En Guatemala, la enfermedad conocida como rizoctoniasis, causada por *Rhizctonia solani* Khün, el cual es la fase asexual del basidiomyceto *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk (Cedeño et al., 2001), es un problema que afecta fuertemente las principales zonas de producción en el altiplano occidental.

En regiones como la Aldea San Sebastián, San Marcos, a casusa de esta enfermedad, se reportan pérdidas de hasta el 50% de la producción, según los informes del 2019 proporciandos por la Federación de Cooperativas de Guatemala, a través de la línea del Consorcio Nuestra Tierra y la Asociación de Organizaciones de los Cuchumatanes. Para la población agrícola de esta zona, el cultivo de papa forma parte imporante de su dieta básica y actividad económica, por lo que las pérdidas ocasionadas por *R. solani*, pueden llegar a representar un problema de seguridad alimentaria para la región de no plantearse estrategias efecitvas para su control.

La complejidad del hongo radica en que, dentro de la misma especie, existen grupos de anastomosis (AGs), los cuales llegan a comportarse como poblaciones genéticamente diversas (McCabe et al., 1999; Ogoshi, 1987). Por tanto, es indispensable su identificación, preferiblemente por homología de secuencias genéticas (Das et al., 2014; Gondal et al., 2019) debido a que la diversidad genética en los patógenos, es un factor crucial en el desarrollo de nuevas poblaciones cada vez más agresivas (Danies et al., 2013; Fry et al., 2015). Dicho supuesto queda evidenciado en las pruebas de virulencia realizadas con diferentes grupos de anastomosis, los cuales mostraron niveles de agresividad completamente diferentes sobre el cultivo de papa (Das et al., 2014; Inokuti et al., 2018; Woodhall et al., 2007).

Para el control de este patógeno, existen diversos estudios que hacen énfasis en los resultados positivos sobre el uso de los hongos *Trichoderma harzianum* y *T. viride* por su potencial como biofungicidas, incluyendo su efecto micoparásito sobre los esclerocios del hongo (Abbas et al., 2017; Rajendraprasad et al., 2017; Vinale et al., 2008). Los estudios también resaltan la necesidad y los beneficios en el uso de cepas nativas para evitar procesos de adaptación ecológica y así obtener resultados efectivos por la alta especificidad de parasitismo que pueden tener las cepas de *Trichoderma* sobre el patógeno (Hoyos et al., 2012; Naeimi et al., 2010).

En el control de la enfermedad, las estrategias biológicas aventajan al control químico al no representar efectos tóxicos sobre la microbiota del suelo, la atmósfera, ni efectos perjudiciales al ambiente (Groth et al., 1990). El desarrollo de este estudio permitirá conocer a profundidad la composición poblacional y nivel de agresividad de las cepas *R. solani*, ya que la dispersión mundial de diversos AGs ya ha sido reportada (Cao et al., 2019). También se podrán recomendar cepas nativas específicas de *T. harzianum* y *T. viride* para el control del patógeno presente en las zonas de estudio.

6 Delimitación en tiempo y espacio

La presente investigación se realizó durante el periodo comprendido de febrero del 2020 a febrero del 2021 constando de tres fases: campo, laboratorio y gabinete. En la fase de campo se realizó la colecta de material vegetal afectado por la enfermedad de la rizoctoniasis, así como muestras de suelo para el aislamiento de cepas nativas de *Trichoderma harzianum* y *T. viride*. Las colectas se realizaron en los departamentos de Quetzaltenango, Huehuetenango y San Marcos.

Durante el mes de marzo hasta diciembre, se realizó la fase de laboratorio, la cual consistió de los análisis moleculares, así como los ensayos de virulencia y control biológico. En los dos meses finales se elaboraron y presentaron el informe final y el manuscrito científico. La fase de laboratorio y gabinete se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía. En el análisis de los datos moleculares se contó con el apoyo de los profesionales del laboratorio de Biología Molecular de la Czech University of Life Sciences.

7 Marco teórico

7.1 El cultivo de la papa en Guatemala y la enfermedad de la rizoctoniasis

En Guatemala, la papa (*Solanum tuberosum* L.) representa para la población agrícola, especialmente de la región occidental, un cultivo que forma parte importante de su dieta básica y su actividad económica. Según los últimos datos reportados (2016), se obtuvo una cosecha de 1,187,260 Tm, generando 12,793 empleos permantes (Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación, 2016). Actualmente, este cultivo es fuertemente afectado por *Rhizctonia solani* Khün, el cual es la fase asexual del basidiomyceto *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk (Cedeño et al., 2001).

Este hongo habita naturalmente en el suelo y causa síntomas muy variados en un amplia gama de plantas. Dicho hongo presenta una especie muy heterogénea conformada por numerosas cepas, las cuales varían entre sí debido a sus características de crecimiento in vitro y patogenicidad (Ogoshi, 1987). *R. solani* se transmite por semilla (tubérculos) contaminados, proveyendo un mecanismo para su dispersión a grandes distancias. Una vez establecido en el suelo, el micelio y los esclerocios del patógeno pueden proveer una fuente adicional de inóculo primario (Tsrör, 2010).

En el cultivo de papa, la enfermedad también ha sido nombrada como cancro de tallo y costra negra de los tubérculos. Sin embargo, se considera más apropiado el nombre de rizoctoniasis debido a que los síntomas de cancro de tallo y costra negra son afecciones que se presentan en regiones muy específicas, dejando fuera otras áreas igualmente afectadas por este hongo como las raíces y estolones (Escalona et al., 2011). Esta enfermedad se encuentra presente en todas las zonas productoras de papá, pero su severidad aumenta en áreas de clima frío y suelos húmedos (Cedeño et al., 2001).

7.2 Síntomas, infección y desarrollo de la enfermedad

Los síntomas del complejo de la enfermedad rizoctoniasis se observan en partes de la planta por debajo y por encima del suelo en dos fases: infección de plantas en crecimiento (cancro del tallo) e infección de tubérculos con la formación de esclerocios (costra negra). La costra negra, que es el signo más visible de la enfermedad, se desarrolla más tarde en la temporada de crecimiento y se caracteriza por la formación de esclerocios negros e irregulares de varios tamaños en el tubérculo. Se puede producir una alteración en el tamaño del área de la lesión y en el número de tubérculos infectados, y en las

infecciones graves, los tubérculos pueden estar mal formados y agrietados (Frank & Leach, 1980; Hide et al., 1974; Jeger et al., 1996).

Los síntomas del cancro del tallo, que se presentan al comienzo de la temporada, incluye lesiones necróticas en las puntas de los brotes que pueden inhibir o retrasar la aparición, causando masas deficientes y desiguales con plantas debilitadas. También pueden desarrollarse lesiones marrones, secas y generalmente hundidas en tallos, estolones y raíces (Baker, 1970; Banville, 1978). Las lesiones marrones rodean los tallos y causan atrofia. Los síntomas en la superficie incluyen clorosis (Hartill, 1989).

En una infección severa, se pueden formar pequeños tubérculos verdes en el tallo sobre el suelo. Los tallos se vuelven resistentes a la infección después de la emergencia (van Emden, 1965) Otro síntoma del complejo de la enfermedad de *Rhizoctonia* es el collar blanco, causado por el teleomorfo *T. cucumeris* (Banville & Carling, 2001). En la base del tallo cerca de la línea del suelo se puede desarrollar un collar de polvo blanco grisáceo superficial. El papel de la forma sexual del hongo en la epidemiología de la enfermedad no está claro (Jeger et al., 1996).

El complejo de la enfermedad de *Rhizoctonia* puede causar daños tanto cuantitativos como cualitativos a los cultivos de papa. Las pérdidas cuantitativas se producen debido a la infección de los tallos, estolones y raíces, lo que afecta el tamaño y número de los tubérculos (Carling et al., 1989; Platt, 1989), mientras que las pérdidas cualitativas se producen principalmente a través de la producción de tubérculos mal formados y el desarrollo de esclerocios en la superficie del tubérculo (James & McKenzie, 1972).

Se ha informado que la enfermedad en papa, causa pérdidas de rendimiento comercializables de hasta el 30% (Banville, 1989; Platt, Canale, & Giménez, 1993; Weindhold, Bowman, & Hall, 1982). La gravedad de la enfermedad no siempre está asociada con la reducción del rendimiento; sin embargo, la formación de esclerocios transmitidos por el tubérculo reduce la calidad del tubérculo, lo que provoca el desarrollo de tubérculos mal formados y una alteración en el tamaño (Carling et al., 1989; Jager et al., 1991; Tsrer & Peretz-Alon, 2005).

7.3 Taxonomía de *Rhizoctonia solani*

La clasificación anamórfica de las especies de *Rhizoctonia* se basa en una caracterización del estado nuclear de la célula (multi-, bi- o uninucleado) y la capacidad

de las hifas para anastomosar con aislados de probadores de los grupos de anastomosis designados (AG) (Sneh et al., 1991); esto es adicional a la clasificación de teleomorfos (Sharon et al., 2006).

Además de la interacción hifal, se han utilizado características tales como patogenicidad y marcadores bioquímicos y genéticos para diferenciar los subgrupos dentro de varios AG. Los ensayos de PCR convencionales y tiempo real desarrollados para AG3 tienen ventajas considerables sobre otros métodos para asignar los AG (Lees et al., 2002). Hoy en día, el análisis de la secuencia del espaciador transcrito interno (ITS) del ADN ribosomal parece ser el método más apropiado para clasificar las especies de *Rhizoctonia* (Sharon et al., 2006).

Los AG se compararon mediante hibridación de ADN /ADN, polimorfismo de longitud de fragmento de restricción, ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD), microsatélites amplificados aleatoriamente (RAMS), electroforesis de isoenzimas, zimogramas pépticos y mapeo de restricción de ADN en el ADNr ITS 5.8S, todos los cuales indican que los diferentes AG y subgrupos son unidades evolutivas discretas (Balali et al., 1996; Carling et al., 2002; El Bakali et al., 2003; Kuninaga, 2002; Kuninaga et al., 2000).

7.4 Patogenicidad de *Rhizoctonia solani*

Se cree que las especies de *Rhizoctonia* distintas de *R. solani* tienen poco o ningún papel en causar enfermedad en la papa (Carling y Leiner 1990). Aunque varios AG de *R. solani* pueden infectar la papa (Banville et al., 1996), la patogenicidad y el tipo de enfermedad en la papa varían entre ellos. La mayoría de los informes muestran que las cepas AG-3 están especializadas y son el principal patógeno de la papa, mientras que las cepas de otros AG menos especializadas de *R. solani* infectan a la papa como un huésped alternativo (G. J. Banville, 1989; G. J. Banville et al., 1996; Weindhold et al., 1982)

Campion, Chatot, Perraton y Andrivon (2003) informaron sobre la formación de esclerocios en tubérculos producidos a partir de esquejes sanos cultivados en suelo infestado con AG-3, pero no en tubérculos cultivados en suelo infestado con AG-5 o AG-2-1. En otro estudio, los ensayos de patogenicidad realizados en condiciones de invernadero en Australia del Sur, demostraron que todos los aislados de AG-3, AG-4 y AG-5 causaban síntomas de enfermedad en la papa. Tanto los aislamientos de AG-3 como

los de AG-5 causaron costra negra y el cancro del tallo, aunque los síntomas de la costra negra fueron menos severos con AG-5. Los aislados de AG-4 produjeron los cancros más severos de tallos y estolones de todos los aislamientos probados (Stodart et al., 2007).

En las pruebas de patogenicidad realizadas en cámaras de crecimiento, los aislamientos de AG-3, originados a partir de tubérculos (uno de los EE. UU. Y tres de México), causaron daños importantes en las raíces y los brotes. Las pruebas de patogenicidad de 40 aislamientos sudafricanos que representan diversos AG en brotes de papa, indicaron que AG-3 fue el AG más virulento en papas, y aislamientos de esclerocios en tubérculos y lesiones de tallos, son más agresivas que los aislados de Tubérculos sin síntoma o suelo. AG-4 y AG-5 causaron significativamente menos enfermedad que AG-3, y ninguno de los aislados de AG-7 o AG-8 mostró ninguna virulencia a los brotes de papa (Truter & Wehner, 2004). En Canadá, los aislamientos de AG-3 fueron significativamente más virulentos que los aislamientos de AG-4 o AG-5, mientras que la virulencia de los dos últimos fue similar (Bains & Bish, 1995).

7.5 Ecología y ciclo de vida de *Rhizoctonia solani*

R. solani es un patógeno del suelo y, por lo tanto, se ve afectado por las condiciones del suelo. La costra negra y el cancro del tallo son más severos en suelos frescos y húmedos. El desarrollo de estas enfermedades se ve favorecido por las temperaturas del suelo entre 16 y 23 °C, mientras que las temperaturas del suelo por encima de 25 °C reducen la gravedad del cancro (Anderson, 1982). La etapa sexual de este patógeno se puede encontrar en las plantas de papa infectadas, pero no está claro el papel de las basidiosporas en la epidemiología del cancro del tallo y la costra negra en la papa (Ogoshi, 1987). Se cree que los esclerocios de *R. solani* (es decir, estructuras resistentes) son las estructuras responsables de la dispersión a larga distancia (Das et al., 2014).

En cuanto al ciclo de vida de *R. solani* en papa, la producción de esporas asexuales no se observa en *R. solani*. Los esclerocios formados al final de la temporada de cultivo, permiten que el hongo se mantenga durante el invierno. El hongo también puede sobrevivir en los tubérculos infestados que quedan en el suelo y restos vegetales. Durante la primavera, las plantas de papa de cualquier etapa pueden infectarse por micelios del patógeno que se disemina bajo tierra de planta a planta (García et al., 2006).

8 Estado del arte

8.1 Caracterización de los grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani*

Debido a la complejidad que presentan los grupos de anastomosis (AG), estos pueden llegar a ser considerados como poblaciones genéticamente distintas (McCabe et al., 1999; Ogoshi, 1987). Por la importancia que representa la independencia genética de los AG, esta ya ha sido comprobada mediante análisis bioquímicos y moleculares (Sneh et al., 1991; Vilgalys & González, 1990).

Debido a la agresividad que mostró la enfermedad de rizoctoniasis en campos de cultivo de Venezuela, el estudio de Cedeño y colaboradores (2001) se enfocó en la identificación y virulencia de los grupos de anastomosis presentes en la región, encontrando los grupos AG-3 y AG-2-1, de los cuales el AG-3 presentó mayor virulencia. El estudio de Woodhall, Lees, Edwards y Jenkinson (2007) identificó la presencia de los grupos AG-3, AG-2-1 y AG-5, añadiendo que existe una amplia diversidad dentro del AG-2 por la variación en la longitud del espaciador intergénico (IGS1).

La presencia de los grupos AG-2-1 y AG-3 también fueron reportados por Escalona y colaboradores (2011). Mediante el análisis de las secuencias de la región rDNA-ITS el estudio de Das y colaboradores (2013) identificaron la presencia de los grupos de anastomosis AG-3PT, AG-2-1 y AG-5. Para este caso, los autores reportaron que las cepas del grupo AG-2-1 fueron consistentemente más agresivos que los grupos AG-3PT.

Tras una evaluación de 148 muestras (Cao et al., 2019) reportan la presencia de los grupos de anamostosis AG-3, AG-1-1B y AG-2 en Mongolia, indicando la dispersión mundial de varios de estos grupos en zonas de producción de papa. En Idaho se ha reportado por primera vez la presencia del grupo AG-2-1 (Murdock et al., 2019). En Brasil se ha realizado el primer reporte de la composición de la población de *R. solani*, identificando cinco grupos distintos de anamostosis, siendo el grupo AG-4 HGI significativamente más agresivo que los demás en el ataque sobre el cultivo de papa (Inokuti et al., 2018).

8.2 Manejo de la enfermedad a partir del control biológico

En el control de patógenos, a través de estrategias biológicas, el hongo *Trichoderma* es uno de los principales biofungicidas usados en la actualidad (Vinale et al., 2008). Al parecer, este hongo micoparásito debe ser aislado a partir del sistema en el cual será

utilizado ya que existen aspectos como la adaptación a factores edáficos, biológicos y ambientales, que tendrán un efecto positivo en la sobrevivencia y el eficacia para el control biológico (Anees et al., 2010).

Bajo este supuesto, el estudio de Hoyos, Galvis y Rodríguez (2012) evaluaron el efecto de cepas nativas de *Trichoderma spp* para el control de *R. solani*, obteniendo resultados positivos, concluyendo que si es recomendable tener en cuenta el factor de especies nativas en el control biológico. Otro estudio se enfocó en la acción inhibitoria de *Trichoderma harzianum* sobre *R. solani*, en el cultivo de tomate, reportando que *T. harzianum* fue efectivo en la inhibición del desarrollo de micelio del patógeno. Este mismo efecto también se alcanzó con *Pseudomonas fluorescens* (Rajendraprasad et al., 2017).

Ruocco y colaboradores (2009) reportan que el éxito de las especies de *Trichoderma* en el biocontrol se debe a la resistencia o tolerancia a sustancias tóxicas, como antibióticos producidos por las cepas mismas o por el fitopatógeno y resistencia al estrés químico. Estas condiciones han sido asociadas a la presencia del gen Taabc 2. Por otra parte, un estudio realizado en Colombia, evaluó el efecto de dos especies de *Trichoderma* como bioplaguicidas para el control de *R. solani*, concluyendo que estos bioproductos, cuando son aplicados a la semilla, no solo protegen el tubérculo durante el almacenamiento, sino que tienen un efecto positivo de protección en el desarrollo del cultivo ante *R. solani* (Santos et al., 2011).

Se ha remarcado sobre el hecho que las bondades como agente de control, dependen más de las cepas de *Trichoderma*, que de la especie, pues estas pueden presentar diferencias en sus modos de acción, aún perteneciendo a la misma especie. Por tanto, es necesario efectuar una correcta selección de los aislamientos respecto a sus orígenes y ambientes para lograr resultados consistentes en campo (Nora et al., 2011).

La acción parasitaria de *T. virens* sobre esclerosios de *R. solani*, demostró que este es capaz de parasitar dichas estructuras, llegando a colonizar a nivel intracelular el tejido del esclerocio, indicando así, que esta es una especie a tomar en cuenta para el control de esclerosios (Liu et al., 2009). En la revisión realizada por Abbas, Jiang y Fu (2017) se resalta sobre las ventajas del uso de *Trichoderma spp* como agente de biocontrol contra *Rhizoctonia solani* por su efecto de confrontación directa con el patógeno, a través del parasitismo, competencia y la inducción de mecanismos de defensa en las plantas. Debido a la complicación en el control de los esclerosios desarrollados por *R. solani*, el estudio

Demirci, Dane y Eken (2011) se enfocó en la evaluación de una amplia variedad de hongos micoparásitos para el control de estas estructuras de resistencia del hongo, encontrando que los aislados de *T. harzianum* fueron efectivos en dicho control.

9 Objetivos

General

1. Evaluar el efecto de virulencia de los diferentes grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* presentes en las principales zonas de producción del cultivo de papa de la región del altiplano occidental de Guatemala.
2. Evaluar el potencial de diversidad genética de cepas nativas de *Trichoderma harzianum* y *T. viridae*, como agentes de control biológico, ante los grupos de anastomosis de *R. solani*.

Específicos

1. Identificar los grupos de anastomosis de *R. solani* presentes en las principales zonas productoras de papa del altiplano occidental de Guatemala.
2. Determinar la virulencia de los grupos de anastomosis de *R. solani* identificados, sobre 5 variedades de papa comercializadas en Guatemala.
3. Describir la estructura genética de las poblaciones de *Trichoderma harzianum* y *T. viridae* aisladas de las principales zonas productoras de papa del altiplano occidental.
4. Determinar el grupo filogenético de *Trichoderma harzianum* y *T. viridae* más efectivo para el control biológico de cada grupo de anastomosis de *R. solani*.

10 Hipótesis

En las zonas productoras de papa del altiplano occidental, estarán presentes al menos los grupos de anastomosis AG 3 y AG 2-1 de *R. solani*, los cuales podrán ser controlados por las cepas nativas de *T. harzianum* y *T. viride*.

11 Materiales y métodos

11.1 Enfoque y tipo de investigación

La presente investigación presenta un enfoque cuantitativo y con un alcance exploratorio, la cual tiene como finalidad la identificación de los diferentes grupos de anastomosis del hongo *R. solani*, así como la descripción de la diversidad genética de las poblaciones nativas de los hongos *T. harzianum* y *T. viridae*. Una vez realizado el análisis de identificación molecular, la investigación también tiene un alcance explicativo al describir la estructura genética poblacional de los hongos con potencial de control biológico y el efecto de los grupos filogenéticos de estos sobre los grupos de anastomosis de *R. solani*.

11.2 Recolección de información

Para el año 2015, la distribución de la producción de papa, por departamentos, se encontraba distribuida entre Huehuetenango 32%, Quetzaltenango 23%, San Marcos 21%, Guatemala 6%, Sololá 4% y el resto de departamentos 14% abarcando un total de 30,000 manzanas y una producción de 11,872,600 quintales, generando 12,793 empleos permanentes (Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación, 2016). Los primeros tres departamentos listados abarcan el 76% de la producción, por lo cual el estudio se centró en dichos departamentos.

De cada departamento se seleccionaron 5 parcelas con reportes rizoctoniasis. Dicha información fue proporcionada por la Federación Agrícola de Cooperativas de Guatemala y la Asociación de Organizaciones de los Cuchumatanes, quien cuenta con registros precisos del estado de las plantaciones de sus asociados. En cada parcela se tomó un máximo de 5 muestras de tejido foliar tallos y tubérculos. Cada muestra estuvo compuesta de 5 hojas y porciones de tallo afectados por la enfermedad, ambos colectados de una planta individual.

En las mismas parcelas, se tomó una muestra compuesta de suelo para el aislamiento de *T. harzianum* y *T. viridae*. Para la obtención de las muestras en los puntos de sub-muestreo se utilizó una pala y se tomó el suelo de los primeros 0.20 m de profundidad. Posteriormente, se tomó una porción equivalente de 1/10 de kg y se colocó en una bolsa plástica. El suelo obtenido de las sub-muestras se mezcló para obtener una muestra compuesta de 1 Kg aproximadamente. Las muestras fueron almacenadas en

bolsas plásticas individuales y debidamente identificadas con coordenadas geográficas. Estas fueron trasladadas hacia el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía para su procesamiento.

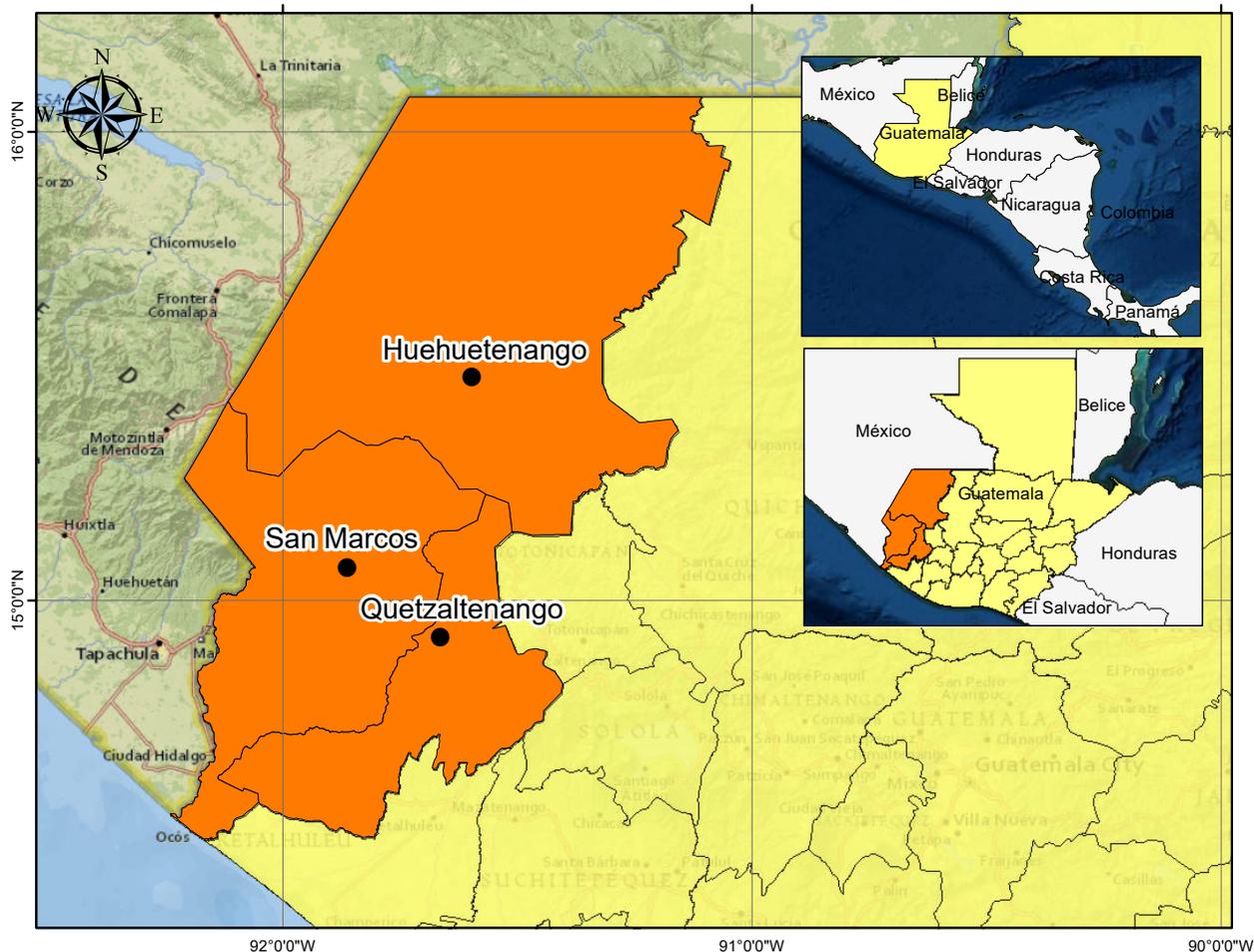


Figura 1. Mapa de ubicación de las zonas de estudio a partir de las cuales se aisló *Rhizoctonia solani* para las pruebas de identificación de grupos de anastomosis, ensayos de control biológico y resistencia de genotipos comerciales de papa.

11.3 Técnicas e instrumentos

Aislamiento de Rhizoctonia solani

El material sintomático de las plantas colectadas en campo fue sometido a un proceso de desinfección el cual consistió de un lavado con agua destilada estéril y desinfectado con hipoclorito de sodio al 1% durante 1 min; luego se lavó con agua destilada estéril, y se colocó en papel absorbente estéril para su secado. Con un bisturí esterilizado y bajo cámara de flujo laminar, se cortaron secciones de tallos y hojas (2-4

mm²) a partir de la zona de avance de la lesión. Luego, con una aguja de disección, se colocaron cuatro cortes en cajas de Petri de 9 cm de diámetro con el medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) suplementado con el antibiótico sulfato de estreptomicina a una concentración de 50 mg·L⁻¹, para disminuir el crecimiento de bacterias. Las cajas de Petri se incubaron en condiciones de luz natural durante 3 días hasta el desarrollo de las colonias con temperaturas alrededor de los 30 °C. Este protocolo fue descrito por (Gutiérrez, González y Salih (2006) reportando resultados positivos. Las colonias con características típicas de *Rhizoctonia* fueron transferidas a cajas de Petri con PDA, para obtener cultivos puros del hongo y llevar a cabo las pruebas de patogenicidad y determinación de los grupos de anastomosis de *R. solani*.

Aislamiento de *Trichoderma harzianum* y *T. viride*

Debido a la gran cantidad de microorganismos provenientes en las muestras de suelo, se optó por utilizar medios selectivos para cada una de las especies y posteriormente se realizó una confirmación a través de la amplificación de regiones específicas de ADN. El aislamiento fue realizado por medio del método de diluciones seriadas, para lo cual se tomaron 1g de suelo y se colocaron en 9 ml de agua destilada estéril obteniendo así una dilución 10⁻¹.

Luego se tomó 1 ml de esta dilución y se diluyó en un tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril y así sucesivamente hasta llegar a la dilución 10⁻⁵ a partir de la cual se realizó la siembra en medio selectivo, agregando 20 µl por cada placa de petri (Acevedo et al., 2014). Para el aislamiento de ambas especie de *Trichoderma*, se utilizó el medio TSM (Trichoderma Selective Medium) suplementado con Cloranfenicol (50 ug/mL) y rosa bengala 0.15 g/L (Attitalla et al., 2012). Las colonias con características típicas de *Trichoderma spp* fueron transferidas a cajas de Petri con PDA, para obtener cultivos puros.

Extracción de ADN

A partir de los cultivos puros obtenidos en la fase previa para *R. solani* y ambas especies de *Trichoderma* se realizó el aislamiento y extracción del ADN genómico de los aislados empleando el DNeasy UltraClean microbial Kit (QUIAGEN), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante.

Confirmación de las especies de *Trichoderma* mediante PCR específico

Para realizar la identificación *T. harzianum* y *T. viride* se realizó una amplificación específica de ADN mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR (Mullis, 1990). Para el caso de *Trichoderma harzianum*, se emplearon los cebadores específicos THITS-F2 (5'CGGGTTTTTTATAATCTGAGCC 3') y THITS-R3 (5'CATT CAGAAGTTGGGTG 3') siguiendo el protocolo de amplificación descrito por Miyazaki, Tsuchiya y Okuda (2009). Para el caso de *T. viride* se utilizaron los cebadores específicos TVF (3'CTGTCTGAGATGTTGACCTCGGA 5') y TVR (5'TAACACTCCTGGAGGAGCCACGTT 3') siguiendo el protocolo descrito por Srivastava y colaboradores (2014).

Determinación de los grupos de anastomosis de *R. solani*

Para llevar a cabo esta caracterización, se tomarán las muestras de ADN preparadas en el inciso anterior y se realizará una amplificación específica por PCR. Para la identificación se utilizaron los cebadores AG-3 PT-F/ AG-3 PT-R (Misawa, 2015); AG-4 HG-II-F/AG-4 HG-I-II-R (Kuninaga, 2003) y AG-5/ ThanaCera-R (Arakawa & Inagaki, 2014) los cuales son específicos de los grupos de anastomosis AG-3 PT, AG4-HGII y AG-5 de *R. solani*, respectivamente.

Análisis de diversidad genética de las especies de *Trichoderma*

Para la caracterización molecular de *T. harzianum* y *T. viride* se utilizó el marcador molecular AFLP. A partir de las muestras positivas mediante PCR para *T. harzianum* y *T. viride*, se desarrolló la siguiente metodología para cada especie: se utilizó ADN genómico a una concentración de 10 ng/μL, el cual fue digerido con las enzimas de restricción EcoR1/ Mse1 y se incubó por 2 h a 37 °C y después a 70 °C por 15 min para desactivar las enzimas de restricción. La ligación de los adaptadores se llevó a cabo con los reactivos del kit AFLP[®] Analysis Sistem for Microorganism y se incubó durante 2 h a 20 °C. Seguidamente se realizó una preamplificación con la reacción en cadena de la polimerasa; el programa empleado en el termociclador fue el siguiente: 94 °C por 30 s, 56 °C por 60 s, 72 °C por 60 s, por 20 ciclos. Los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 2%. Se hizo una amplificación selectiva con los cebadores M-A + E-C del kit los cuales produjeron mayor polimorfismo.

Los productos de la PCR se visualizaron en un gel de acrilamida al 5% para poder observar las bandas amplificadas. La tinción del gel se realizó con nitrato de plata mediante el siguiente procedimiento: inmersión en solución fijadora de ácido acético glacial 10% v/v durante 35 min, agua destilada durante 20 min, solución de tinción (nitrato de plata 0.15% p/v, formaldehído 0.15% v/v) por 40 min, agua destilada por 10 s, solución de revelado de 5 a 6 min según la aparición de las bandas (carbonato de sodio 6% p/v, formaldehído 0.3% v/v, tiosulfato de sodio 5 ppm), solución fijadora para detener el proceso durante aproximadamente 5 min, finalmente se lavó en agua destilada. Se dejó secar por 2 días y posteriormente se realizó la lectura del perfil de las bandas mediante el análisis de las fotografías del gel utilizando el programa PyElph (Pavel & Vasile, 2012).

Ensayo para la evaluación de la virulencia de los grupos de anamostosis de *R. solani*

Para la evaluación de virulencia de los aislados obtenidos, se sembraron tubérculos de papa de las variedades Loman, Atzimba, Atlantis, Tollocan e Icta Frit. Los tubérculos fueron sembrados en macetas plásticas conteniendo una mezcla de peatmoss y cáscara de arroz (2:1) previamente esterilizada mediante autoclave. Posterior a la siembra, se realizó la inoculación con los aislados de *R. solani* obtenidos y caracterizados por grupos de anastomosis en la fase previa. Para la inoculación se tomaron como base el protocolo reportado por Escalona, Rodríguez y Hernández (2012). Se tomaron discos de micelio de 6 mm de diámetro de los aislados de 5 días de edad crecidos en PDA.

Estos fueron directamente colocados en el agujero donde se hallaban sembrados los tubérculos y fueron cubiertos con una capa de 2 cm de la mezcla peatmoss y cáscara de arroz. Las macetas fueron incubadas a temperatura ambiente. A los 45 días después de la siembra e inoculación se examinaron las plantas y se evaluó la presencia y severidad. La virulencia fue estimada mediante la medición de la severidad inducida en las plantas, utilizando para ello la escala de índices de severidad propuesta por Yang, Zhao, Gou y Wu (2014) lesiones en la base de los tallos de la plantas obtenidas, también se midió su longitud y los valores fueron transformados a escala de severidad.

El experimento constó de dos factores (a) variedades de papa (5 variedades) y (b) aislados de *R. solani* identificados por grupos de anastomosis (3 aislados). Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA). Se realizaron 5 repeticiones y cada unidad

experimental estuvo representada por una maceta con una planta para un total de 75 unidades experimentales.

Ensayo de capacidad antagónica *T. harzianum* y *T. viride* sobre *R. solani*

Para llevar a cabo la evaluación de la capacidad antagónica de los aislamientos de *T. harzianum* contra *R. solani* se realizaron pruebas de cultivo dual reportadas en estudios previos (Reyes et al., 2008; Rodríguez & Flores, 2018). Para ello, se sembrarán, sobre la superficie de cajas de Petri con PDA, discos de 5 mm de diámetro colonizados con micelio de *T. harzianum* en un lado de la caja de Petri y otro disco de iguales dimensiones con micelio de *R. solani* será colocado en el otro extremo de la caja. El material fue incubado por 14 días a temperatura ambiente. La variable de respuesta fue el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) el cual se expresa como $PIC = PICR = [(C - T) / C] \times 100$ donde:

D1 = diámetro de las colonias de *R. solani* en PDA

D2 = diámetro de las colonias de *R. solani* en presencia de *Trichoderma* spp. en PDA.

Todas las cajas con los enfrentamientos se incubaron a 27 °C durante siete días. Las evaluaciones se realizaron mediante mediciones del radio de las colonias con el uso de un vernier hasta el séptimo día de incubación. El ensayo contempló dos factores (a) aislados de *R. solani* identificados por grupo de anastomosis (3 grupos) y (b) grupos filogenéticos de *T. harzianum* (3 grupos) y *T. viride* (3 grupos). Cada unidad experimental estuvo representada por una caja de Petri con la interacción *T. spp vs R. solani*. Se utilizaon 5 repeticiones para un total de 90 unidades experimentales en un DCA.

Ensayo de parasitismo de esclerocios de *R. solani* por *T. harzianum* y *T. viride*

Producción de esclerocios

Los aislados de *R. solani* empleados para la evaluación de virulencia fueron transferidos a un medio de cultivo MYA (malta 12 g/L, levadura 15 g/L, agar 5 g/L) y se incubaron a 25 C durante 21 días. Este método ha sido reportado para la formación de esclerocios de *R. solani* baja condiciones in vitro (Ritchie et al., 2012). De cada aislado se tomarán 5 esclerocios y serán colocados en cajas de Petri con papel toalla húmedo. Luego se tomaron 20 uL de una suspensión de esporas, a una concentración 10^9 , y fueron aplicados directamente sobre los esclerocios. Las cajas de Petri serán incubadas por 7 días

a temperatura ambiente. Posteriormente, se tomaron los quistes, se colocaron sobre un medio PDA y se incubaron por 48 horas a 26 C.

Pasado este periodo de tiempo, los esclerocios fueron evaluados con microscopio en busca de desarrollo de hifas. Aquellos esclerocios que formaron hifas fueron catalogados como viables y los que no desarrollen dichas estructuras, se catalogaron como inviables. La variable de respuesta fue el porcentaje de esclerocios viables. El ensayo estuvo compuesto de tres factores (a) esclerocios de *R. solani* identificados por grupo de anastomosis (3 grupos) (b) grupos filogenéticos de *T. harzianum* (3 grupos) y (c) grupos filogenéticos de *T. viride* (3 grupos). Se realizaron 5 repeticiones. Cada unidad experimental estuvo representada por una caja de Petri con la interacción hongo biofungicida vs *R. solani* para un total de 90 unidades experimentales.

11.4 Procesamiento y análisis de la información

Con el perfil de bandas obtenido con el marcador molecular se generó una matriz binaria de presencia (1) ausencia (0) para cada uno de los loci amplificados. La matriz se exportó al programa Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis Past v3.18 (Ryan et al., 2001) para generar una matriz de distancias genéticas con el índice de Dice y posterior análisis con el algoritmo *Neighbor-Joining* (NJ) (Saitou & Nei, 1987) generando un dendrograma en formato Nexus, el cual fue exportado hacia el programa FigTree v1.4.3 (Rambaut, 2008) para una mejor visualización del dendrograma de tipo radial e identificación de los grupos filogenéticos de *T. harzianum* y *T. viride*.

El experimento de la evaluación del antagonismo in vitro se desarrolló bajo un diseño completamente al azar con 9 tratamientos y 5 repeticiones por tratamiento para cada una de las dos especies de *Trichoderma*. Cada unidad experimental estuvo representada por una caja de Petri con medio PDA sobre el cual se realizaron las mediciones del radio de las colonias del antagonista y el patógeno. Con los datos del PICR se realizaron las pruebas de Shapiro y Bartlett para determinar la normalidad de los residuos y homogeneidad de varianzas, respectivamente. Posteriormente, se realizó la prueba de la t de Student de dos muestras independientes con una significancia del 5%, así como el cálculo del tamaño del efecto con el valor de la d de Cohen, para comparar la efectividad entre *T. harzianum* y *T. viride* mediante los valores de PICR.

También se realizó un análisis de varianza (ANOVA) bifactorial para determinar la efectividad de cada grupo de cada grupo filogenético de ambas especies de *Trichoderma* al ser confrontado contra los grupos de anastomosis de *R. solani*. Posteriormente, se realizó un ANOVA tomando únicamente el factor de grupos de anastomosis y, por otra parte, el factor de grupos filogenéticos de ambas especies de *Trichoderma*. De esta forma se obtuvo mayor detalle del efecto de ambos factores sobre el PICR.

Los análisis de varianza se realizaron con un nivel de significancia del 5% y el cálculo del tamaño del efecto se hizo mediante el valor de eta cuadrado (η^2). Posteriormente, se realizaron pruebas de comparación por pares con la prueba de t de Student con 5% de significancia aplicando la corrección de Bonferroni. Las pruebas anteriormente descritas se realizaron en el programa R v3.6.3 con el paquete stats (R core Team, 2020) y agricolae (de Mendiburu, 2020). La visualización de los resultados de las pruebas de t de Student, análisis de varianza y comparaciones pareadas, se realizaron con el paquete ggstatsplot (Patil, 2018).

Para las pruebas de virulencia y parasitismo de esclerocios, se realizó un análisis de tablas de frecuencia mediante la prueba de Chi cuadrado con un nivel de significancia del 5%. Para las pruebas estadísticamente significativas se realizó un posterior análisis de los residuos estandarizados para identificar las interacciones con mayor aporte a la desviación entre los valores observados y esperados. Para esto se empleó el programa estadístico R v3.6.3. y los paquetes stats (R core Team, 2020) y agricolae (de Mendiburu, 2020).

12 Vinculación, difusión y divulgación

Se contó con la vinculación del Centro Universitario de NorOccidente de la Universidad de San Carlos de Guatemala (muestreo en campo y capacitación en técnicas moleculares), con la Federación de Cooperativas Agrícolas de Guatemala bajo la línea el Consorcio Nuestra Tierra, la Asociación de Organizaciones de los Cuchumatanes (información de zonas afectadas y muestreo en campo) y la Czech University of Life Sciences, Prague de República Checa.

13 Productos, hallazgos, conocimientos o resultados

13.1 Identificar los grupos de anastomosis de *R. solani* presentes en las principales zonas productoras de papa del altiplano occidental de Guatemala.

A partir de las muestras colectadas, se obtuvo un total de 78 aislados de *R. solani*, de los cuales se identificó molecularmente la presencia de tres grupos distintos de anastomosis que corresponden al AG-3 PT, AG-4 HG-II y AG-5 con tamaños de los productos amplificadas de 480, 420 y 350 pb respectivamente (Figura 2). Los valores de incidencia en porcentaje fueron de 47.44, 23.07 y 29.49 correspondiente al AG-3 PT, AG-4 HG-II y AG-5 (Tabla 1). Las PCRs para la identificación de los grupos AG-2-1 y AG-6 fueron negativas para todas las muestras analizadas. Los tres grupos de anastomosis que resultaron positivos, fueron identificados en todos los departamentos donde se colectaron las muestras, evidenciando la movilización de dichos grupos en las distintas áreas de cultivo del altiplano occidental del país. Se seleccionaron los aislados Rs_7, Rs_23 y Rs_54 como representantes de los grupos de anastomosis AG_3, AG_4 y AG_5, respectivamente.

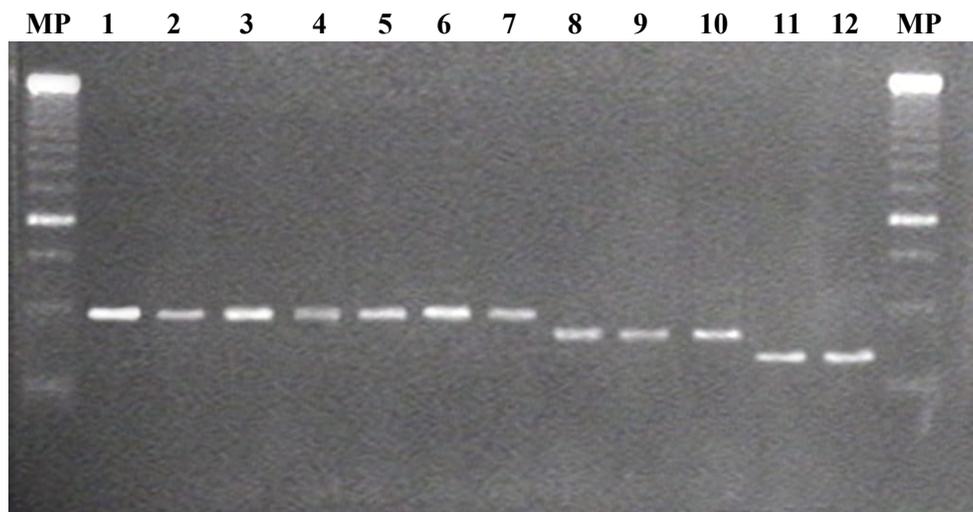


Figura 2. Productos amplificados por PCR con los cebadores AG-3 PT-F/ AG-3 PT-R; AG-4 HG-II-F/AG-4 HG-I-II-R y AG-5/ ThanaCera-R para la identificación de los grupos de anastomosis AG-3 PT, AG4-HGII y AG-5 de *R. solani*, respectivamente. Carriles 1-7 muestras positivas para el grupo AG-3 PT (480 pb). Carriles 8-10 muestras positivas para el grupo AG4-HGII (420 pb). Carriles 11 y 12 muestras positivas para el grupo AG-5 (350 pb). MP = marcador de peso molecular 250 pb invitrogen®.

Tabla 1. Resumen de los cebadores utilizados para la identificación de los grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani*. Se muestra el número de aislados positivos y el porcentaje de incidencia para cada grupo de anastomosis del hongo.

AG, subgrupo	Cebadores	Secuencia (5' - 3')	Temperatura de alineamiento (C)	Tamaño del amplicón	Referencia	No. aislados positivos	Porcentaje de incidencia
AG-2-1	P21F	CAAAGGCAATRGTTATTGGAC	60	480	(Carling et al., 2002)	0	0
	P21R	CCTGATTTGAGATCAGATCATAAAG					
AG-3 PT	AG-3 PT-F	CTGAACGCCTCTAAGTCAGAA	50	480	(Misawa, 2015)	36	46.15
	AG-3 PT-R	CTTGATTAATGCAACTCCC					
AG-4 HG-II	AG-4 HG-II-F	GGACCTTCTACTCCCCCT	55	420	(Kuninaga, 2003)	11	14.10
	AG-4 HG-I-II-R	ACAGGGTGCCTCAGCGA					
	AG-5	GGTTGTAGCTGGCTCATGAA					
AG-5	ThanaCera-R	TGATACTCAAACAGGCATGC	55	350	(Arakawa & Inagaki, 2014)	14	17.96
AG-6	AG-6 F	CCCTCTGTCTACTCAATCCA	55	230	(Arakawa & Inagaki, 2014)	0	0
	ThanaCera-R	TGATACTCAAACAGGCATGC					
Aislados no asignadas						17	21.79
Total						78	100

13.2 Determinar la virulencia de los grupos de anastomosis de *R. solani* identificados, sobre 5 variedades de papa comercializadas en Guatemala.

Luego de la confirmación de los grupos de anastomosis AG_3, AG_4 y AG_5 se identificó que las cinco variedades de papa evaluadas fueron igualmente afectadas por dichos grupos. Las pruebas de severidad demostraron que no existió diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.335$) en el índice de severidad entre las cinco variedades evaluadas (Figura 3). Al profundizar en el detalle del efecto de severidad causado por cada uno de los grupos de anastomosis, se identificó que si existió diferencia altamente significativa entre estos ($p < 0.001$). Se identificó que los mayores índices de severidad fueron causados por el AG_3, seguidos por el AG_4 y por último el AG_5 como se observa en la Figura 4.

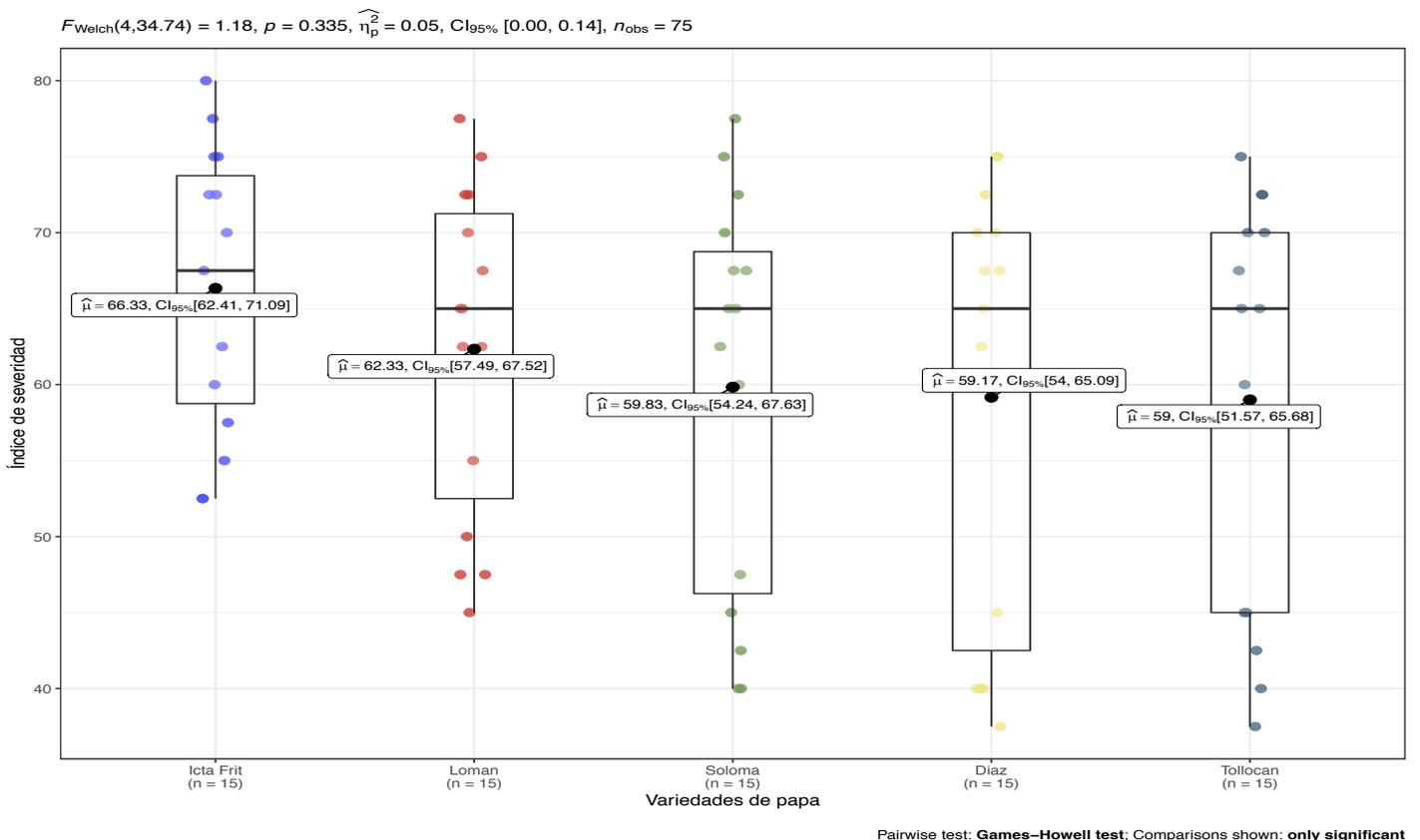


Figura 3. Diagrama de cajas del índice de severidad de ocasionado por *Rhizoctonia solani* sobre las variedades de papa evaluadas. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza.

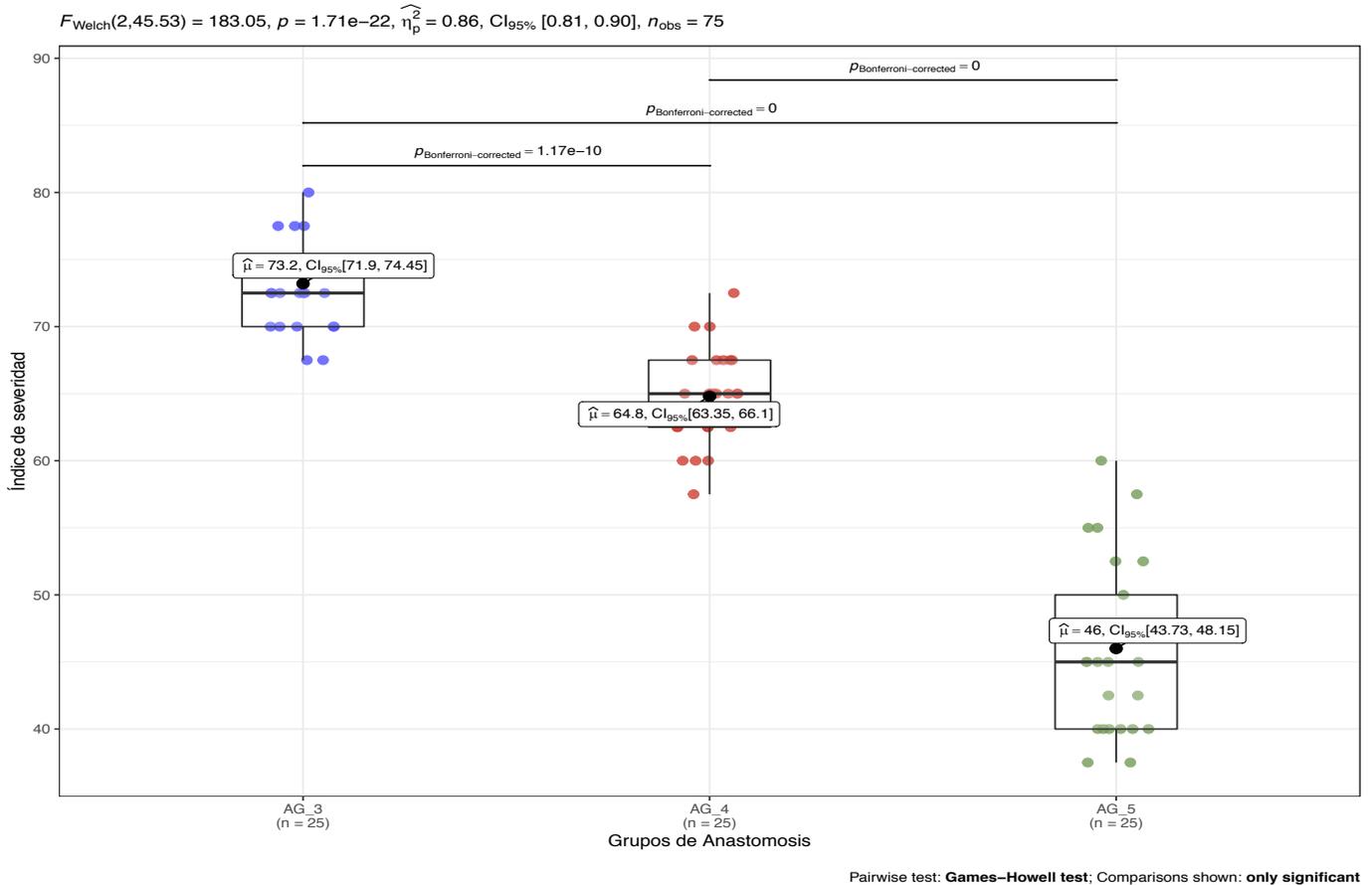


Figura 4. Diagrama de caja del comportamiento del índice de severidad en función de los tres grupos de anastomosis identificados en *Rhizoctonia solani*. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas $p < .05$.

Al detallar sobre el comportamiento de las variedades de papa en función del grupo de anastomosis de *R. solani* con el que fueron inoculadas, se identificó que para todos los casos de la interacción variedad*grupo de anastomosis existió diferencia significativa en el índice de severidad ($p < .001$). Para todos los casos de interacción, el AG_3 tuvo el mayor efecto en el índice de severidad, siendo así el más agresivo sin importar la variedad de papa sobre el cual se realizó el ensayo. Seguido se ubicó el AG_4 para todos los casos de evaluación, siendo éste estadísticamente diferente al AG_3. Finalmente, el AG_5 demostró siempre ser el grupo de anastomosis con menor índice de severidad para todas las variedades de papa, además de ser estadísticamente diferente a los otros dos grupos. El detalle de cada prueba se muestra en la Figura 5.

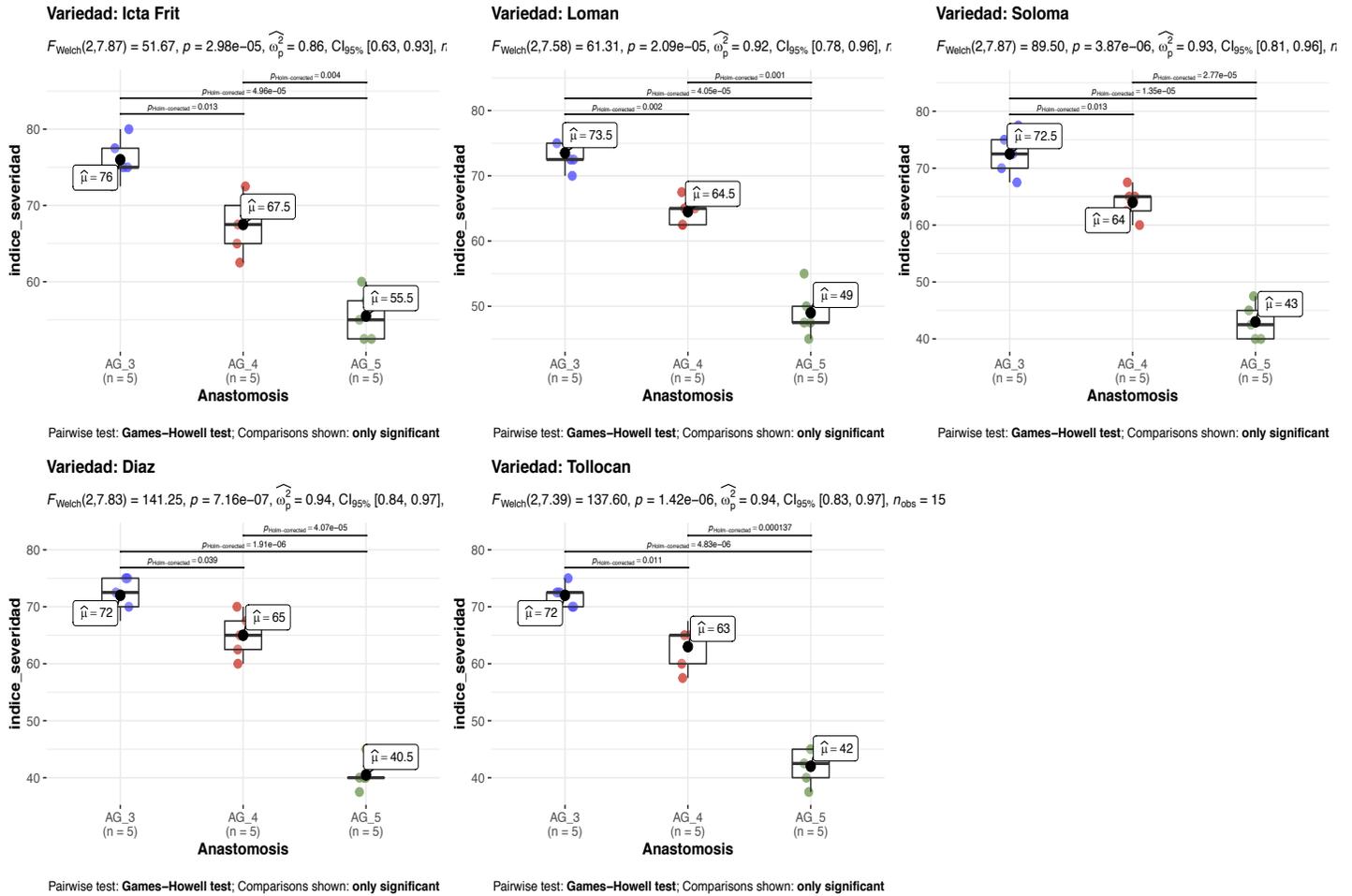


Figura 5. Diagrama de cajas del comportamiento del índice de severidad haciendo un agrupamiento por variedades de papa. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas $p < .05$.

Al explorar sobre el efecto directo de cada grupo de anastomosis sobre las variedades de papa, se observó que los AG_3 y AG_4 fueron igualmente virulentos para todas las variedades y a pesar de que la variedad Icta Frit fue siempre la afectada, las diferencias en los valores de índice de severidad con el resto de las variedades de papa evaluadas no fueron estadísticamente significativa ($p > .05$). Sin embargo, al examinar el AG_5 la diferencia entre el índice de severidad de cada variedad si mostró diferencia significativa ($p < .001$), siendo las variedades Icta Frit y Loman las más afectadas, mientras que las variedades Soloman, Diaz y Tollocan mostraron los valores de severidad

más bajos y por tanto se clasificaron en un grupo separado a las otras dos variedades. El detalle de cada prueba se muestra en la Figura 6.

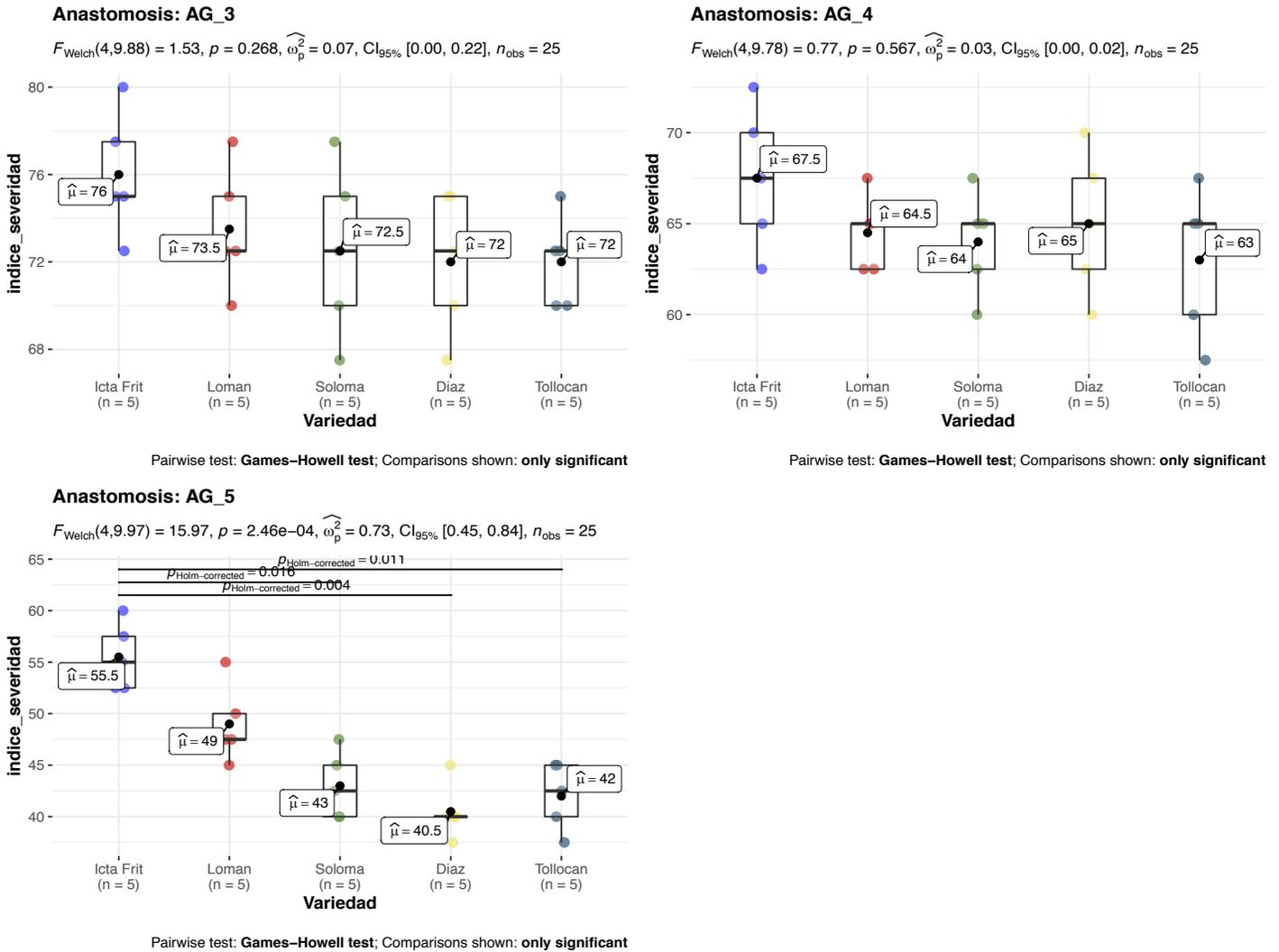


Figura 6. Diagrama de cajas del comportamiento del índice de severidad haciendo un agrupamiento por grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani*. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas $p < .05$.

Sobre la incidencia de plantas enfermas al ser inoculadas con los diferentes grupos de anastomosis de *R. solani*, la prueba de Chi cuadrado (Tabla 2.) no mostró diferencia significativa ($p = .9317$) entre la proporción de plantas enfermas de las cinco variedades evaluadas, por lo que todas las variedades fueron igualmente susceptibles al hongo

(Figura 7). Mediante el valor de los residuos estandarizados de la prueba de Chi cuadrado se estableció el umbral de valor absoluto de 2 para identificar las categorías que mostraron mayor influencia sobre la diferencia entre los valores observados y esperados. Para este caso, como era de esperar al no rechazar la hipótesis nula ($p = .9317$), ningún valor de residuo estandarizado estuvo fuera del umbral establecido.

Tabla 2. Resultados de la prueba de Chi cuadrado sobre la incidencia de plantas enfermas de las variedades de papa evaluadas.

Variedades de papa	Plantas enfermas	Plantas sanas	Proporción enfermas	Residuos estandarizados	
Loman	139	11	0.926	0.0694587	-0.069458
Icta Frit	141	9	0.940	0.7640461	-0.764046
Soloma	138	12	0.920	-0.277834	0.277834
Tollocan	137	13	0.913	-0.625128	0.625128
Diaz	139	11	0.926	0.069458	-0.069458
$\chi^2 = 0.84911$		Grados de libertad = 4		Valor $p = 0.9317$	

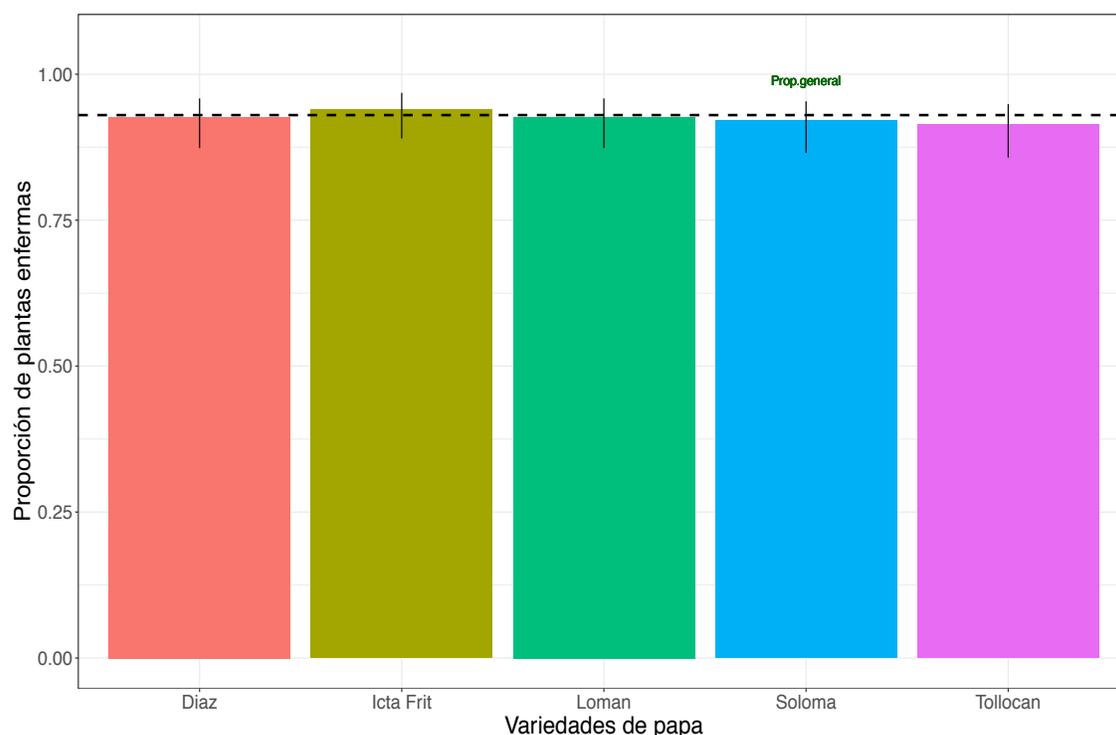


Figura 7. Incidencia de plantas enfermas por *Rhizoctonia solani* a nivel de variedades de papa. La proporción general de plantas enfermas se indica mediante la línea punteada.

En cuanto al efecto de cada grupo de anastomosis sobre la incidencia de la enfermedad a través de la proporción de plantas enfermas, la prueba de Chi cuadrado (Tabla 3) si demostró diferencia estadísticamente significativa ($p < .001$). Los grupos AG_3 y AG_4 estuvieron por encima de la proporción general de plantas enfermas, mientras que el AG_5 estuvo por debajo de dicha proporción. De tal forma, los grupos AG_3 y AG_4 causaron la mayor cantidad de plantas enfermas como se observa en la Figura 8. Mediante el valor de los residuos estandarizados de la prueba de Chi cuadrado se estableció el umbral de valor absoluto de 2 para identificar las categorías que mostraron mayor influencia sobre la diferencia entre los valores observados y esperados. De esta manera, tanto el AG_3 como el AG_4 hicieron un aporte significativo para tener valores por encima de lo esperado, mientras que el AG_5 hizo un aporte significativo al mostrar valores por debajo de lo esperado.

Tabla 3. Resultados de la prueba de Chi cuadrado sobre la incidencia de plantas enfermas por cada grupo de anastomosis de *Rhizoctonia solani*.

Grupo de anastomosis	Plantas enfermas	Plantas sanas	Proporción enfermas	Residuos estandarizados	
AG_3	243	7	0.972	2.749199	-2.749199
AG_4	241	9	0.964	2.105400	-2.105400
AG_5	210	30	0.875	-4.904907	4.904907

$\chi^2 = 24.195$ Grados de libertad = 2 Valor $p < 0.001$

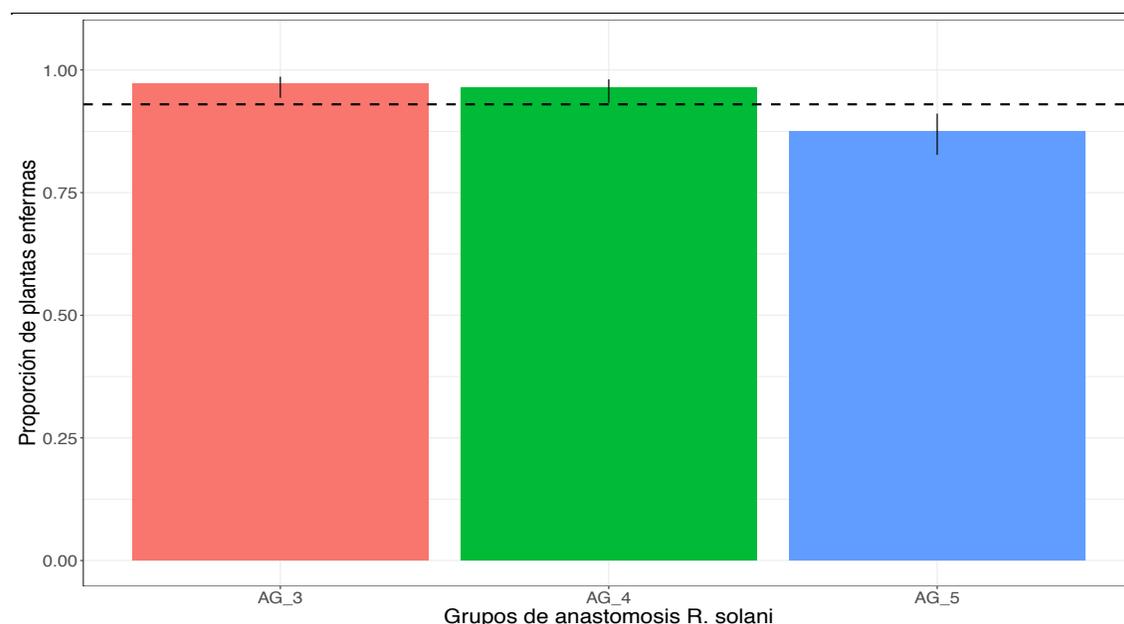


Figura 8. Incidencia de plantas enfermas por cada grupo de anastomosis de *Rhizoctonia solani*. La proporción general de plantas enfermas se indica mediante la línea punteada.

Sobre el efecto de cada grupo de anastomosis en cada una de las variedades de papa evaluadas, se observó que la prueba de Chi cuadrado mostró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$). Mediante el valor de los residuos estandarizados de la prueba de Chi cuadrado se estableció el umbral de valor absoluto de 2 para identificar las categorías que mostraron mayor influencia sobre la diferencia entre los valores observados y esperados. De esta manera, las categorías que mostraron valores por debajo de lo esperado fueron todas las interacción de las variedades de papa con el AG_5, lo cual concuerda con el hecho de que este grupo fue previamente catalogado como el menos agresivo. Los grupos AG_3 y AG_4, a pesar de no mostrar valores de residuos estandarizados fuera del umbral, siempre estuvieron por encima de los valores esperados, como se observa en la Figura 9.

Tabla 4. Resultados de la prueba de Chi cuadrado sobre la incidencia de plantas enfermas en la interacción de las variedades de papa y grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani*.

Variedad de papa	Grupo de Anastomosis	Plantas enfermas	Plantas sanas	Proporción enfermas	Residuos estandarizados	
Loman	AG_5	42	8	0.84	-2.3761445	2.3761445
	AG_3	49	1	0.98	1.5222175	-1.5222175
	AG_4	48	2	0.96	0.9653087	-0.9653087
Icta Frit	AG_5	44	6	0.88	-1.2623267	1.2623267
	AG_3	49	1	0.98	1.5222175	-1.5222175
	AG_4	48	2	0.96	0.9653087	-0.9653087
Soloma	AG_5	42	8	0.84	-2.3761445	2.3761445
	AG_3	48	2	0.96	0.9653087	-0.9653087
	AG_4	48	2	0.96	0.9653087	-0.9653087
Diaz	AG_5	40	10	0.80	-3.4899622	3.4899622
	AG_3	48	2	0.96	0.9653087	-0.9653087
	AG_4	49	1	0.98	1.5222175	-1.5222175
Tollocan	AG_5	42	8	0.84	-2.3761445	2.3761445
	AG_3	49	1	0.98	1.5222175	-1.5222175
	AG_4	48	2	0.96	0.9653087	-0.9653087
$\chi^2 = 42.53$		Grados de libertad = 14		Valor $p < 0.001$		

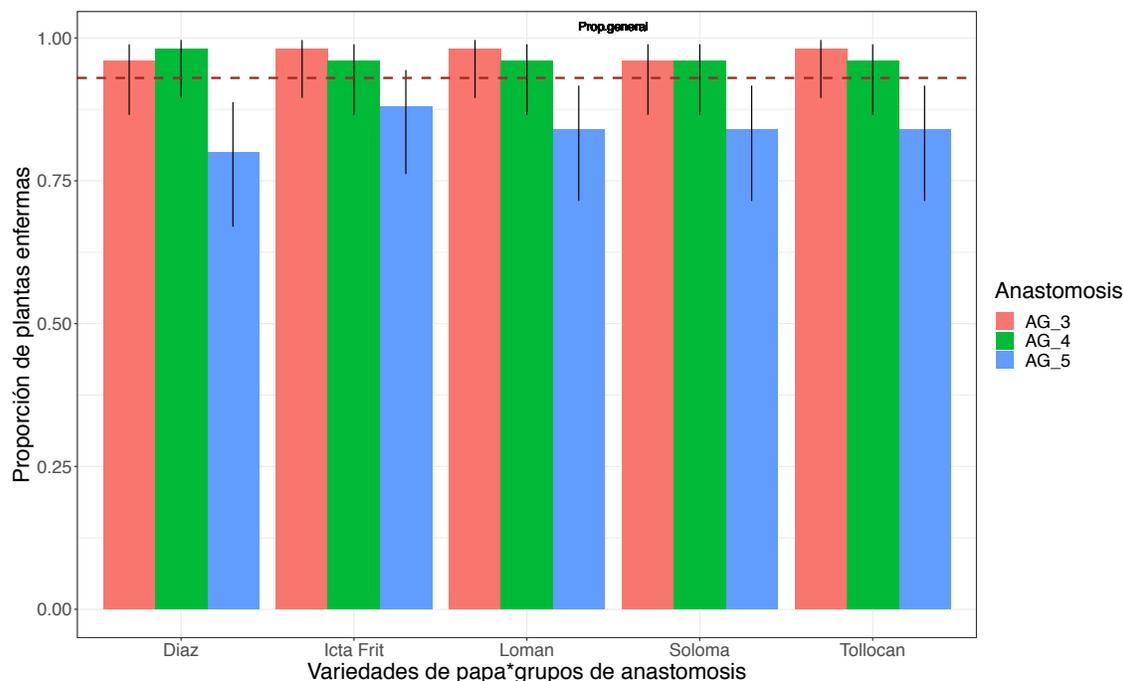


Figura 9. Indicencia de plantas enfermas en la interacción de las variedades de papa y grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani*.

13.3 Describir la estructura genética de las poblaciones de *Trichoderma harzianum* y *T. viridae* aisladas de las principales zonas productoras de papa del altiplano occidental.

A partir de los cultivos monospóricos de *Trichoderma* spp. se confirmó molecularmente la presencia de 25 aislados de *T. harzianum* y 29 aislados de *T. viride* con tamaños de los productos amplificadas de 395 y 330 pb respectivamente, como se observa en la Figura 10. El análisis con el marcador molecular para los 25 aislados de *T. harzianum* permitió identificar un alto grado de diversidad genética, así como la formación de tres grupos filogenéticos claramente constituídos en base al arreglo observado en el dendrograma de tipo radial (Figura 11a). De forma similar, los 29 aislados de *T. viride*, también mostraron una alta diversidad genética y un arreglo que permitió la identificación de tres grupos filogenéticos bien definidos como se observa en la Figura 11b. Para las pruebas posteriores, se escogieron los aislados de *T. harzianum* Th_15, Th_21 y Th_11 como representantes de los grupos filogenéticos 1, 2 y 3 respectivamente. Para el caso de *T. viride*, se seleccionaron los aislados Tv_2, Tv_12 y Tv_22 representantes de los grupos filogenéticos 1, 2 y 3, respectivamente.

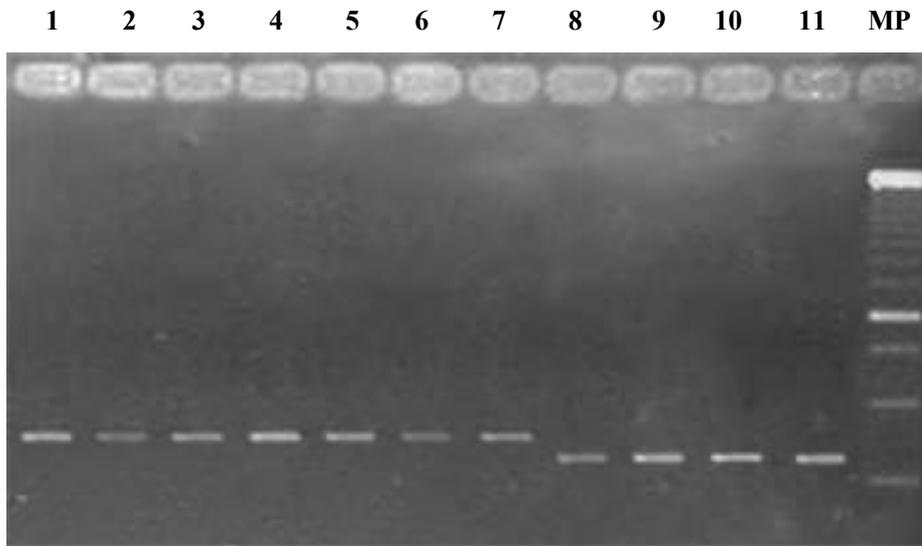


Figura 10. Productos amplificados por PCR con los cebadores THITS-F2/THITS-R3 y THITS-F1/THITS-R1 para la identificación de *T. harzianum* y *T. viride* respectivamente. Carriles 1-7 muestras positivas para *T. harzianum* (395 pb). Carriles 8-11 muestras positivas para *T. viride* (330 pb). MP = marcador de peso molecular 250 pb invitrogen®.

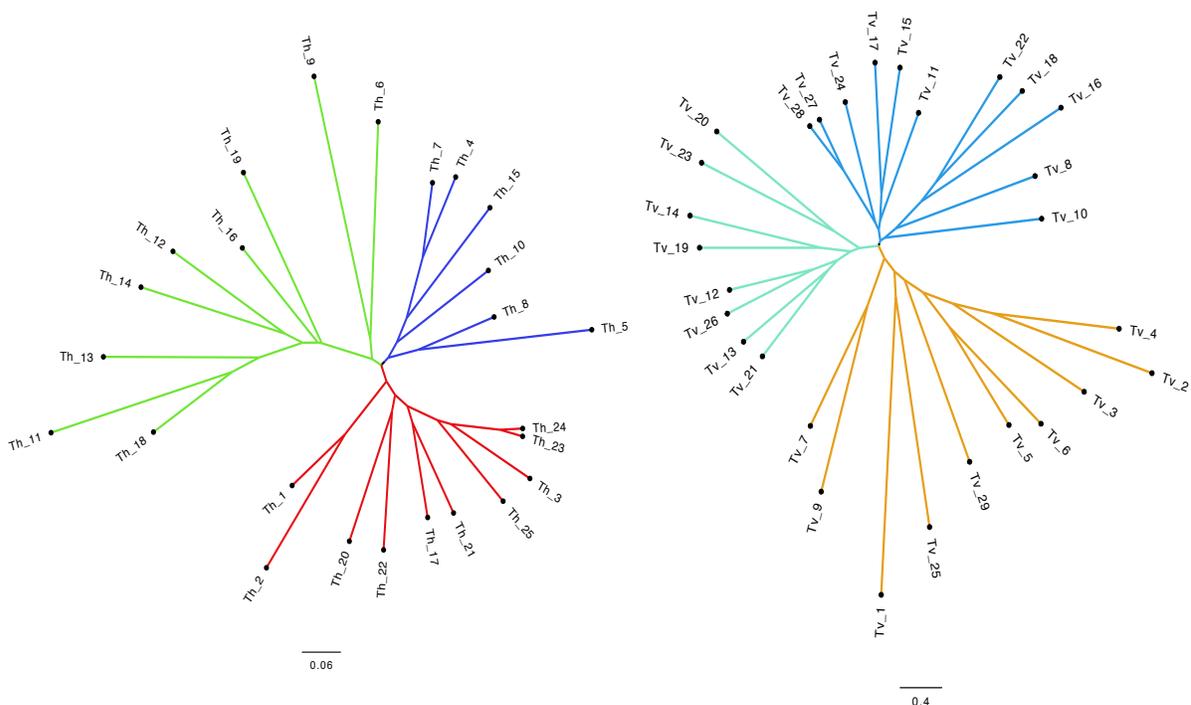


Figura 11. Dendrograma de tipo Neighbor-Joining (NJ) con arreglo radial generado a partir del marcador molecular *amplified fragment length polymorphism* (AFLP) que muestra la diversidad genética y grupos filogenéticos de a) 25 aislados de *T. harzianum* y b) 29 aislados de *T. viride*.

13.4 Determinar el grupo filogenético de *Trichoderma harzianum* y *T. viridae* más efectivo para el control biológico de cada grupo de anastomosis de *R. solani*.

En cuanto al ensayo de actividad antagonista in vitro para evaluar la eficiencia entre *T. harzianum* y *T. viride* para el control de *R. solani*, se determinó una media de PICR de 56.71 y 37.58 respectivamente. Mediante la prueba de t de Student, se identificó diferencia estadística altamente significativa entre ambas especies evaluadas con un $p < 0.001$ y un tamaño del efecto grande de $d = 4.41$. Se determinó que *T. harzianum* es la especie más efectiva como se observa en la Figura 12.

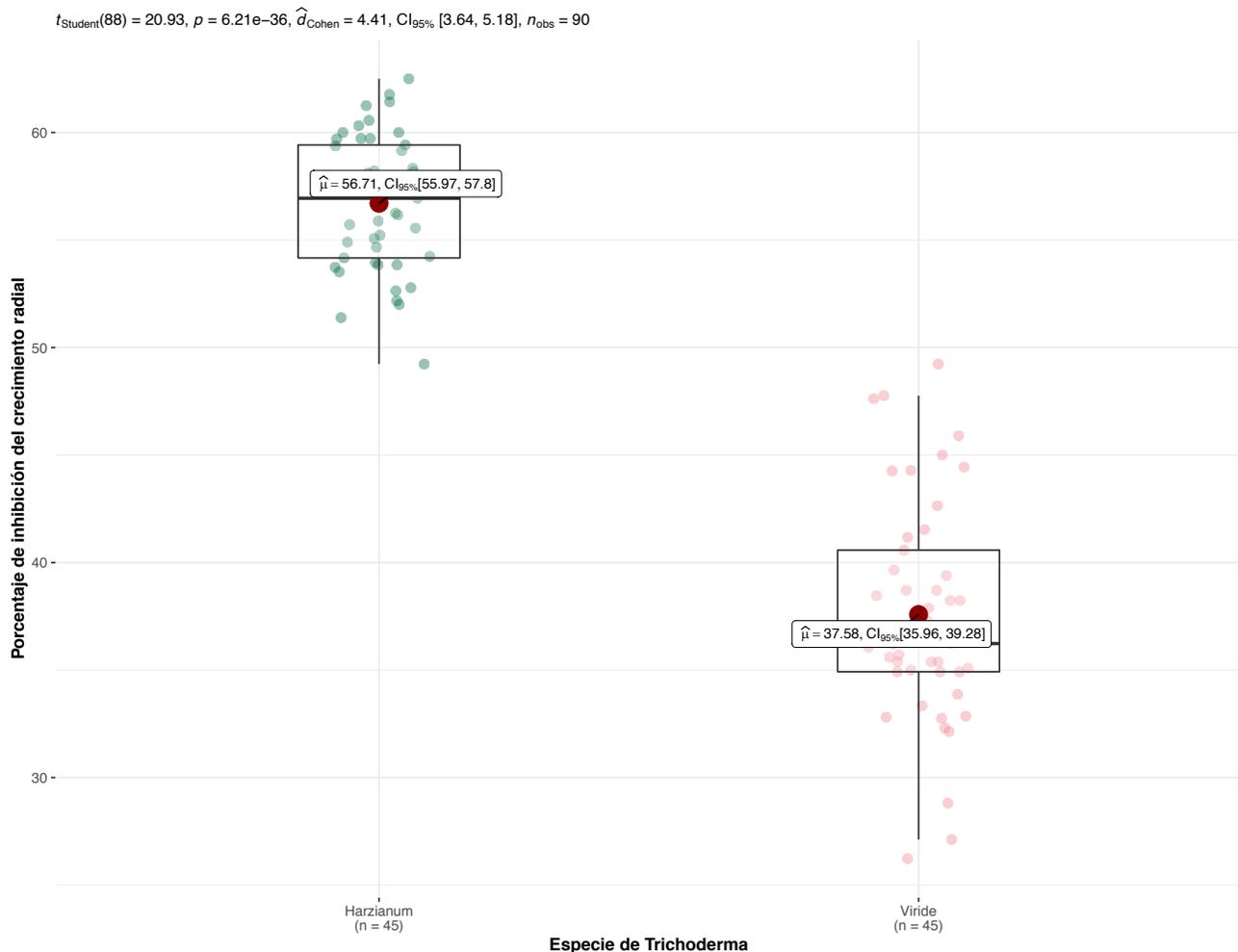


Figura 12. Diagrama de cajas de la capacidad antagonista de *T. harzianum* y *T. viride* sobre *R. solani*. Se muestra el detalle del resultado de la prueba de t de Student, así como el valor de la media de PICR e intervalo de confianza al 95% para ambas especies de *Trichoderma*.

Al realizar un exploración más detallada, mediante el análisis de varianza tomando en cuenta los grupos de anastomosis de *R. solani* y los grupos filogenéticos de *T. harzianum*, no se identificó diferencia estadísticamente significativa con un $p = .355$ como se observa en la Figura 13. Por esta situación, se asumió que los tres grupos filogenéticos de *T. harzianum* fueron igualmente efectivos a los tres grupos de anastomosis de *R. solani*. Al replicar este mismo análisis, pero con los grupos filogenéticos de *T. viride*, si se encontró diferencia estadísticamente significativa con $p < .001$ y un tamaño del efecto grande de $\eta^2 = .62$. El tratamiento más efectivo fue la interacción del grupo filogenético 3 al confrontarse con el grupo de anastomosis AG-5, mientras que, el menos efectivo se dio con la interacción del grupo filogenético 1 al confrontarse con el grupo de anastomosis 4 (AG-4 HG-II). El detalle de todas las comparaciones pareadas de medias estadísticamente significativas se observa en la Figura 14.

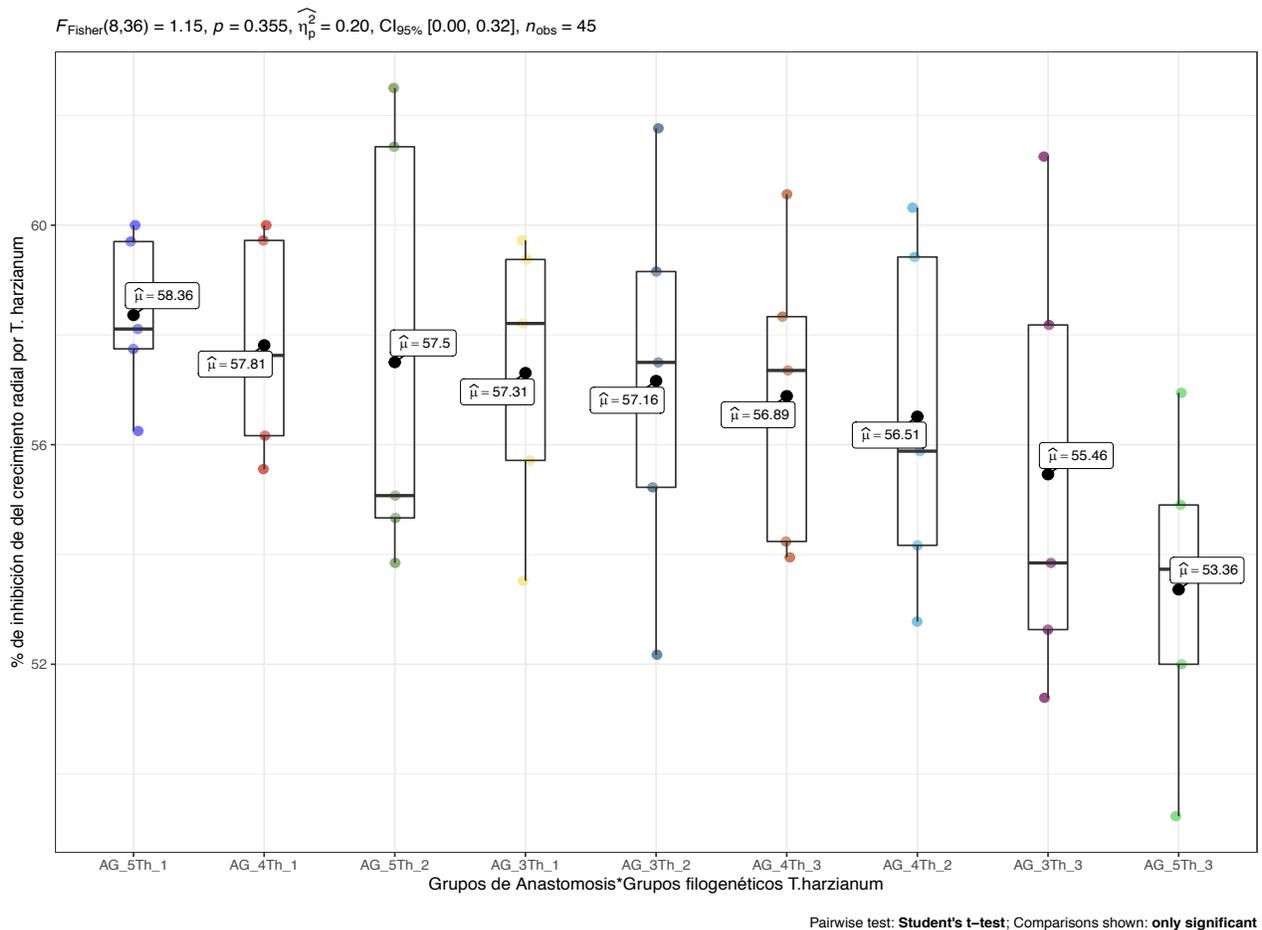
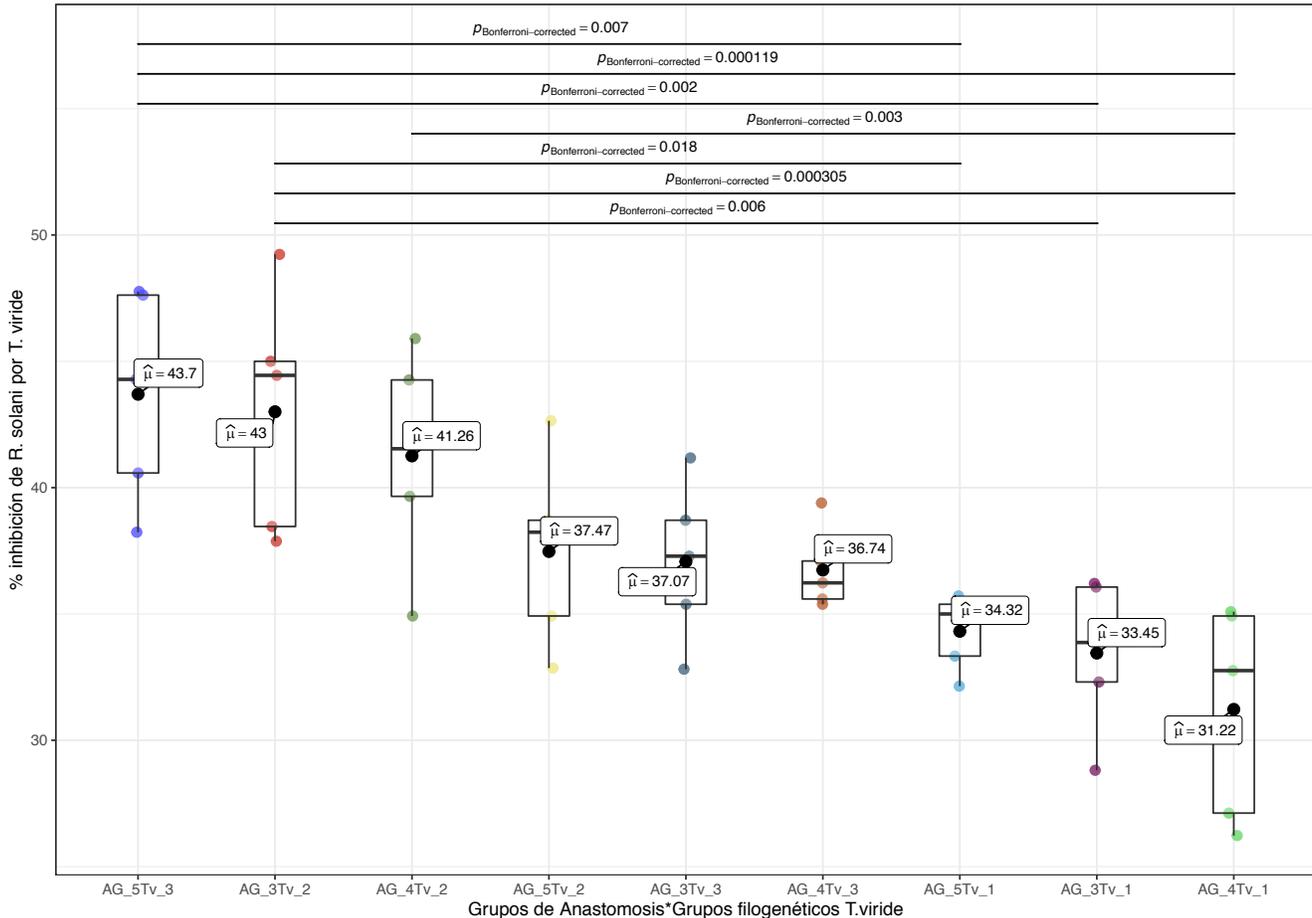


Figura 13. Diagrama de cajas de la capacidad antagonista de los grupos filogenéticos de *T. viride* sobre los grupos de anastomosis *R. solani*. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza.

$F_{\text{Fisher}}(8,36) = 7.24, p = 1.1e-05, \eta_p^2 = 0.62, CI_{95\%} [0.34, 0.73], n_{\text{obs}} = 45$


Pairwise test: Student's t-test; Comparisons shown: only significant

Figura 14. Diagrama de cajas de la capacidad antagonista de los grupos filogenéticos de *T. viride* sobre los grupos de anastomosis *R. solani*. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas $p < .05$.

Al profundizar en el efecto de los grupos de anastomosis sobre la efectividad de *T. harzianum* y *T. viride*, en cuanto al PICR de *R. solani*, el análisis de varianza no mostró diferencia estadísticamente significativa con un $p = .851$ y $p = .547$ respectivamente. Esta condición mostró que, de forma individual y previamente establecida la superioridad de *T. harzianum* sobre *T. viride* con la prueba de la t de Student, la efectividad de ambas especies no se ve afectada y es independiente de los tres grupos de anastomosis de *R. solani* al que se confronta, como se observa en la Figura 15a y 15b.

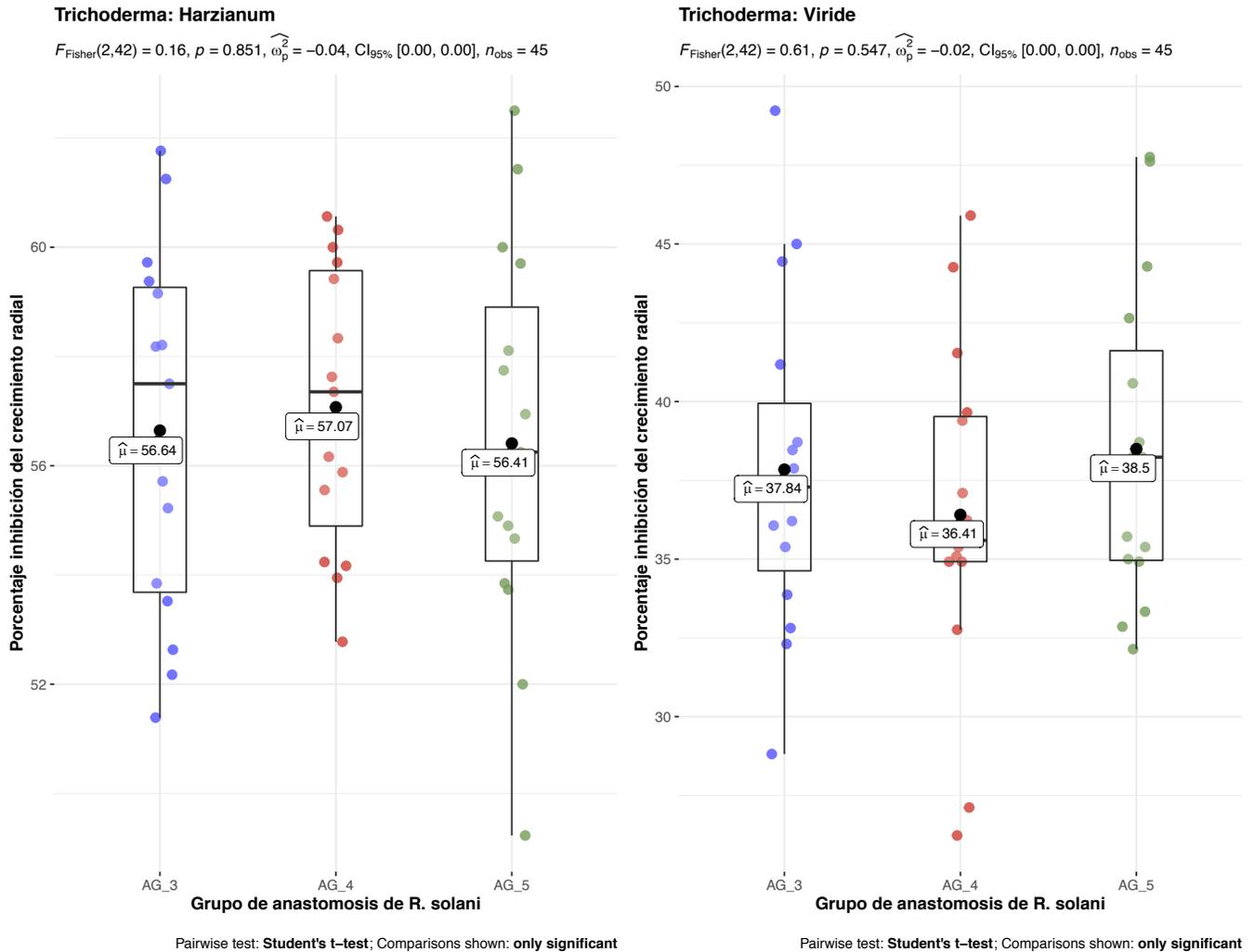


Figura 15. Diagrama de cajas de la capacidad antagonista de a) *T. harzianum* y b) *T. viride* sobre cada grupo de anastomosis de *R. solani*. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza

En cuanto a la efectividad en la actividad antagonista de los grupos filogenéticos de ambas especies de *Trichoderma*, para la inhibición del desarrollo in vitro de *R. solani*, el análisis de varianza no mostró diferencia estadísticamente significativa ($p = .068$) entre los grupos filogenéticos de *T. harzianum*. Para el caso de los grupos filogenéticos de *T. viride* si existió diferencia estadísticamente significativa ($p < .0001$), siendo el grupo filogenético 2 el más efectivo, mientras que el grupo filogenético 1 fue el menos efectivo. En la figura 16 se observa el detalle de las comparaciones pareadas de medias estadísticamente significativas.

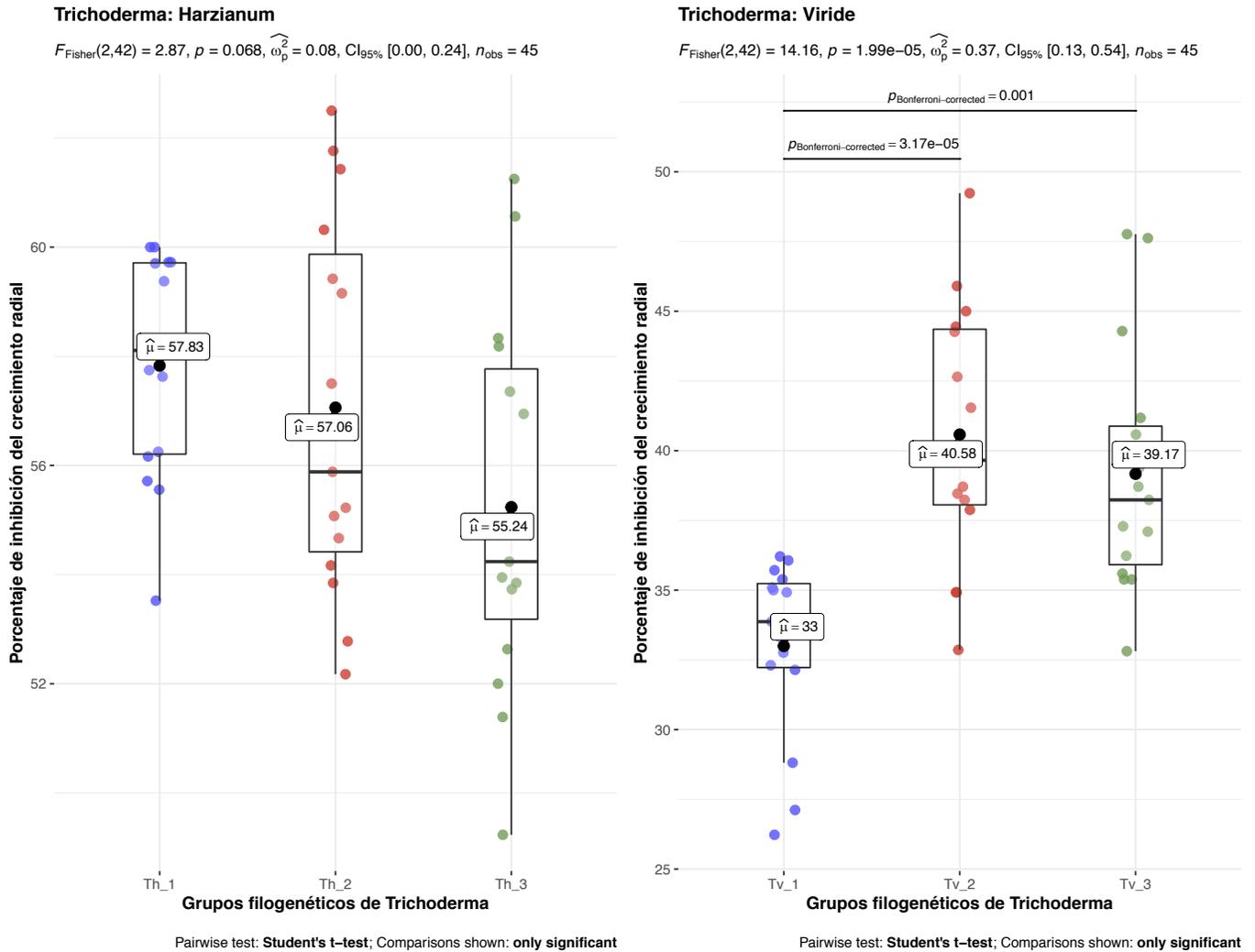


Figura 16. Diagrama de cajas de la capacidad antagonista de cada grupo filogenético de a) *T. harzianum* y b) *T. viride* sobre *R. solani*. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas $p < .05$.

14 Análisis y discusión de resultados

El presente estudio confirma la presencia del *R. solani* en los campos de cultivo de papa afectados por la enfermedad de la costra negra, detallando sobre los grupos de anastomosis de este patógeno. La presencia y alta incidencia del AG-3 PT en Guatemala era predecible, ya que ha sido ampliamente reportado como grupo mayormente asociado a la costra negra en países latinoamericanos como Brasil (Inokuti et al., 2018), Colombia (Ferrucho et al., 2012), México (Virgen-Calleros et al., 2000), Perú (Anguiz, 1989) y en regiones más distantes como China (S. Yang et al., 2017) o Finlandia (Lehtonen et al., 2009). Por otra parte, la presencia de los grupos AG-4 HG-II y AG-5 coincide con los hallazgos descritos tras el análisis filogenético de aislados de *R. solani* obtenidos de tubérculos de papa en Chipre (Kanetis et al., 2016). El AG-5 también ha sido asociado a la costra negra en Sudáfrica, en donde ha sido catalogado como el segundo grupo más agresivo tras el AG3 PT (Muzhinji et al., 2015).

En cuanto a las muestras de ADN que no amplificaron para los cebadores específicos, es probable que pertenezcan a grupos recientemente asociados a la macha negra de la papa como el AG-2-1, AG1-IB, AG-4HG-I, AG-4HG-III y AG-11 reportados en China (Li et al., 2014; S. Yang et al., 2017). Para esclarecer la identidad en cuanto al grupo de anastomosis de dichas muestras, se sugiere optar por la secuenciación región ITS1 – 5.8S – ITS2 del ADN ribosómico a través de cebadores universales (White et al., 1990). La secuenciación de esta región, de aproximadamente 700 pb, ha sido reportada para la determinación de los grupos y subgrupos de anastomosis de *R. solani* mediante la comparación con secuencias de referencia depositadas en bases de datos (Das et al., 2014; Fiers et al., 2011) además de poder realizar un análisis filogenético para determinar la relación evolutiva dentro y entre los grupos de anastomosis (Gondal et al., 2019; Kanetis et al., 2016).

En cuanto al comportamiento de la incidencia y severidad de la enfermedad causada por *R. solani* sobre las cinco variedades de papa evaluadas, es claro que ninguna variedad presenta resistencia ante dicho patógeno. Esta situación es de vital importancia, ya que para lograr un control efectivo de la enfermedad, el factor de resistencia, a través de los distintos genotipos de papa, representa un pilar fundamental para el manejo integrado de la enfermedad (Singh & Singh, 2018).

Por otra parte, el presente estudio muestra el potencial de los aislados nativos de *T. harzianum* y *T. viride* como antagonistas de patógenos transmitidos por el suelo, como *R. solani*, resultando en una estrategia efectiva para el control de este patógeno. Se conoce que las especies de *Trichoderma* se pueden encontrar en una amplia variedad de suelos a nivel de rizósfera, por lo que es de gran importancia como agente de biocontrol en diversos cultivos y regiones (Berg et al., 2006). Además, su baja especificidad vegetal, la variedad de mecanismos antimicóticos y la capacidad de interactuar directamente con la planta huésped mediante la resistencia inducida, convierte a los aislados de *Trichoderma* en grandes aliados como agentes de control biológico (Harman et al., 2004; Howell, 2003). La amplia diversidad genética encontrada en ambas especies de *Trichoderma* evaluadas en este estudio, también ha sido reportada anteriormente, ya que este género comprende un amplio complejo de especies y cepas utilizadas como agentes de biocontrol de diversos patógenos (Feitosa et al., 2019; Grosch et al., 2007).

En cuanto a los valores del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial, PICR de *R. solani* a causa de *T. harzianum* (53.36 - 58.36), estos son similares a los reportados por Tsegaye-Redda y colaboradores (2018), quienes añaden sobre la efectividad de *T. harzianum* contra otros patógenos de suelo como *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea* que también afectan la producción del cultivo de papa. Los valores de PICR de *R. solani* por *T. harzianum* reportados por Sánchez-García y colaboradores (2017) alcanzan el 65% siendo levemente más elevados a los reportados en este estudio. Así mismo, la competencia por espacio y nutrientes, así como la colonización e inhibición el crecimiento vegetativo de *R. solani* por *T. harzianum* identificada en este estudio, es concordante con dichos autores.

Los valores de PICR de *R. solani* por la acción de *T. viride* (43.7 – 31.22) en este estudio, son ligeramente más bajos al comparar con los reportados por Samaniego-Fernández y colaboradores (2018) quienes informan de valores cercanos al 47% y 50% para aislados nativos de *T. viride* y *T. harzianum*, respectivamente. Además, los autores destacan el valor del uso de aislados nativos para el control de *R. solani* y otros patógenos como *Fusarium* spp. y *Sclerotium rolfsii*, enfoque que es coincidente con el presente estudio. Otra evaluación reciente de *T. viride*, como agente de biocontrol, reporta la efectividad en el PICR para *R. solani*, así como de otros patógenos como *F. solani* y *S. rolfsii* (Awad et al., 2018).

Al profundizar sobre el potencial de la diversidad genética de las especies de *Trichoderma* para el control de *R. solani*, destaca el hecho que los tres grupos filogenéticos de *T. harzianum* y *T. viride* fueron efectivos en el PICR de *R. solani*. Esto es un hecho remarcable para promover el uso de aislados nativos de *T. harzianum* mediante procesos de bioaumentación, debido a que la adaptación de dichos aislados a factores bióticos y abióticos locales, es más efectiva en comparación a aislados no nativos (Salvatierra-Martínez et al., 2015).

Comercialmente, existen formulaciones compuestas por varias especies de *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. viride* y *T. atroviride*) aplicadas en campo (Lorito et al., 2010) que generalmente pertenecen a una región diferente a donde se aplica, obteniendo resultados poco o completamente ineficientes (Harman et al., 2010). Las ventajas del uso de la diversidad genética nativa también se destaca con una cepa nativa de *T. asperellum*, aislada del Valle de Toluca, México, que mostró un alto porcentaje de biocontrol sobre *P. infestans*, en comparación a formulaciones comerciales de cepas exógenas de *Trichoderma* (García-Núñez et al., 2017). Este hecho es sumamente relevante, ya que *P. infestans* es el patógeno causante de la destructiva enfermedad en el cultivo de la papa, conocida como tizón tardío, el cual tiene su origen en el Valle de Toluca (Grünwald & Flier, 2005). Esta relación, entre el lugar del aislamiento del patógeno y antagonista, hace que la acción de biocontrol sea más eficiente. Por esta razón, en el presente estudio, los aislados de *Trichoderma* fueron aislados de muestras del suelo colectado en los alrededores de los tubérculos afectados por la enfermedad de la mancha negra.

En cuanto al efecto de los grupos de anastomosis de *R. solani* sobre la efectividad de *T. harzianum* y *T. viride*, se observó que ambas especies de *Trichoderma* no se vieron afectadas por este factor. Esta situación es de gran interés, ya que a nivel de campo, el AG-3 PT ha sido reportado como el grupo más agresivo en comparación al resto de grupos asociados a la costra negra (Abdel-Sattar et al., 2017; Muzhinji et al., 2015). Sin embargo, la agresividad de los grupos de anastomosis, sobre el cultivo de papa, parece no afectar la acción de biocontrol de los aislados nativos de *T. harzianum* y *T. viride*, lo cual es un punto más a favor para promover el uso de la diversidad genética nativa.

Finalmente, queda confirmada la presencia de los grupos de anastomosis AG-3 PT, AG-4- HG-II y AG-5 en la región del altiplano occidental de Guatemala. Sin embargo, queda abierta la posibilidad de que existan otros grupos asociados la costra negra, dado los resultados negativos para 17 de las 78 muestras de ADN analizadas por PCR con

cebadores específicos. Por esto, se sugiere el uso de secuenciación genética sobre la región del ADN ribosomal y así dilucidar la identidad de estos grupos de anastomosis. Por otra parte, los aislados nativos de tres grupos filogenéticos *T. harzianum* y *T. viride* resultaron ser efectivos para la inhibición in vitro de *R. solani*. Se destaca el hecho que, la efectividad de antagonismo de ambas especies de *Trichoderma*, no se ve afectadas por el factor de los grupos de anastomosis, a pesar de que el AG-3 PT ha sido reportado como el más agresivo. Ante estos hallazgos, se sugiere aprovechar el potencial de la diversidad genética evaluando la efectividad de los aislados nativos de *T. harzianum* y *T. viride* bajo condiciones de campo, pudiendo promover así el uso de estos agentes de control biológico contra patógenos del suelo como *R. solani*.

15 Conclusiones

1. A partir de los 78 aislados de *R. solani* se identificó molecularmente la presencia de los grupos de anastomosis AG-3 PT, AG-4 HG-II y AG-5 en los departamentos de Huehuetenango, San Marcos y Quetzaltenango. Debido a que 17 aislados no pudieron ser identificados con los cebadores utilizados, se presume la presencia de otros grupos de anastomosis, por lo cual se sugiere la secuenciación de la región ITS para determinar la identidad de dichos aislados.
2. Las cinco variedades de papa evaluadas fueron igualmente afectadas en cuanto a incidencia y severidad de la enfermedad. A pesar de no existir diferencia estadísticamente significativa en el comportamiento de los genotipos de papa evaluados, la variedad Loman fue la más afectada, tanto en incidencia como en severidad de la enfermedad. En cuanto a los grupos de anastomosis, el AG-3 PT fue el más virulento, mientras que el AG-5 fue el menos virulento.
3. Se confirmó la presencia de *T. harzianum* y *T. viride* a partir de muestras de suelo tomadas de la rizófera de plantas de papa con sintomatología típica causada por *R. solani*. El análisis molecular de los aislados nativos de *T. harzianum* y *T. viride* demostró una alta diversidad para ambas especies, diferenciándose claramente la formación de tres grupos filogenéticos para cada especie.

4. Las pruebas de antagonismo demostraron que *T. harzianum* presenta valores de PICR estadísticamente superiores ($p < 0.001$) a *T. virens*. Se identificó que los tres grupos filogenéticos de *T. harzianum* son igualmente efectivos para el control de los tres grupos de anastomosis de *R. solani*. Para el caso de *T. viride*, el grupo filogenético 2 fue el más efectivo para el control del desarrollo de los tres grupos de anastomosis de *R. solani*.

16 Impacto esperado

Se ha esclarecido la composición de los grupos de anastomosis de *R. solani* presentes en algunas de las zonas productoras de papa del Occidente del país. Se ha identificado que el AG-3 PT es el grupo de anastomosis más agresivo, por lo cual las estrategias de control deben dirigirse hacia el control de dicho grupo. Por otra parte, debido a la poca efectividad de resistencia de las variedades de papa evaluadas, el uso de aislados nativos de *T. harzianum* son altamente recomendables para el control de *R. solani*. Los aislados nativos de *T. viride* también constituyen una alternativa biológica para el control del patógeno.

Los aislados evaluados de ambas especies de *Trichoderma* serán la base para un posterior proceso de evaluación en campo para determinar su efectividad bajo estas condiciones y posteriormente ser facilitados a los agricultores de las zonas con el problema de rizoctoniasis. Debido a la falta de genotipos de papa resistentes a *R. solani*, los hallazgos sobre el biocontrol de este hongo patógeno a través de los aislados nativos de ambas especies de *Trichoderma*, representan, hasta el momento, la alternativa no química más viable para el problema de rizoctoniasis.

17 Referencias

- Abbas, A., Jiang, D., & Fu, Y. (2017). Trichoderma spp . as antagonist of Rhizoctonia solani. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 8(3), 1–9. doi:10.4172/2157-7471.1000402
- Abdel-Sattar, M., El-Marzouky, H., & Ibrahim, U. (2017). Pathogenicity Test and Anastomosis Group of Rhizoctonia solani the Causal Organism of Stem Canker and Black Scurf Disease of Potato in Egypt. *Journal of Applied Plant Protection*, 6(1), 1–8. doi:10.21608/japp.2017.7494
- Acevedo, E., Galindo Castañeda, T., Prada, F., Navia, M., & Romero, H. M. (2014). Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq .) in Colombia. *Applied Soil Ecology*, 80, 26–33. doi:10.1016/j.apsoil.2014.03.011
- Anderson, N. A. (1982). The genetics and pathology of Rhizoctonia-solani. *Annual Review of Phytopathology*, 20, 329–347.
- Anees, M., Tronsmo, A., Edel-Hermann, V., Hjeljord, L., Heraud, C., & Steinberg, C. (2010). Characterization of field isolates of Trichoderma antagonistic against Rhizoctonia solani. *Fungal Biology*, 114(9), 691–701.
- Anguiz, R. (1989). Anastomosis Groups of Rhizoctonia solani on Potato in Central Mexico and Potential for Biological and Chemical Control. *Plant Disease*, 73(3), 199–201. doi:10.1094/pd-73-0199
- Arakawa, M., & Inagaki, K. (2014). Molecular markers for genotyping anastomosis groups and understanding the population biology of Rhizoctonia species. *Journal of General Plant Pathology*, 80(5), 401–407. doi:10.1007/s10327-014-0536-0
- Arora, R. K., & Khurana, S. M. P. (2004). Major Fungal and Bacterial Diseases of Potato and their Management. In K. G. Mukerji (Ed.), *Disease management of fruits and vegetables* (Vol. 1, pp. 189–231). Kluwer Academic Publisher.
- Attitalla, I., Adbelrawaf, S., Saeed, K., El-Komy, H., & Sarwar, M. (2012). Occurrence and Microbiological Characteristics of Trichoderma in Al-Jabal Al-Akhdar Region, Libya. *Journal of Biological Sciences*, 12(4), 209–217.
- Awad, N. E., Kassem, H. A., Hamed, M. A., El-Feky, A. M., Elnaggar, M. A. A., Mahmoud, K., & Ali, M. A. (2018). Isolation and characterization of the bioactive metabolites from the soil derived fungus Trichoderma viride. *Mycology*, 9(1), 70–

80. doi:10.1080/21501203.2017.1423126

- Bains, P. S., & Bish, V. S. (1995). Anastomosis group identity and virulence of *Rhizoctonia solani* isolates collected from potato plants in Alberta, Canada. *Plant Disease*, 79(241–242).
- Baker, K. F. (1970). Types of *Rhizoctonia* disease and their occurrence. In J. R. Parmeter (Ed.), *Rhizoctonia solani: Biology and Pathology* (pp. 172–188). University of California Press.
- Balali, G. R., Whisson, D. L., Scott, E. S., & Neate, S. M. (1996). DNA finger- printing probe specific to isolates of *Rhizoctonia solani* AG-3. *Mycology Research*, 100, 467–470.
- Banville, G. J. (1978). Studies on the *Rhizoctonia* disease of potatoes. *American Potato Journal*, 55, 56.
- Banville, G. J. (1989). Yield losses and damage to potato plants caused by *Rhizoctonia solani* Kühn. *American Potato Journal*, 66, 821–834.
- Banville, G. J., & Carling, D. E. (2001). *Rhizoctonia* canker and black scurf. In W. R. Stevenson, R. Loria, G. Franc, & D. P. Weingartner (Eds.), *Compendium of Potato Disease* (pp. 36–37). APS Press.
- Banville, G. J., Carling, D. E., & Otrysko, B. E. (1996). *Rhizoctonia* disease on potato. In B. Sneh, S. Jabaji-Hare, S. Neate, & G. Dijst (Eds.), *Rhizoc- tonia Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control* (pp. 321–330). Academic Publishers.
- Berg, G., Opelt, K., Zachow, C., Lottmann, J., Götz, M., Costa, R., & Smalla, K. (2006). The rhizosphere effect on bacteria antagonistic towards the pathogenic fungus *Verticillium* differs depending on plant species and site. *FEMS Microbiology Ecology*, 56(2), 250–261. doi:10.1111/j.1574-6941.2005.00025.x
- Campion, C., Chatot, C., Perraton, B., & Andrivon, D. (2003). Anastomosis groups, pathogenicity and sensitivity to fungicides of *Rhizoctonia solani* isolates collected on potato crops in France. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 983–992.
- Cao, C., Wang, X., Xu, F., & Lu, C. (2019). Anastomosis Groups and Pathogenicity of *Rhizoctonia solani* from Potato in Inner Mongolia. *Plant Diseases and Pests*, 10(1), 18–23. doi:10.19579/j.cnki.plantd.p.2019.01.005
- Carling, D. E., Kuninaga, S., & Brainard, K. A. (2002). Hyphal anastomosis reactions, rDNA-internal transcribed spacer sequences, and viru- lence levels among sunsets

- of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2 and AG BI. *Phytopathology*, 92, 43–50.
- Carling, D. E., Leiner, R. H., & Westphale, P. C. (1989). Symptoms, signs and yield reduction associated with *Rhizoctonia* disease of potato induced by tuber-borne inoculum of *Rhizoctonia solani* AG-3. *American Potato Journal*, 66, 693–701.
- Cedeño, L., Carrero, C., Quintero, K., Araujo, Y., Pino, H., & R, G. (2001). Identificación y virulencia de grupos de anastomosis de *Rhizctonia solani* Kühn asociados con papa en Mérida, Venezuela. *Interciencia*, 26(296–300).
- Danies, G., Small, I. M., Myers, K., Childers, R., & Fry, W. E. (2013). Phenotypic Characterization of Recent Clonal Lineages of *Phytophthora infestans* in the United States. *Plant Disease*, 97(January), 873–881. doi:http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-07-12-0682-RE
- Das, S., Shah, F. A., Butler, R. C., Fallon, R. E., Stewart, A., Raikar, S., & Pitman, A. R. (2014). Genetic variability and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* associated with black scurf of potato in New Zealand. *Plant Pathology*, 63, 651–666. doi:10.1111/ppa.12139
- de Mendiburu, F. (2020). agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R package version 1.3-3. Disponible en: <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>
- Demirci, E., Dane, E., & Eken, C. (2011). In vitro antagonistic activity of fungi isolated from sclerotia on potato tubers against *Rhizoctonia solani*. *Turkish Journal of Biology*, 35, 457–462. doi:10.3906/biy-1004-98
- El Bakali, M. A., Lilja, A., Hantula, J., & Martin, M. P. (2003). Identification of Spanish isolates of *Rhizoctonia solani* from potato by anastomosis grouping, ITS-RFLP and RAMS-fingerprinting. *Phytopatologia Mediterranea*, 42, 1–10.
- Escalona, Y., Rodríguez, D., & Hernández, A. (2011). *Rhizoctonia solani* Kühn aislado de papa (*Solanum tuberosum* L .) en los estados Táchira, Mérida, Trujillo y Lara y caracterización cultural. *Bioagro*, 23(3), 161–168.
- Escalona, Y., Rodríguez, D., & Hernández, A. (2012). Estudio de *Rhizoctonia solani* Kühn aislado de papa (*Solanum tuberosum* L.) en los estados Táchira, Mérida, Trujillo y Lara. II. virulencia y caracterización molecular. *Bioagro*, 24(1), 13–22.
- Feitosa, Y. B., Cruz-Magalhães, V., Argolo-Filho, R. C., De Souza, J. T., & Loguercio, L. L. (2019). Characterization of genetic diversity on tropical *Trichoderma* germplasm by sequencing of rRNA internal transcribed spacers. *BMC Research*

Notes, 12(1), 1–6. doi:10.1186/s13104-019-4694-1

- Ferrucho, R. L., Cifuentes, J. M., Ceresini, P., & García-Domínguez, C. (2012). *Rhizoctonia solani* AG-3PT is the major pathogen associated with potato stem canker and black scurf in Colombia. *Agronomía Colombiana*, 30(2), 204–213.
- Fiers, M., Edel-Hermann, V., Héraud, C., Gautheron, N., Chatot, C., Hingrat, Y. Le, Bouchek-Mechiche, K., & Steinberg, C. (2011). Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* associated with potato tubers in France. *Mycologia*, 103(6), 1230–1244. doi:10.3852/10-231
- Frank, J. A., & Leach, S. (1980). Comparison of tuber-borne and soil-borne inoculum in the *Rhizoctonia* disease of potato. *Phytopathology*, 70, 51–53.
- Fry, W. E., Birch, P., Judelson, H., Grünwald, N., Danies, G., Everts, K., Gevens, A., Gugino, B., Johnson, D., Johnson, S., McGrath, M., Myers, K., Ristaino, J., Roberts, P., Secor, G., & Smart, C. (2015). Five Reasons to Consider *Phytophthora infestans* a Reemerging Pathogen. *Phytopathology*, 105(7), 966–981. doi:10.1094/PHYTO-01-15-0005-FI
- García-Núñez, H. G., Martínez-Campos, Á. R., Hermosa-Prieto, M. R., Monte-Vázquez, E., Aguilar-Ortigoza, C. J., & González-Esquivel, C. E. (2017). Caracterización morfológica y molecular de cepas nativas de *Trichoderma* y su potencial de biocontrol sobre *Phytophthora infestans*. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 35(1), 58–79. doi:10.18781/r.mex.fit.1605-4
- García, V. G., Onco, M. A. P., & Susan, V. R. (2006). Review. Biology and systematics of the form genus *Rhizoctonia*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 4, 55–79.
- Gondal, A. S., Rauf, A., & Naz, F. (2019). Anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* associated with tomato foot rot in Pothohar Region of Pakistan. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. doi:10.1038/s41598-019-40043-5
- Grosch, R., Lottmann, J., Rehn, V. N. C., Rehn, K. G., Mendonca-Hagler, L., Smalla, K., & Berg, G. (2007). Analysis of antagonistic interactions between *Trichoderma* isolates from Brazilian weeds and the soil-borne pathogen *Rhizoctonia solani*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 114(4), 167–175. doi:10.1007/BF03356213
- Groth, D. E., Rush, M. C., & Lindberg, G. D. (1990). Foliar fungicides for control of rice diseases in the United States. In B. T. Grayson, M. B. Green, & L. G. Copping (Eds.), *Pest management in rice* (pp. 31–52). Elsevier.

- Grünwald, N. J., & Flier, W. G. (2005). The Biology of *Phytophthora infestans* at Its Center of Origin. *Annual Review of Phytopathology*, *43*, 171–190. doi:10.1146/annurev.phyto.43.040204.135906
- Gutiérrez, B., González, M. S., & Salih, A. (2006). Caracterización de aislamientos de *Rhizoctonia Solani* Kühn que inducen pudriciones radicales en cultivares de papa. *Bioagro*, *18*(1), 63–72.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). Trichoderma species - Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, *2*(1), 43–56. doi:10.1038/nrmicro797
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2010). Changing models for commercialization and implementation of biocontrol in the developed and developing world. *Plant Disease*, *94*, 928–939. doi:10.1094/PDIS-94-8-0928
- Hartill, W. T. F. (1989). Some effects of *Rhizoctonia solani* on growth and yield potatoes. *Potato Research*, *32*, 283–292.
- Hide, G. A., Hirst, J. M., & Stedman, O. J. (1974). Effects of black scurf (*Rhizoctonia solani*) on potatoes. *Annals of Applied Biology*, *74*, 139–148.
- Howell, C. R. (2003). Mechanisms employed by Trichoderma species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, *87*(1), 4–10. doi:10.1094/PDIS.2003.87.1.4
- Hoyos, C., Galvis, F., & Rodríguez, D. (2012). Aislamientos nativos y foráneos de Trichoderma para el control de rizoctoniasis en papa criolla. *Revista de Ciencias Agrícolas*, *29*(1), 5–15.
- Inokuti, E. M., Reis, A., Ceresini, P. C., Câmara, M. P. S., & Michereff, S. J. (2018). Diversity and pathogenicity of anastomosis groups of *Rhizoctonia* associated with potato stem canker and black scurf diseases in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*. doi:10.1007/s10658-018-01627-5
- Jager, G., Velvis, H., Lamers, J. G., Mulder, A., & Roosjen, J. (1991). Control of *Rhizoctonia solani* in potato by biological, chemical and integrated measures. *Potato Research*, *34*, 269–284.
- James, W. C., & McKenzie, A. R. (1972). The effect of tuberborne sclerotia of *Rhizoctonia solani* Kuhn on the potato crop. *American Potato Journal*, *49*, 296–301.
- Jeger, M. J., Hide, G. A., van den Boogert, P., Termorshuizen, A. J., & van Baarlen, P. (1996). Soilborne fungal pathogens of potato. *Potato Research*, *39*, 437–469.

- Kanetis, L., Tsimouris, D., & Christoforou, M. (2016). Characterization of *Rhizoctonia solani* associated with black scurf in Cyprus. *Plant Disease*, *100*(8), 1591–1598. doi:10.1094/PDIS-10-15-1238-RE
- Kuninaga, S. (2002). Current situation of the taxonomy of the genus *Rhizoctonia* and the *Rhizoctonia* species complex. *Japanese Journal of Phytopathology*, *68*, 3–20.
- Kuninaga, S. (2003). Current situation of the taxonomy of *Rhizoctonia solani*. *Plant Protection*, *57*, 219–222.
- Kuninaga, S., Carling, D. E., Takeuchi, T., & Yokosawa, R. (2000). Comparison of rDNA-ITS sequences between potato and tobacco strains in *Rhizoctonia solani* AG-3. *Journal of Genetic Plant Pathology*, *66*, 2–11.
- Lees, A. K., Cullen, D. W., Sullivan, L., & Nicolson, M. J. (2002). Development of conventional and quantitative real-time PCR assays for the detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG-3 in potato and soil. *Plant Pathology*, *51*, 293–302.
- Lehtonen, M. J., Wilson, P. S., Ahvenniemi, P., & Valkonen, J. P. T. (2009). Formation of canker lesions on stems and black scurf on tubers in experimentally inoculated potato plants by isolates of AG2-I, AG3 and AG5 of *Rhizoctonia solani*: A pilot study and literature review. *Agricultural and Food Science*, *18*(3–4), 223–233. doi:10.2137/145960609790059415
- Li, X., Xu, N., & Yu, J. (2014). Anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* from black scurf of potato in northern China. *Mycosystema*, *33*(3), 584–593.
- Liu, L., Zhang, J., & Xu, T. (2009). Histopathological studies of sclerotia of *Rhizoctonia solani* parasitized by the EGFP transformant of *Trichoderma virens*. *Letters in Applied Microbiology*, *49*, 745–750. doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02737.x
- Lorito, M., Woo, S., Harman, G., & Monte, E. (2010). Translational research on *Trichoderma*: from omics to the field. *Annual Review of Phytopathology*, *48*, 395–417. doi:10.1146/annurev-phyto-073009-114314.
- MAGA, M. de A. G. y A. (n.d.). *El agro en cifras 2016* (M. Dirección de Planeamiento (ed.)).
- McCabe, P. M., Gallacher, M. P., & Deaco, J. W. (1999). Evidence for segregation of aomatic incompatibility during hyphal tip subculture of *Rhizoctonia solani* AG-4. *Mycology Research*, *103*, 1323–1331.
- Misawa, T. (2015). Current situation of the taxonomy and identification method of

- Rhizoctonia. *Plant Protection*, 69, 88–91.
- Miyazaki, K., Tsuchiya, Y., & Okuda, T. (2009). Specific PCR assays for the detection of *Trichoderma harzianum* causing green mold disease during mushroom cultivation. *The Mycological Society of Japan*, 50, 94–99.
- Mullis, K. B. (1990). The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*, 262(4), 56–65. doi:10.1038/scientificamerican0490-56
- Murdock, M. R., Woodhall, J. W., Maggard, S. R., Keith, S., Harrington, M., Oropeza, L., & Duellman, K. M. (2019). First report of *Rhizoctonia solani* AG 2-1 causing stem canker of potato (*Solanum tuberosum*) in Idaho. *Plant Disease*, 10–12. doi:10.1094/PDIS-02-19-0364-PDN
- Muzhinji, N., Truter, M., Woodhall, J. W., & van der Waals, J. E. (2015). Anastomosis groups and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* from potato in South Africa. *Plant Disease*, 99(12), 1790–1802. doi:10.1094/PDIS-02-15-0236-RE
- Naeimi, S., Okhovvat, S. M., Javan-Nikkhah, M., Vágvölgyi, C., Khosravi, V., & Kredics, L. (2010). Biological control of *Rhizoctonia solani* AG1-1A, the causal agent of rice sheath blight with *Trichoderma* strains. *Phytopathologia Mediterranea*, 49, 287–300.
- Nora, S., Albaladejo, R. G., González-Martínez, S. C., Robledo-Amuncio, J., & Aparicio, A. (2011). Movimiento de genes (polen y semillas) en poblaciones fragmentadas de plantas. *Ecosistemas*, 20(2), 35–45. doi:10.7818/re.2014.20-2-3.00
- Ogoshi, A. (1987). Ecological and pathogenicity of anastomosis group of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Phytopathology*, 25(125–143).
- Patil, I. (2018). ggstatsplot: 'ggplot2' Based Plots with Statistical Details. CRAN.
Recuperado de: <https://cran.r-project.org/web/packages/ggstatsplot/index.html>
- Pavel, A. B., & Vasile, C. I. (2012). PyElph - a software tool for gel images analysis and phylogenetics. *BMC Bioinformatics*, 13(1). doi:10.1186/1471-2105-13-9
- Platt, H. W. (1989). Potato growth and tuber production as affected by inoculation of cut and whole seed with *Rhizoctonia solani* (AG 3) and the use of seed treatment fungicides. *American Potato Journal*, 66, 365–378.
- Platt, H. W., Canale, F., & Giménez, G. (1993). Effects of tuber-borne inoculum of *Rhizoctonia solani* and fungicidal seed potato treatment of plant growth and *Rhizoctonia* disease in Canada and Uruguay. *American Potato Journal*, 70, 553–559.
- Rajendraprasad, M., Vidyasagar, B., Uma, G., & Koteswar, R. (2017). In vitro evaluation

- of fungicides and biocontrol agents against *Rhizoctonia solani* in tomato. *International Journal of Plant & Soil Science*, 17(5), 1–9. doi:10.9734/IJPSS/2017/35307
- Rambaut, A. (2008). *FigTree v1.1.1: Tree figure drawing tool*.
- R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponible en: <https://www.R-project.org/>.
- Reyes, Y., Martínez, B., & Infante, D. (2008). Evaluación de la actividad antagonica de trece aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia* sp. *Revista de Protección Vegetal*, 23(2), 112–117.
- Ritchie, F., Bain, R., & Mcquilken, M. (2012). Survival of Sclerotia of *Rhizoctonia solani* AG3PT and effect of soil-borne inoculum density on disease development on potato. *Journal of Phytopathology*, 1–10. doi:10.1111/jph.12052
- Rodriguez, I., & Flores, J. (2018). Capacidad antagonica in vitro de *Trichoderma* spp. frente a *Rhizoctonia solani* Kuhn Y *Fusarium verticillioides* Nirenberg. *Bioagro*, 30(1), 49–58.
- Ruocco, M., Lanzuise, S., Vinale, F., Marra, R., Turra, D., & Woo, S. L. (2009). Identification of a new biocontrol gene in *Trichoderma atroviride*: the role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant-pathogenic. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(3), 291–301. doi:10.1094/MPMI-22-3-0291
- Ryan, P. D., Hammer, Ø., & Harper, D. A. (2001). Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 5–7. doi:10.1016/j.bcp.2008.05.025
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution Biol Evo*, 4(4), 406–425. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454
- Salvatierra-Martínez, R., Sepúlveda-Chavera, G., Huanca-Mamani, W., & Rodríguez-Molina, M. (2015). Native strains of *Trichoderma* from northern Chile: Adaptive tolerance in boric saline soils. *Interciencia*, 40(4), 263–269.
- Samaniego-Fernández, L. M., Harouna, M., Corbea, O., Rondón-Castillo, A. J., & Placeres-Espinosa, I. (2018). Aislamiento, identificación y evaluación de cepas autóctonas de *Trichoderma* spp. antagonistas de patógenos del suelo. *Revista de*

Protección Vegetal, 33(3), 1–11.

- Sánchez-García, B. M., Espinosa-Huerta, E., Villordo-Pineda, E., Rodríguez-Guerra, R., & Mora-Avilés, M. A. (2017). Trichoderma spp. native strains molecular identification and in vitro antagonistic evaluation of root phitopathogenic fungus of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. montcalm. *Agrociencia*, 51(1), 63–79.
- Santos, A., Beltrán, C., García, M., Cotes, A. M., & Villamizar, L. (2011). Control de *R. solani* en semilla de papa criolla con *T. koningiopsis* (Th003) y *T. asperellum* (Th034). In C. Beltrán, C. Moreno, & A. Cotes (Eds.), *Trichoderma koningiopsis Th003, alternativa biológica para el control de Rhizoctonia solani en el cultivo de papa* (p. 72). CORPOICA.
- Secor, G. A., & Gudmestad, N. C. (1999). Managing fungal diseases of potato 1. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 21, 213–221. doi:10.1080/07060669909501184
- Sharon, M., Kuninaga, S., Hyakumachi, M., & Sneh, B. (2006). The advancing identification and classification of *Rhizoctonia* spp. using molecular and biotechnological methods compared with the classical anastomosis grouping. *Mycoscience*, 47, 299–316.
- Singh, A., & Singh, J. (2018). Integrated Management of Fungal Diseases in Potato. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(8), 4443–4450. doi:10.20546/ijcmas.2018.708.469
- Sneh, B., Burpee, L., & Ogoshi, A. (1991). *Identification of Rhizoctonia Species*. APS Press.
- Srivastava, M., Sharma, A., Shahid, M., Pandey, S., Kumar, V., & Singh, A. (2014). In silico primer designing and validation for specific molecular identification of *Trichoderma* species. *The Internet Journal of Genomics and Proteomics*, 7(1), 1–7.
- Stodart, B. J., Harvey, P. R., Neate, S. M., Melanson, D. L., Scott, E. S., & Mitchell, D. T. (2007). Genetic variation and pathogenicity of anastomosis group 2 isolates of *Rhizoctonia solani* in Australia. *Mycological Research*, 111, 891–900. doi:10.1016/j.mycres.2007.05.008
- Truter, M., & Wehner, F. C. (2004). Anastomosis grouping of *Rhizoctonia solani* associated with black scurf and stem canker of potato in South Africa. *Plant Disease*, 88, 83.
- Tsegaye-Redda, E., Ma, J., Mei, J., Li, M., Wu, B., & Jiang, X. (2018). Antagonistic

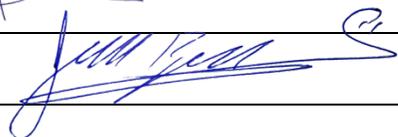
- Potential of Different Isolates of *Trichoderma* against *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, and *Botrytis cinerea*. *European Journal of Experimental Biology*, 08(02), 1–8. doi:10.21767/2248-9215.100053
- Tsrer, L. (2010). Biology, epidemiology and management of *Rhizoctonia solani* on Potato. *Journal of Phytopathology*, 158, 649–658. doi:10.1111/j.1439-0434.2010.01671.x
- Tsrer, L., & Peretz-Alon, I. (2005). The influence of the inoculum source of *Rhizoctonia solani* on development of black scurf on potato. *Journal of Phytopathology*, 153, 240–244.
- van Emden, J. H. (1965). *Rhizoctonia solani*: results of recent experiments. *European Potato Journal*, 8, 188–189.
- Vilgalys, R., & González, D. (1990). Ribosomal DNA restriction fragment length polymorphisms in *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 80, 151–158.
- Vinale, F., Sivasithamparamb, S., Ghisalbertic, E. L., Marra, R., & Woo, S. L. (2008). *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 1–10.
- Virgen-Calleros, G., Olalde-Portugal, V., & Carling, D. E. (2000). Anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* on potato in Central Mexico and potential for biocontrol and chemical control. *American Journal of Potato Research*, 7, 219–224.
- Weinhold, A. R., Bowman, T., & Hall, D. H. (1982). *Rhizoctonia* disease of potato: effect on yield and control by seed tuber treatment. *Plant Disease*, 66, 815–818.
- Weinhold, A. R., Bowman, T., & Hall, D. H. (1982). *Rhizoctonia* disease of potato: effect on yield and control by seed tuber treatment. *Plant Disease*, 66, 815–818.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal Rna Genes for Phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (pp. 315–322). Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1
- Woodhall, J. W., Lees, A. K., Edwards, S. G., & Jenkinson, P. (2007). Characterization of *Rhizoctonia solani* from potato in Great Britain. *Plant Pathology*, 56, 286–295. doi:10.1111/j.1365-3059.2006.01545.x
- Yang, S., Min, F., Wang, W., Wei, Q., Guo, M., Gao, Y., Dong, X., & Lu, D. (2017). Anastomosis Group and Pathogenicity of *Rhizoctonia solani* Associated with Stem Canker and Black Scurf of Potato in Heilongjiang Province of China. *American Journal of Potato Research*, 94(2), 95–104. doi:10.1007/s12230-016-9535-3

Yang, Y., Zhao, C., Gou, Z. J., & Wu, X. (2014). Anastomosis group and pathogenicity of binucleate *Rhizoctonia* isolates associated with stem canker of potato in China. *European Journal of Plant Pathology*, 139, 535–544.

18 Apéndices

Listado de los integrantes del equipo de investigación (en una sola hoja)

Contratados por contraparte y colaboradores

Nombre	Firma
Gregorio Amílcar Sánchez Pérez	
Julio Ernesto Berdúo Sandoval	

Contratados por la Dirección General de Investigación

Nombre	Categoría	Registro de Personal	Pago		Firma
			SI	NO	
José Alejandro Ruiz Chután	Investigador	20101034	X		
Walfer Wilfredo Martínez Xutuc	Investigador	20040015	X		

Guatemala ___26___ de febrero ___2021___



Ph.D. Gregorio Amílcar Sánchez Pérez

Coordinador del proyecto de Investigación



Ing. MARN. Julio Rufino Salazar Pérez
Coordinador General de Programas
Digi USAC

Ing. Agr. MARN. Julio Rufino Salazar
Programa Universitario de Investigación



Ing. MARN. Julio Rufino Salazar Pérez
Coordinador General de Programas
Digi USAC

Ing. Agr. MARN. Julio Rufino Salazar
Coordinador General de Programas