



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTALES
CARRERA DE AGRONOMÍA

Proyecto de Investigación previo a
la obtención del título de Ingeniera
Agrónoma.

Título del Proyecto de Investigación:

“Caracterización de actinomicetos rizosféricos con potencial benéfico en semillas de maíz
(*Zea mays*)”

Autora:

Ana María Miquinga Tucres

Director del Proyecto de Investigación

Fernando Abasolo Pacheco PhD.

Mocache – Los Ríos – Ecuador

2022

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, **Ana María Miquinga Tucres**, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normatividad institucional vigente.

Ana María Miquinga Tucres

C.I: 172408030-2

CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El suscrito, Fernando Abasolo Pacheco PhD, docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que la Srta. Ana María Miquinga Tucres, realizó el Proyecto de Investigación titulado, **“Caracterización de actinomicetos rizosféricos con potencial benéfico en semillas de maíz (*Zea mays*)”** previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Fernando Abasolo Pacheco PhD.
Director del Proyecto de Investigación

CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO

El suscrito, **Fernando Abasolo Pacheco PhD**, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, en calidad de Director del Proyecto de Investigación titulado “Caracterización de actinomicetos rizosféricos con potencial benéfico en semillas de maíz (*Zea mays*)”, pertenece a la estudiante **Ana María Miquinga Tucres** de la carrera de agronomía, certifica: el cumplimiento de los parámetros establecidos por la SENESCYT, y se evidencia al reporte de la herramienta de prevención y coincidencia y/o plagio académico (URKUND) con un porcentaje de coincidencia del 3%.

	
Documento	MIQUINGA TUCRES ANA TESIS.docx (D152165332)
Presentado	2022-12-05 14:23 (-05:00)
Presentado por	ana.miquinga2016@uteq.edu.ec
Recibido	fabasolo.uteq@analysis.arkund.com
Mensaje	Revisión Tesis Mostrar el mensaje completo 3% de estas 37 páginas, se componen de texto presente en 6 fuentes.

Fernando Abasolo Pacheco PhD.
Director del Proyecto de Investigación



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTALES
CARRERA AGRONOMÍA

CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

“Caracterización de actinomicetos rizosféricos con potencial benéfico en semillas de maíz (*Zea mays*)”

Presentado a la Comisión Académica como requisito previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo.

Aprobado por:

Ing. Silvia Saucedo Aguiar Ph.D.
Presidenta del Tribunal

Ing. Mayra Vélez Ruiz Ph.D.
Miembro del tribunal

Ing. Marisol Rivero Herrada Ph.D.
Miembro del tribunal

Mocache – Los Ríos – Ecuador

2022

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mi Dios por permitirme lograr esta meta, por ser fortaleza y la luz que siempre bendice mi vida. Siempre estaré infinitamente agradecida con mis padres por brindarme su apoyo incondicional, lo que me ha permitido lograr todas mis objetivos académicas y personales. Ellos son quienes, a través de su amor, me han inspirado constantemente para ir hacia mis metas y nunca desistir ante la dificultad.

Mi más sincero agradecimiento para mi director de tesis, Dr. Fernando Abasolo Pacheco, por su enseñanza de valiosos conocimientos, apoyo incondicional y amistad que me permitieron culminar con éxito este proyecto de investigación.

A mi tía Gloria Chamba a quien quiero como una madre, por siempre estar dispuesta a escucharme y ayudarme en cualquier momento.

A ti cariño Cristian Semblantes, por brindarme tu amor, consejos y apoyo incondicional en los momentos más difíciles, agradezco infinitamente porque siempre estas para mí.

A mis amigos por extender su mano en momentos difíciles y brindarme su apoyo en el desarrollo de este proyecto de investigación Ing. Cristhian Macias, Ing. Dayanara Tapia, Msc. Antonio Mendoza, Msc. Ángel Cedeño, Gabriela Morales, Jessica Escobar, Teresa De Jesús Manzo y Javier Pérez.

De igual manera mis agradecimientos a la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, a mis docentes en especial a la Dra. Silvia Saucedo, Dra. Mayra Vélez y Dra. Marisol Rivero quienes con la enseñanza de sus valiosos conocimientos hicieron que pueda crecer como profesional, gracias a cada una de ustedes por su paciencia y ejemplo a seguir.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de investigación a Dios por permitirme completar esta meta en este momento importante de mi desarrollo profesional.

Con todo cariño y amor a mis padres, A mi padre, Luis Miquinga por ser el pilar más importante y por demostrarme siempre su amor y apoyo incondicional. A mi madre, Flor Tucres mi mayor inspiración, por su apoyo constante, por llenar mi vida con sus valiosos consejos.

Sobre todo, a mi fuente de luz a la persona que hace mis días sean mágicos y maravillosos. Te lo dedico esto, querida abuelita de mi corazón Flora Torres, gracias por ser mi cómplice, mi confidente, ayudarme a crecer, amarme, pero sobre todo por estar pendiente de mí.

A mis hermanas, Britany y Nicole por llenarme de alegría y por los bellos momentos compartidos.

RESUMEN

Los actinomicetos que colonizan la rizósfera de las plantas son importantes en la promoción del crecimiento vegetal mediante la producción de sustancias biológicamente activas. El objetivo de este estudio fue caracterizar actinomicetos de la rizósfera, evaluar su capacidad bioestimulante como promotora de crecimiento vegetal en maíz in vitro y su potencial para controlar fitopatógenos. Se obtuvieron cincuenta y cuatro aislados de actinomicetos de muestras de suelo de cultivos cacao, aguacate y maíz colectados en zonas de Pangua, Mocache, Buena Fe y Quito, Ecuador. Los aislamientos de actinomicetos se caracterizaron morfológica y bioquímicamente en base a la solubilización de nitrógeno, fosforo y potasio. El ensayo de germinación de semillas de maíz reveló que nueve aislados promovieron significativamente la tasa de germinación presentando mayores resultados la cepa A14 (96%), se observó el efecto bioestimulante de actinomicetos en parámetros de crecimiento vegetal que incluyen longitud del hipocótilo con la cepa B3 (13.24 cm), se registró un aumento en la longitud radicular con A14 (21.33 cm). Se registraron aumentos en el peso fresco de la planta con A14 (14.90 g), se registró un aumento de peso seco de la planta con SQA7 (1.67g). La cepa A14 exhibió un alto antagonismo contra (*Fusarium* sp.) con un porcentaje de inhibición (87%), mientras que el efecto antagonista contra (*Lasiodiplodia theobromae*) fue con un porcentaje de inhibición (85 %). Los resultados indican que los actinomicetos tienen potencial para promover el crecimiento vegetal en el cultivo sostenible del maíz, aún más como agente biológico para controlar fitopatógenos.

Palabras clave: actinomicetos, rizósfera, bioestimulante, controlador biológico, maíz.

ABSTRACT

Actinomycetes that colonize the rhizosphere of plants are important in promoting plant growth through the production of biologically active substances. The objective of this study was to characterize actinomycetes from the rhizosphere, evaluate their biostimulant capacity as a plant growth promoter in maize in vitro, and their potential to control phytopathogens. Fifty-four isolates of actinomycetes were obtained from soil samples of cocoa, avocado and maize crops collected in areas of Pangua, Mocache, Buena Fe and Quito, Ecuador. The actinomycete's isolations were characterized morphologically and biochemically based on the solubilization of nitrogen, phosphorus and potassium. The maize seed germination assay revealed that nine isolated significantly promoted the germination rate, with strain A14 presenting higher results (96%), the biostimulating effect of actinomycetes on plant growth parameters, including hypocotyl length, was observed with strain B3. (13.24 cm), an increase in root length was recorded with A14 (21.33 cm). Increases in the fresh weight of the plant were registered with A14 (14.90 g), an increase in dry weight of the plant was registered with SQA7 (1.67 g). The A14 strain exhibited a high antagonism against (*Fusarium* sp.) with a percentage of inhibition (87%), while the antagonistic effect against (*Lasiodiplodia theobromae*) was with a percentage of inhibition (85%). The results indicate that actinomycetes have the potential to promote plant growth in the sustainable cultivation of maize, even more as a biological agent to control phytopathogens.

Keywords: actinomycetes, rhizosphere, biostimulant, biological controller, maize.

TABLA DE CONTENIDO

PORTADA.....	i
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	ii
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	iii
CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO.....	iv
CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN	v
AGRADECIMIENTO	vi
DEDICATORIA.....	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
TABLA DE CONTENIDO	x
CÓDIGO DUBLÍN.....	xix
INTRODUCCIÓN.....	1
Capítulo I. Contextualización de la investigación	
1.1 Planteamiento del problema	4
1.2 Justificación.....	6
1.3 Objetivos	7
1.3.1 Objetivo General	7
1.3.2 Objetivos Específicos	7

Capítulo II. Marco Teórico

2.1	Marco Conceptual	9
2.1.1	Fosfatos	9
2.1.2	El maíz.....	9
2.2	Marco Referencial	9
2.2.1	Suelo.....	9
2.2.2	Actinomicetos.....	10
2.2.2.1	Condiciones de crecimiento de los actinomicetos.....	11
2.2.2.2	Los actinomicetos como agentes de control biológico.....	11
2.2.3	Solubilización de fosfatos	12
2.2.4	El maíz (<i>Zea mays</i> L.)	13
2.2.4.1	Descripción biológica.....	13
2.2.5	Requerimientos edafoclimáticos del maíz.....	14
2.2.6	Antecedentes de Investigaciones en Contexto	15
2.2.6.1	Respuesta del cultivo del tomate a la aplicación de actinomicetos	15
2.2.6.2	<i>Streptomyces</i> de la rizósfera de maíz como promotor de crecimiento vegetal.....	16
2.2.6.3	Actividad bioestimulante de actinomicetos aislados de la rizosfera de soja	16
2.2.6.4	Evaluación de crecimiento vegetal en actinomicetos de la rizósfera (<i>Solanum</i> sp.)...17	
2.2.6.5	Aislamiento, control biológico y capacidad bioestimulante de (<i>Streptomyces</i>).....	17
2.2.6.6	Identificación de actinomicetos de la rizósfera para el biocontrol de (<i>Valsa mali</i>)	18
2.2.6.7	Aislamiento y biocontrol de actinomicetos del manglar de Pahang, Malasia	18

2.2.6.8	Capacidad bioestimulante y biocontrol de actinomicetos de la rizósfera del olivo	19
---------	---	----

Capítulo III. Metodología de la Investigación

3.1.	Localización	21
3.2.	Tipo de investigación	21
3.3.	Métodos de investigación.....	21
3.4.	Fuentes de recopilación de información.....	22
3.5.	Diseño de investigación.....	22
3.5.1	Diseño para aplicación de actinomicetos en semillas de maíz <i>in vitro</i>	22
3.5.2	Tratamientos en estudio.....	23
3.6	Manejo del Experimento	23
3.6.1	Toma de muestra de suelo rizosférico	23
3.6.1.1	Sitios de recolección.....	25
3.6.1.2	Aislamiento de actinomicetos	26
3.6.1.3	Caracterización morfológica	27
3.6.1.4	Caracterización Bioquímica	27
3.6.1.4.1	Caracterización microscópica tinción de Gram.....	27
3.6.1.4.2	Prueba de la Catalasa.....	28
3.6.1.4.3	Solubilización de potasio.....	28
3.6.1.4.4	Prueba de solubilización de fosfatos	28
3.6.1.4.5	Hidrolisis de la Urea.....	29
3.6.1.5	Evaluación de las actividades de actinomicetos relacionadas con antagonismo.....	29

3.6.1.6	Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial (%).....	30
3.6.1.7	Obtención de sobrenadantes.....	31
3.6.1.8	Detección de actividades promotoras de crecimiento vegetal (PGP) <i>in vitro</i>	32
3.6.1.8.1	Preparación del material vegetal y desarrollo de los ensayos de inoculación	32
3.6.2	Datos Tomados y Formas de Evaluación	33
3.6.2.1	Morfología de cepa.....	33
3.6.2.2	Porcentaje de germinación de semillas de maíz	33
3.6.2.3	Longitud radicular (cm).....	33
3.6.2.4	Longitud de hipocótilo (cm).....	33
3.6.2.5	Peso fresco (g)	34
3.6.2.6	Peso seco (g).....	34
3.7	Tratamiento de los datos.....	34
3.8	Recursos Humanos y Materiales	34
3.8.1	Recursos humanos.....	34
3.8.2	Materiales de Laboratorio	35
3.8.3	Equipos de Laboratorio	35

Capítulo IV. Resultado y Discusión

4.1	Resultados	37
4.1.1	Localización geográfica del muestreo	37
4.1.2	Aislamiento y caracterización de actinomicetos rizosféricos.....	38

4.1.3	Caracterización de cepas de actinomicetos	41
4.1.4	Caracterización Bioquímica	41
4.1.4.1	Actividad antifúngica in vitro de los actinomicetos	42
4.1.4.1.1	Efecto antagonista de actinomicetos sobre (<i>Fusarium</i> sp.)	42
4.1.4.1.2	Efecto antagonista de actinomicetos sobre (<i>L. theobromae</i>)	44
4.1.4.1.3	Efecto de sobrenadantes de actinomicetos sobre (<i>Fusarium</i> sp.)	46
4.1.4.1.4	Efecto de sobrenadantes de actinomicetos sobre (<i>L. theobromae</i>)	47
4.1.5	Porcentaje de germinación en semillas de maíz	49
4.1.6	Longitud radicular de plántulas de maíz	50
4.1.7	Longitud hipocótilo de plántulas de maíz	51
4.1.8	Peso fresco	52
4.1.9	Peso seco	53
4.2	Discusión	55

Capítulo V. Conclusiones y Recomendaciones

5.1	Conclusiones	60
5.2	Recomendaciones	61

Capítulo VI. Bibliografía

6.1	Bibliografía	63
-----	--------------------	----

Capítulo VII. Anexos

7.1	Anexos.....	73
-----	-------------	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Esquema del análisis de varianza en semillas de maíz	22
Tabla 2. Tratamientos empleados	23
Tabla 3. Nomenclatura y lugar de procedencia de los actinomicetos.....	24
Tabla 4. Datos geográficos y agroclimáticas de recolección de muestras de suelo	25
Tabla 5. Características morfológicas de los actinomicetos aislados de la rizósfera	39
Tabla 6. Características morfológicas de actinomicetos aislados de la rizósfera	40
Tabla 7. Caracterización bioquímica de aislados de actinomicetos	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de localización de lugares de recolección de las muestras de suelo.	37
Figura 2. Porcentaje de recuperación de actinomicetos aislados la rizósfera.....	40
Figura 3. Características morfológicas de actinomicetos aisladas de la rizósfera.....	41
Figura 4. Porcentaje de inhibición de actinomicetos sobre el desarrollo de <i>Fusarium</i> sp.	43
Figura 5. Actividad antagónica de actinomicetos frente a <i>Fusarium</i> sp.	44
Figura 6. Actividad antagónica de actinomicetos frente a <i>L. theobromae</i>	45
Figura 7. Inhibición del crecimiento de <i>L. theobromae</i> frente a actinomicetos.	45
Figura 8. Efecto de sobrenadantes de actinomicetos sobre el desarrollo de <i>Fusarium</i> sp.	46
Figura 9. Capacidad antagónica de sobrenadantes de actinomicetos contra a <i>Fusarium</i> sp. ...	47
Figura 10. Efecto de sobrenadantes de actinomicetos frente a <i>L. theobromae</i>	48
Figura 11. Capacidad antagónica de sobrenadantes de actinomicetos contra <i>L. theobromae</i> ..	48
Figura 12. Porcentaje de germinación de semillas de maíz con actinomicetos.....	49
Figura 13. Longitud radicular de plántulas de maíz inoculadas con actinomicetos.	50
Figura 14. Efecto de actinomicetos en la longitud de raíces en plántulas de maíz.	51
Figura 15. Longitud radicular de plántulas de maíz inoculadas con actinomicetos.	52
Figura 16. Peso fresco de plántulas de maíz inoculadas con actinomicetos seleccionados.	53
Figura 17. Peso seco de plántulas de maíz inoculadas con actinomicetos seleccionados.	54

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A. Aislamiento de actinomicetos de muestras de suelo de rizósfera.	73
Anexo B. Caracterización morfológica de aislados de actinomicetos	73
Anexo C. Caracterización microscópica tinción de Gram en cepas de actinomicetos	74
Anexo D. Desarrollo de pruebas bioquímicas en actinomicetos	74
Anexo E. Ensayo de pruebas antagonista de actinomicetos	75
Anexo F. Detección de actividades (PGPr) de actinomicetos in vitro.	75
Anexo G. Análisis de varianza de efecto antagonista de actinomicetos sobre <i>Fusarium</i> sp. ...	76
Anexo H. Análisis de varianza de efecto antagonista de actinomicetos sobre <i>L. theobromae</i> . 76	
Anexo I. Análisis de varianza de sobrenadantes sobre <i>Fusarium</i> sp.	76
Anexo J. Análisis de varianza de actinomicetos sobrenadantes sobre <i>L. theobromae</i>	77
Anexo K. Análisis de varianza de porcentaje de germinación de semillas de maíz.	77
Anexo L. Análisis de varianza de longitud de radicular de plántulas de maíz.	77
Anexo M. Análisis de varianza longitud hipocótilo de plántulas de maíz.	78
Anexo N. Análisis de varianza peso fresco	78
Anexo O. Análisis de varianza peso seco	78

CÓDIGO DUBLÍN

Título:	Caracterización de actinomicetos rizosféricos con potencial benéfico en semillas de maíz (<i>Zea mays</i>)
Autor:	Miquinga Tucres Ana María
Palabras clave:	Actinomicetos, rizósfera, bioestimulante, controlador biológico, maíz.
Fecha de publicación:	
Editorial:	
Resumen:	Resumen.- Los actinomicetos que colonizan la rizósfera de las plantas son importantes en la promoción del crecimiento vegetal mediante la producción de sustancias biológicamente activas. El objetivo de este estudio fue caracterizar actinomicetos de la rizósfera, evaluar su capacidad bioestimulante como promotora de crecimiento vegetal en maíz in vitro y su potencial para controlar fitopatógenos. Se obtuvieron cincuenta y cuatro aislados de actinomicetos de muestras de suelo de cultivos cacao, aguacate y maíz colectados en zonas de Pangua, Mocache, Buena Fe y Quito, Ecuador. Los aislamientos de actinomicetos se caracterizaron morfológica y bioquímicamente en base a la solubilización de nitrógeno, fosforo y potasio(...). Abstract.- Actinomycetes that colonize the rhizosphere of plants are important in promoting plant growth through the production of biologically active substances. The objective of this study was to characterize actinomycetes from the rhizosphere, evaluate their biostimulant capacity as a plant growth promoter in maize in vitro, and their potential to control phytopathogens. Fifty-four isolates of actinomycetes were obtained from soil samples of cocoa, avocado and maize crops collected in areas of Pangua, Mocache, Buena Fe and Quito, Ecuador. The actinomycete's isolations were characterized morphologically and biochemically based on the solubilization of nitrogen, phosphorus and potassium(...).
Descripción:	Hojas: dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM 6162
URL:	

INTRODUCCIÓN

Las actividades agrícolas en Ecuador se basan en la producción a través de los recursos primarios que se obtienen directamente de la naturaleza (1). El maíz (*Zea mays L*) es uno de los cultivos fundamentales para la alimentación de los ecuatorianos debido a que su producción proporciona materia prima para la agricultura y el consumo humano. La productividad de las provincias maiceras, el mayor nivel de rendimiento se encuentra en la provincia de Los Ríos, con 5,5 t ha⁻¹ sin embargo, es factible alcanzar un rendimiento promedio de 10 t ha⁻¹ de grano (2).

La producción del cultivo de maíz se ha visto limitada fundamentalmente por la tecnología empleada en los suelos; la aplicación intensiva de fertilizantes químicos, herbicidas y pesticidas (3); reducen la capacidad productiva del suelo al reducir sus nutrientes y contaminar las aguas superficiales originando eutrofización y al lixivarse a las aguas subterráneas pueden ser ingeridos por los humanos causando problemas a la salud, perjudica a la diversidad biológica; por tanto, reduce su potencial para lograr una agricultura sostenible y una mayor seguridad alimentaria (4).

En agricultura los microorganismos son imprescindibles para mantener la fertilidad del suelo, para desarrollar cultivos sanos y vigorosos, de hecho, los que carecen de flora microbiana son suelos pobres y desequilibrados (5). Los actinomicetos representan un grupo de microorganismos distribuidos en ecosistemas naturales y tienen gran importancia en la degradación de materia orgánica, están involucrados en procesos de fitorremediación, formación de humus y fermentación del compost (6).

Los actinomicetos son microorganismos eficientes para la producción de compuestos involucrados en el control biológico, así como solubilizar fosfato y promover el crecimiento y

desarrollo vegetal. Estos microorganismos se destacan por la producir sideróforos, ácido indol acético y giberelinas enzimas involucradas en las capacidades para promover el desarrollo y crecimiento vegetal (7).

Entre los actinomicetos el género *Streptomyces* son de gran interés en cuanto a la producción de antibióticos, tienen la capacidad de sintetizar metabolitos secundarios, presentando actividad antagonista, inhiben notablemente el desarrollo de microorganismos fitopatógenos sin ocasionar efectos tóxicos a las plantas (8). Especies como *S. olivaceoviridis*, *S. rimosus*, *S. rochei*, y *S. griseoviridis* están ampliamente reportadas en la literatura por su potencial de crecimiento vegetal pues tienen la capacidad de mejorar el crecimiento de las plantas al aumentar la germinación de semillas y el alargamiento de raíces en cultivos tanto en sorgo, trigo y arroz inoculadas con cepas de *Streptomyces* (9).

Por lo anterior la presente investigación permitirá identificar actinomicetos de la rizósfera con la perspectiva de aplicarlas en los cultivos de maíz como potencial benéfico generando valor agregado a la biodiversidad y su aporte a la agricultura. Por lo tanto, el estudio y uso de actinomicetos se convierte en una alternativa biológica que a través de diversos mecanismos benefician el desarrollo de las plantas, aumentan el rendimiento, compiten con fitopatógenos; considerándolos como una alternativa que contribuye al buen desarrollo agrícola y protege el medio ambiente.

CAPÍTULO I

CONCEPTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACION

1.1 Planteamiento del problema

Entre las prácticas agronómicas que se realizan para el cultivo de maíz se encuentra la aplicación de agroquímicos; y aunque esta actividad garantiza la producción, existen una serie de problemas relacionados con su uso en los suelos porque tiene efectos negativos como desgaste físico, pérdida de nutrientes, humus y de la actividad microbiana. Lo descrito anteriormente provoca contaminación ambiental, con una afectación a los agricultores y consumidores finales.

Diagnóstico

La tecnología para mantener y aumentar la fertilidad del suelo en los cultivos de maíz incrementa el uso intensivo de agroquímicos, lo que no asegura la productividad agrícola y se traduce en rendimientos marginales que provocan contaminación y destrucción en la rizósfera, creando con el tiempo un sistema de producción insostenible en lugar de ser beneficioso.

Formulación del Problema

¿Qué tipo de actinomicetos rizosféricos tienen el potencial de ser beneficioso para las semillas de maíz?

Sistematización del problema

¿Cuáles son las características que exhiben los actinomicetos vinculados con la rizosfera?

¿Qué cepas de actinomicetos aisladas en la rizósfera son antagónicas a *Fusarium* sp. y *Lasiodiplodia theobromae*?

¿Qué potencial bioestimulante podrían tener los aislados de actinomicetos para estimular el desarrollo vegetal en plántulas de maíz?

1.2 Justificación

El maíz es un cultivo muy indispensable, no solo por constituir gran parte de la dieta diaria de la población ecuatoriana sino, también por ser una de las primordiales fuentes de ingresos económicos. Los efectos de los agroquímicos tienen un impacto negativo en el medio ambiente, por lo que es necesario implementar nuevas prácticas que satisfagan las necesidades productivas y, al mismo tiempo, promuevan el equilibrio en los ecosistemas. Esto se puede lograr por medio de prácticas ecológicamente racionales, como el uso de microorganismos.

El suelo es un sistema dinámico e importante en la producción agrícola, y los microorganismos que viven allí son cruciales para el proceso de producción de alimentos. En base a esto, es importante estudiar los actinomicetos porque mejoran la fertilidad del suelo, ayudan en la transformación de los nutrientes dispuestos en el suelo para que puedan ser asimilados por las plantas y están involucrados en una variedad de procesos biológicos como la descomposición y la liberación de materia orgánica y son controladores biológicos. Mediante el uso de estos microorganismos, es posible lograr una agricultura sostenible reduciendo el uso de pesticidas, disminuyendo el efecto ambiental y mejorando la seguridad alimentaria, lo que se traduciría en mejores beneficios económicos para los agricultores.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Caracterizar actinomicetos rizosféricos con potencial benéfico en semillas de maíz (*Zea mays*).

1.3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar las cepas de actinomicetos benéficos a partir de la rizosfera de cultivos.
- Evaluar *in vitro* el potencial antagónico de las cepas de actinomicetos contra los hongos fitopatógenos *Fusarium* sp. y *Lasiodiplodia theobromae*.
- Determinar *in situ* la capacidad bioestimulantes de los actinomicetos seleccionados en semillas de maíz.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 Marco Conceptual

2.1.1 *Fosfatos*

Se utiliza como fertilizante en la agricultura tradicional, cuando se reduce a partículas finas libera elementos como fósforo, aluminio, magnesio, sodio, hierro, etc. Aunque es una alternativa natural a la fertilización, se disuelve demasiado lentamente para satisfacer las necesidades de las plantas (19).

2.1.2 *El maíz*

El maíz duro es uno de los cultivos más destacados en el comercio nacional para la producción de balanceados en la industria animal, especialmente para la avicultura comercial. Se cultiva mayoritaria y ampliamente en Los Ríos, Manabí, Guayas, El Oro y Loja (22).

2.2 Marco Referencial

2.2.1 *Suelo*

El suelo es un medio nato con un límite y no renovable, que proporciona diversos servicios ecosistémicos o ambientales, por ejemplo, aquellos relacionados con la participación en ciclos biogeoquímicos de elementos críticos para la vida (p. ej., carbono, nitrógeno, fósforo). Sin embargo, lo más ampliamente reconocido es que los suelos son el sitio natural para la producción de alimentos y materias primas de las que dependen las sociedades mundiales (10).

La rizósfera es el ecosistema terrestre más grande de este ecosistema, con un metro cuadrado de productores primarios (pastos). Este metro cuadrado corresponde a una superficie subterránea que es (al menos) tres veces más grande que la rizósfera. Generalizando este aspecto a cada parte de la tierra con vegetación, concluimos que la rizósfera es el ecosistema terrestre más extenso (11).

La rizósfera de las plantas es una fina capa de suelo adherida en las paredes de las raíces, allí se llevan a cabo grandes reacciones benéficas plantas-microorganismos en donde las bacterias asociadas al crecimiento de las plantas son denominadas bacterias promotoras del crecimiento en plantas PGPB (12).

2.2.2 *Actinomicetos*

Los actinomicetos son bacterias Gram-positivas filamentosas; principalmente aeróbicos, anaeróbico facultativo, y pertenece al filo Actinobacteria y al orden Actinomycetes (13). Generalmente se encuentran en la mayoría del planeta tierra en diferentes zonas ambientales ayudando a la descomposición de compuestos a base de carbono, dicho grupo microbiano ha recibido considerable atención en varias áreas de producción como los son en la fabricación de medicinas y aditivos para alimentos, en la biotecnología para el análisis de aguas, suelos y últimamente en la agricultura, debido a que son fuente importante de sustancias con actividad biológica de gran utilidad para el hombre (14).

Los actinomicetos han jugado un papel importante en el desarrollo de la biotecnología, muchos de ellos forman micelio aéreo y esporas, y su crecimiento en cultivo líquido raramente presenta la turbidez asociada con las bacterias unicelulares, sino que durante el crecimiento se forman filamentos, grumos o esferas de micelio. Los filamentos de los actinomicetos son mucho más delgados que aquellos formados por los hongos (15).

Las bacterias unicelulares y los hongos filamentosos se pueden distinguir y dividir en dos grupos importantes en función de sus características morfológicas. Durante algún tiempo, se los consideró miembros del grupo de los hongos filamentosos debido a las similitudes en la forma en que crecen y se desarrollan, incluida la formación de un filamento llamado hifa con ramificaciones extensas (micelio), que muchos de ellos forman micelio aéreo y esporas, su crecimiento en cultivo líquido rara vez presenta la turbidez asociada con las bacterias unicelulares, pero durante el crecimiento se forman filamentos, grumos o esferas de micelio (16).

2.2.2.1 Condiciones de crecimiento de los actinomicetos

La adición de materia orgánica al suelo estimula el crecimiento y la actividad de los actinomicetos. Los suelos alcalinos y neutros han demostrado ser más favorables para el crecimiento de estas bacterias, el intervalo de pH más recomendado para la actividad de estos organismos está entre 6.5 y 8.0, en suelos con un pH inferior a 5.0 se observa frecuentemente su ausencia. Los actinomicetos son predominantemente aerobios y se desarrollan en suelos bien aireados (14).

2.2.2.2 Los actinomicetos como agentes de control biológico

Los actinomicetos han sido descritos como agentes de control biológico debido a su capacidad para producir enzimas biodegradantes tales como quitinasas, dextranasas, peroxidasas, etc., las cuales están involucradas en el parasitismo fúngico por parte de estos microorganismos. Las especies de *Streptomyces* han sido descritas como colonizadores de la rizosfera capaces de controlar biológicamente hongos fitopatógenos, produciendo sideróforos, sustancias que promueven el crecimiento de las plantas *in vitro*, promueven la nodulación y

ayudan a absorber hierro durante la fijación de nitrógeno. En las leguminosas, indirectamente ayuda a promover el crecimiento de las plantas (17).

2.2.3 Solubilización de fosfatos

El fósforo es uno de los elementos limitantes para el desarrollo de algunas plantas en muchos suelos agrícolas porque, a pesar de ser abundante en los suelos, el fósforo soluble se encuentra en bajas concentraciones y precipita fácilmente al reaccionar con iones como el calcio, el hierro o el aluminio, por lo que su disponibilidad es exclusiva para las plantas. Algunos microorganismos disuelven el fósforo insoluble a través de la fabricación de ácidos orgánicos, fosfatasas y quelación (18).

En muchos lugares la roca fosfórica se utiliza como fertilizante en la agricultura tradicional, cuando se reduce a partículas finas libera elementos como fósforo, aluminio, magnesio, sodio, hierro, etc. Aunque es una alternativa natural a la fertilización, se disuelve demasiado lentamente para satisfacer las necesidades de las plantas. Para el desarrollo de una agricultura sustentable es necesario establecer un método alternativo para reducir el uso de fertilizantes reemplazándolos por productos naturales, y fortalecer la investigación sobre la aplicación de los actinomicetos como tecnología en el campo de la biotecnología (19).

Los actinomicetos a través de la descomposición de las rocas generan la movilización de nutrientes esenciales como fósforo y metales como sodio (Na), potasio (K), magnesio (Mg), calcio (Ca), manganeso (Mn), hierro (Fe), cobre (Cu), zinc (Zn), cobalto (Co), y níquel (Ni), a partir de la producción de metabolitos como ácidos orgánicos, por esta razón, estos microorganismos desempeñan un papel importante en ciclos biogeoquímicos de nutrientes esenciales (20).

2.2.4 El maíz (*Zea mays* L.)

El cultivo de maíz es considerado uno de los más importantes del mundo por su productividad, seguido por los cultivos de trigo y arroz en segundo y tercer lugar respectivamente. Esto tiene trascendencia mundial, según el USDA, destacando que países como EE. UU. y China respondieron por un equivalente del 36% y 21% de la producción en el período 2017-2018 (21).

En Ecuador, el maíz duro es uno de los cultivos más destacados en el comercio nacional para la producción de balanceados en la industria animal, especialmente para la avicultura comercial. Se cultiva mayoritaria y ampliamente en Los Ríos, Manabí, Guayas, El Oro y Loja. A partir de 2016, se evidencia un aumento sustancial en la producción de maíz duro seco del país, lo que ha reducido la brecha entre el consumo aparente y la producción nacional, lo que sugiere que Ecuador será autosuficiente en el corto o largo plazo (22).

2.2.4.1 Descripción biológica

El maíz es conocido como una planta monocotiledónea, y está más distribuido en áreas tropicales, donde las condiciones de suelo y clima son propicias para su crecimiento, la raíz principal es una raíz adventicia fibrosa. Su tallo herbáceo está formado por nudos de longitud desigual y entrenudos, siendo los entrenudos de dos tipos, el primero está ubicado en la parte superior y es cilíndrico, y la parte inferior tiene rasgos cortos (23).

Las hojas son de aspecto rugoso, onduladas, alargadas y alternas entre sí, en su base crecen espigas. Pueden tener de 12 a 24 hojas. Sus inflorescencias se caracterizan por flores masculinas y femeninas separadas en la misma planta, por lo que se denomina planta monoica.

Los racimos o espigas, conocidos como panículas, son flores masculinas, cada una de las cuales consta de tres estambres que contienen el polen (24).

La formación de granos de polen son inflorescencias o espigas femeninas, y las semillas distribuidas linealmente están protegidas por hojas verdes o pistilos agrupados. Su fruto es una cariósipide brillante, y sus semillas pueden ser amarillas, moradas, blancas, rojas. Cada semilla formada u ovario maduro consta de tres capas: el pericarpio o cubierta, el endospermo y el embrión (25).

2.2.5 *Requerimientos edafoclimáticos del maíz*

Para que el desarrollo fenológico de los cultivos de maíz sea favorable, debe existir un suelo franco arenoso húmedo, rico en nutrientes, bien drenado, que permita un pH entre 5.8 y 6.8 aproximadamente. Las semillas al momento de la siembra necesitan una temperatura de 16 a 18°C. para una germinación óptima (26).

La temperatura ideal para que las plantas de maíz germinen es de alrededor de 10 ° C porque a temperaturas más bajas provoca un estrés tal que a temperaturas inferiores a 5 ° C pueden morir. Durante el crecimiento vegetativo a temperaturas inferiores a los 15 ° C, la planta ralentiza su desarrollo y se vuelve morada porque no absorbe fósforo, elemento difícilmente asimilable a estas temperaturas (27).

La luz solar que reciben las plantas a través del proceso de fotosíntesis produce MS (materia seca) en el grano, que es el resultado buscado por este cultivo para altos rendimientos, y la radiación solar activa los mecanismos que convierten la energía lumínica en energía química, produciendo energía aprovechable por la planta. Por ello, hay que tener en cuenta las

fechas de plantación para favorecer el máximo número de horas de luz que reciben las plantas (28).

Los cultivos de maíz requieren precipitaciones de alrededor de 500 a 800 mm de agua en condiciones normales para cumplir con cada fase fenológica. Se debe tener en cuenta que la cantidad máxima de agua antes mencionada se requiere 15 días antes de la aparición de la inflorescencia y 30 días después de la aparición de la inflorescencia, ya que es allí donde se forman las mazorcas. Dependiendo de la falta de agua, esto puede reducir la cantidad de floraciones por día entre un 6 % y un 8 % (29).

2.2.6 Antecedentes de Investigaciones en Contexto

2.2.6.1 Respuesta del cultivo del tomate a la aplicación de actinomicetos

Entre octubre de 2015 y enero de 2016, bajo las condiciones de la huerta intensiva “El Gigante”, en el municipio de Manzanillo, provincia Granma, en suelos mixtos, con el objetivo de evaluar la respuesta agronómica del cultivo de tomate *Solanum lycopersicum* L. a la aplicación de tres cepas nativas de actinomicetos A23M12, A18M7 y A5M4. Se evaluaron variables de crecimiento, altura de planta, número promedio de frutos por planta, masa fresca promedio de frutos y rendimiento. También se realizó una evaluación económica de los resultados. La cepa A23M12 mostró los mejores resultados entre todas las variantes de crecimiento estudiadas con un rendimiento de 43.8 t ha⁻¹. La inoculación con cepas de actinomicetos nativos tuvo un efecto positivo en el crecimiento y progreso de las plantas de tomate en condiciones de campo, con todos los indicadores significativamente mejorados en comparación con las plantas de control (es decir, no inoculadas) (30).

2.2.6.2 *Streptomyces* de la rizósfera de maíz como promotor de crecimiento vegetal

Evaluaron el potencial de los actinomicetos aislados de la rizósfera de maíz para promover el crecimiento vegetal, incluida su capacidad para producir ácido indol acético, para promover el crecimiento de brotes de maíz, disolver fosfato y crecer en medios libres de nitrógeno. Treinta aislamientos de actinomicetos han sido identificados de la rizósfera de maíz. Mediante el empleo del método ragdoll, demostró que nueve cepas fueron capaces de promover significativamente el crecimiento de los brotes de maíz bajo cinco parámetros de crecimiento, incluyendo la longitud de la raíz primaria, la longitud del tallo, el número de raíces laterales, el peso húmedo y el peso seco. Veintiún aislados de actinomicetos (70%) pudieron disolver fosfato en medio pikovskaya que contenía fosfato tricálcico. Además, 30 aislamientos pudieron crecer en medios libres de nitrógeno, lo que indica su capacidad para fijar nitrógeno. En base a sus propiedades potenciales, estos aislados de actinomicetos tienen el potencial de desarrollarse aún más como biofertilizantes para el cultivo sostenible de maíz (31).

2.2.6.3 Actividad bioestimulante de actinomicetos aislados de la rizosfera de soja

En la actividad bioestimulante de actinomicetos aislados de la rizósfera de soja. Cincuenta y tres cepas de actinomicetos se aislaron con éxito de la rizósfera de soja utilizando dos medios de cultivo, agar ácido húmico- vitamina (HVA) y agar de caseína de almidón (SCA), entre los aislados el (34%) fueron capaces de producir ácido indol acético en el rango de 2.08 ppm a 16.70 ppm. Los ensayos de crecimiento de soja *in vitro* utilizando el método ragdoll produjeron siete aislamientos de actinomicetos que mejoraron significativamente tres parámetros de crecimiento de la planta, incluidos el hipocótilo y la longitud de la raíz, y el número de raíces laterales. De los siete aislados de actinomicetos, cinco fueron capaces de crecer en un medio libre de nitrógeno y solubilizar fosfato. Según el análisis de la secuencia del ARNr 16S, los cinco actinomicetos seleccionados eran altamente homólogos a diferentes especies de *Streptomyces* (9).

2.2.6.4 Evaluación de crecimiento vegetal en actinomicetos de la rizósfera (*Solanum* sp.)

La evaluación de crecimiento vegetal en actinomicetos aislados de la rizósfera de cultivos de papa colectados de la zona de San Jerónimo - Andahuaylas. Para ello, se identificaron 4 rasgos (solubilización de fosfato, fijación de nitrógeno, producción de ácido indol acético y sideróforo). Del total de aislados de actinomicetos, 33 cepas solubilizaron fosfatos, 42 fijaron nitrógeno, 10 produjeron ácido indol acético y 18 fueron productores de sideróforos; las cepas AND 13 y AND 16 son las que mejor desempeño obtuvieron en pruebas como promotoras de crecimiento vegetal. La cepa de actinomiceto AND 13; fue identificada por pruebas bioquímicas y amplificación del gen 16S ADNr como *Streptomyces* sp. Los resultados sugieren que los actinomicetos pueden usarse en programas de biofertilización en cultivo de papa como una solución alternativa al uso excesivo de agroquímicos (32).

2.2.6.5 Aislamiento, control biológico y capacidad bioestimulante de (*Streptomyces*)

El aislamiento, control biológico y capacidad bioestimulante de *Streptomyces* se debe a la producción de sideróforos y ácido indolacético (IAA) y la solubilización de fosfato. Se aislaron once cepas de muestras de suelo en Arabia Saudita mediante el método de dilución y se identificaron morfológicamente, mediante técnicas de secuenciación de ARNr 16S. La capacidad de crecimiento de las plantas se analizó con bases de producción de sideróforos, AIA y solubilidad de fosfato. La cepa HM10 tiene un fuerte efecto antagónico sobre el hongo patógeno *Colletotrichum gloeosporides* y el halo de inhibición es mayor de 15 mm, en términos de producción de IAA, esta cepa de producción más eficiente (33).

2.2.6.6 Identificación de actinomicetos de la rizósfera para el biocontrol de (*Valsa mali*)

La identificación de actinomicetos de la rizósfera para el biocontrol de *Valsa mali*. De las muestras tomadas de la rizósfera de los manzanos de Qinling en China, se recuperaron 193 cultivos de actinomicetos. Seis de estos aislados de actinomicetos mostraron una actividad antagónica, redujeron en gran medida las hifas y la germinación de conidios hacia *V. mali* (porcentajes de inhibición superiores al 50%). El aislamiento de la cepa SL01 presentó el mayor potencial para el biocontrol basado en sus efectos inhibitorios sobre el crecimiento de hifas, la germinación de conidios y el desarrollo de enfermedades causadas por *V. mali*. Sobre la base de las características morfológicas, bioquímicas y del análisis del gen 16S ADN_r, la cepa SL01 se identificó como *Streptomyces longissimus* (34).

2.2.6.7 Aislamiento y biocontrol de actinomicetos del manglar de Pahang, Malasia

El aislamiento y biocontrol de los actinomicetos del bosque de manglar de Pahang, Malasia. Se realizaron pretratamientos de muestras de sedimentos de siete sitios diferentes utilizando métodos de calor húmedo y calor seco, se utilizó ocho medios de aislamientos. En un total se recuperaron 4850 aislamientos de actinomicetos, con el medio agar inorgánico de sal-almidón mostro el mayor porcentaje de recuperación (31.7%), seguido del agar de aislamiento de actinomicetos (24.1%), después de ambos pretratamientos, los aislamientos tipo *Streptomyces* y *Micromonospora* fueron los predominantes. Las actividades antagónicas de actinomicetos se evaluaron de un total de 78 aislados fueron activos contra al menos uno de los organismos de prueba, entre ellos, el (28.2%) exhibió actividad antibacteriana, el (23.1%) exhibió actividad antifúngica y el (48.7%) mostro ambos. La presencia de un número relativamente grande de aislamientos de actinomicetos bioactivos sugiere que el bosque de manglares de Pahang es una fuente potencial de actinomicetos con capacidad biocontroladora (35).

2.2.6.8 Capacidad bioestimulante y biocontrol de actinomicetos de la rizósfera del olivo

La capacidad bioestimulante y biocontrol de actinomicetos de la rizósfera donde se aislaron actinomicetos con características promotoras de crecimiento vegetal, efectos antagónicos sobre organismos patógenos clínicos y vegetales de la rizósfera del olivo. Se aislaron once cepas de actinomicetos rizosféricos por sus características de potencial del crecimiento vegetal incluyendo, la producción de ácido indol acético, solubilización de fosfato y sideróforos, con actividades antagónicas frente a un conjunto de bacterias patógenas, hongos y levaduras. Todos los actinomicetos se identificaron de acuerdo con las regiones de ARNr 16S reconociéndose cuatro diferentes especies de *Streptomyces*, pero según el análisis de ácidos grasos, habría al menos seis diferentes organismos. Los actinomicetos aislados de la rizósfera del olivo fueron una herramienta prometedora para aplicaciones agrícolas y clínicas (36).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología y Biología Molecular, ubicados en el Campus “La María” perteneciente a la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), ubicada en el km 7,5 de la vía Quevedo- El Empalme, provincia de Los Ríos, Ecuador. Ubicada a 01° 04’ 49” de latitud sur y 79° 30’ 05” de longitud oeste y, a una altura de 75 msnm.

3.2. Tipo de investigación

La investigación es de tipo experimental, puesto que se realizó la manipulación directa de las variables en estudio: actinomicetos rizosféricos y su beneficio potencial, a través de análisis de laboratorio, los microorganismos fueron identificados y caracterizados de acuerdo con todas las normas nacionales e internacionales que rigen la microbiología del suelo y medio ambiental.

3.3. Métodos de investigación

Se utilizó el método inductivo en la evaluación, identificación y caracterización de actinomicetos en estudio, el método analítico se empleó para la interpretación de los resultados y de las fuentes literarias utilizadas. Por último, se utilizó la observación científica durante todo el proceso de la investigación para evaluar los procesos a través la percepción directa de los objetos y fenómenos.

3.4. Fuentes de recopilación de información

La información primaria se obtendrá de los datos derivados de las observaciones de las unidades experimentales y la recolección directa de los datos registrados durante la evaluación de variables. El uso de libros, revistas científicas, publicaciones, diarios, informes técnicos para maximizar los recursos de investigación, tratando de minimizar los riesgos dentro del área de trabajo y los procedimientos de prueba de laboratorio se realizaron utilizando fuentes secundarias.

3.5. Diseño de investigación

3.5.1 *Diseño para aplicación de actinomicetos en semillas de maíz in vitro*

Se aplicó un Diseño Completamente al azar (DCA) para evaluar la aplicación de actinomicetos en semillas de maíz, generando 10 tratamientos en tres replicas cada uno. Todas las variables se sometieron al análisis de varianza (ADEVA) para determinar la significancia estadística y la prueba de Duncan 95% de probabilidad para la comparación de medias. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el Software “Infostat” versión estudiantil 2020.

Tabla 1

Esquema del análisis de varianza en semillas de maíz

Fuentes de variación	Grados de libertad	
Tratamientos	(t-1)	9
Error experimental	t (r-1)	20
Total	tr-1	29

3.5.2 *Tratamientos en estudio*

Se establecieron diez tratamientos que corresponde a las cepas aisladas de actinomicetos. Los actinomicetos fueron inoculados en semillas de maíz; incluido un tratamiento que corresponde al control donde no se inoculó ningún microorganismo.

Tabla 2

Tratamientos empleados

Tratamiento 1	Cepa 1
Tratamiento 2	Cepa 2
Tratamiento 3	Cepa 3
Tratamiento 4	Cepa 4
Tratamiento 5	Cepa 5
Tratamiento 6	Cepa 6
Tratamiento 7	Cepa 7
Tratamiento 8	Cepa 8
Tratamiento 9	Cepa 9
Tratamiento 10	Control

3.6 Manejo del Experimento

3.6.1 *Toma de muestra de suelo rizosférico*

Para la investigación se realizaron muestreos en dos regiones diferentes de Ecuador, entre los meses de marzo y abril del 2022:

Región Sierra: Provincia de Pichincha, Cantón Quito, Parroquia San Antonio de Pichincha, Barrio Santo Domingo y de la Provincia de Cotopaxi, Cantón Pangua, Parroquia Moraspungo, Rcto. Calope de Muñoz dentro de la Finca “Florcita”.

Región Costa: Provincia Los Ríos, Cantón Buena Fe, Parroquia Aguas Blanca en la Finca Muñoz García y en el Cantón Mocache Campus “La María” de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, localizada en el km 7,5 de la vía Quevedo-El empalme.

Las muestras fueron recolectadas de 30 cm de profundidad de cultivos de maíz, cacao y aguacate. Las muestras obtenidas estaban conformadas por la raíz y el suelo alrededor de esta, recolectando aproximadamente 200g de cada muestra, se colocaron en bolsas de polietileno estériles, fueron transportadas en hielera al laboratorio de microbiología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, en condiciones asépticas.

Cada una de las muestras recibió un nombre en función de su ubicación geográfica, lo que se logró mediante el uso de un dispositivo GPS, y se marcó específicamente en función de su ubicación en relación con el área y se elaboró un mapa de localización de los muestreos.

Tabla 3

Nomenclatura y lugar de procedencia de los actinomicetos

Provincia	Cantón	Lugar de procedencia	Nomenclatura
Los Ríos	Buena Fe	Rizosfera cultivo de cacao	B
	Mocache	Rizosfera cultivo de maíz	M
Pichincha	Quito	Rizosfera cultivo de aguacate	SQA
Cotopaxi	Pangua	Rizosfera cultivo de cacao	A

Nota: A cada muestra se asignó la nomenclatura de acuerdo con el lugar de procedencia.

3.6.1.1 Sitios de recolección

Tabla 4

Datos geográficos y agroclimáticas de recolección de muestras de suelo

Zona de recolección de muestras		Coordenadas Geométricas	Precipitación(mm)	Temperatura(°C)	Humedad relativa (%)	Heliofanía (horas)	Altitud(msnm)	Superficie(km ²)
Provincia	Cantón							
Los Ríos	Buena Fe	0°53'27"S 79°29'59"O	163,5	24,9	83,4	4,82	102	569
	Mocache	01°04'04"S 79°30'05"O	666	23	90	3,53	45	572,3
Pichincha	Quito	0°02'20"N 78°26'58"O	312,08	13,5	82,4	-	2439	116,26
Cotopaxi	Pangua	1°04'15"S 79°18'30"O	945	22	91,6	3,75	200	646,2

Fuente: Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI)

3.6.1.2 Aislamiento de actinomicetos

El aislamiento se realizó en base a lo siguiente, de cada una de las zonas muestreadas se procedió a la recolección de tres submuestras de suelo rizosférico de cultivos seleccionados a una profundidad aproximada de 30 cm, lo anterior se procedió a desarrollarse mediante un muestreo aleatorio en zig-zag, a continuación, todas las muestras se homogenizaron y tamizaron para excluir partículas grandes de materia orgánica y mineral (35).

Se pesaron 10 g de suelo cada una de las muestras de la rizósfera recolectas, luego se colocaron en una estufa (Memmert DM500) para proceder a secarlas a 50 ° C por 1 hora, transcurrido el tiempo se pesó 1 g de la muestra seca, los cuales se colocarán dentro de un frasco de vidrio estéril que contenía 9 ml en una solución PBS (phosphate buffered saline) al 0,85% y se agito manualmente por cinco minutos, luego se procedió a colocar la mezcla homogenizada nuevamente en la incubadora durante 30 minutos a 30 ° C (37).

Una vez finalizado el periodo de incubación, se prepararon tubos eppendorf de 1.5 ml nalgene syringe con 900 µL de solución PBS al 0,85%, para preparar las diluciones con concentraciones de la mezcla desde 10^1 hasta llegar a 10^4 . Se tomaron con una micropipeta 100 µL de la muestra total y se colocaron dentro del tubo eppendorf estéril, se homogenizó la solución formada en el tubo, mediante el empleo del vórtex, obteniendo una dilución de 10^1 , y luego se repitió el proceso hasta llegar a la dilución de 10^4 .

Se utilizó el medio selectivo para la siembra de las diluciones: agar extracto de levadura-extracto de malta (ISP-2), el medio se preparó a partir de los siguientes productos químicos: bacto-yeast extract 4.0 g, bacto-malt extract 10.0 g, bacto-dextrose 4.0 g, agua destilada 1.0 Litro, y luego se agregó agar-agar 20.0 g, se ajustó el pH a 7.0. Posteriormente se esterilizó durante 15 minutos a 121° C en la autoclave (38).

En condiciones estériles, se dispensaron 15-20 ml de medio selectivo ISP-2 dentro de placas petri. Por separado, utilizando una micropipeta, se tomaron 50 μ L de cada dilución (10^1 hasta 10^4) y se sembraron sobre el medio solidificado. La suspensión bacteriana se distribuyó sobre la superficie del agar mediante el método de dispersión utilizando el asa de Drigalsky para esparcir el inóculo de manera uniforme, las cajas petri se dejaron incubar a 28 ± 2 ° C durante 7 días con un máximo de 15 días (9).

3.6.1.3 Caracterización morfológica

La caracterización morfológica de los actinomicetos se basó de acuerdo con su morfología, se eligieron las cajas con colonias que presentaban características macroscópicas como textura, forma, color del micelio aéreo y producción de pigmentos de los cuales varían desde el blanco, grisáceo hasta el crema, marrón y negro. Los actinomicetos observados fueron comparados con los descritos en el Manual de Determinación Bacteriológica de Bergey (39).

Para el aislamiento y la purificación de colonias de actinomicetos se utilizó el medio de cultivo señalado por el International *Streptomyces* Project (ISP-2). suplementado con nistatina (50 μ g/ml) y ácido nalidíxico (25 μ g/ml) para evitar la proliferación de bacterias y crecimiento de hongos. Las colonias purificadas de actinomicetos se colectaron y refrigeraron en viales más glicerina al 20% (v/v) a -20 ° C (38).

3.6.1.4 Caracterización Bioquímica

3.6.1.4.1 Caracterización microscópica tinción de Gram

Se realizó un frotis con cada cepa purificada de actinomicetos sobre un portaobjetos, luego se fijó la muestra a la flama de un mechero bunsen. Se tiñó el frotis con cristal violeta

durante 1-2 minutos, se eliminó el exceso de colorante con agua destilada y se aplicó lugol por 1 minuto. Posteriormente se lavó con agua destilada y se decolora con alcohol-acetona. El colorante de contraste (safranina) se aplicó durante 30 segundos. Finalmente se lavó la muestra con agua destilada se dejó secar y se observó al microscopio. Las bacterias Gram positivas se tiñen con color violeta, mientras que las Gram negativas se tiñen de rosado (40).

3.6.1.4.2 Prueba de la Catalasa

Las colonias purificadas de actinomicetos se ubicaron en un portaobjetos limpio y seco, se añadió sobre la colonia una gota de peróxido de hidrógeno H_2O_2 al 30% (v/v) una interpretación positiva dará como resultado la formación de burbujas (O_2), mientras que el resultado es negativo con la ausencia de burbujas (41).

3.6.1.4.3 Solubilización de potasio

Se realizó el medio Pikovskaya modificado (glucosa 10 g, nitrato de potasio 5g, cloruro de potasio 0.2 g, sulfato de amonio 0.5 g, sulfato de magnesio 0.1 g, purpura bromocresol 0.125 g, agar 15 g) durante 7 días, para la determinación en la solubilización de potasio se utilizó la metodología por (42).

3.6.1.4.4 Prueba de solubilización de fosfatos

La solubilización de fosfatos se determinó por la composición del medio agar Pikovskaya modificado (MPVK) fue (10 g de glucosa, 5 g de fosfato de calcio $Ca_3(PO_4)_2$, 0.5 g sulfato de amonio $(NH_4)_2 SO_4$, 0.2 g de cloruro de sodio NaCl, 0.2 g cloruro de potasio KCL, 0.5 g extracto de levadura, 0,1 g de sulfato de magnesio, 0.002 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.15 g de agar) suplementado con fosfato de calcio como fuente de fósforo, y púrpura de bromocresol como

indicador de pH se evaluó la formación de un halo amarillo alrededor de las colonias como resultado de la producción de ácidos orgánicos (43).

Las cepas de actinomicetos aisladas anteriormente fueron reactivadas en medio ISP-1 durante 7 días, que contenían aproximadamente (10^8 UFC/ ml^{-1}), posteriormente se añadieron 50 μ l de cada cepa a placas de agar Pikovskaya modificado y se incubó a ± 27 °C durante 7 días, todos los tratamientos se realizaron por triplicado y el experimento se efectuó tres veces. La zona con halo clarificador que rodea las colonias de actinomicetos indica actividad fosfato solubilizadora (39).

3.6.1.4.5 Hidrolisis de la Urea

Para evidenciar esta capacidad las colonias de actinomicetos fueron inoculadas en medio ISP-1 por 7 días, se recuperó 20 μ l y se cultivó en placas de petri utilizando el método de cultivo de Christensen urea agar [(g/L): peptona 1 g, cloruro de sodio 5 g, dextrosa 1 g, urea 20 g, fosfato de potasio 2 g, rojo fenol 0,012 g, agar 15 g] y se incubaron a 28 °C durante siete días (48). Un cambio de color violeta rojizo indica que la urea ha sido hidrolizada, marcando la reacción como positiva. Si la coloración inicial persiste después de que la bacteria haya sido inoculada, la prueba es negativa (43).

3.6.1.5 Evaluación de las actividades de actinomicetos relacionadas con antagonismo

Para el desarrollo del ensayo de antagonismo *in vitro* las cepas fitopatógenas *Fusarium* sp. y *Lasioidiplodia theobromae*. fueron proporcionadas por el banco cepas del laboratorio de microbiología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Para las pruebas antagónicas, se reactivaron los micelios de los hongos fitopatógenos que estaban conservados en glicerol al 20% a -20°C incubándolos en papa dextrosa agar PDA a 28 °C en oscuridad durante siete días.

Para realizar el ensayo de enfrentamiento, los actinomicetos seleccionados fueron reactivados en medio ISP-2 para la obtención de cepas jóvenes, obtenido los aislamientos de cada uno de los actinomicetos fueron sembrados con una azada en los cuatro puntos cardinales a una distancia de 3 cm de distancia del centro de la caja petri, utilizando en medio agar PDA, luego se colocó un tarugo de (Ø 4 mm) de diámetro de cada hongo fitopatógeno *Fusarium* sp y *L. theobromae* respectivamente. Las cajas fueron incubadas a 28 ° C durante cinco a diez días (44).

3.6.1.6 Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial (%)

Esta variable se calculó midiendo el crecimiento fúngico radial en los tratamientos en (cm) siete días después de la inoculación con un calibrador vernier, incubados de manera invertida para evitar contaminación y transpiración de las cajas Petri. Para efectos de la recolección de datos, se aplicó la fórmula de porcentaje de inhibición mediante comparación con una placa control (hongo sin antagonista), reportándose el promedio por placa como una repetición (45).

El porcentaje de inhibición de crecimiento radial se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{(\text{crecimiento del testigo} - \text{crecimiento del tratamiento})}{\text{crecimiento del testigo}} * 100$$

Donde:

% inhibición = Porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno.

Crecimiento del testigo = Radio de la colonia del fitopatógeno (testigo)

Crecimiento del tratamiento = Radio de la colonia del fitopatógeno creciente frente al actinomiceto.

3.6.1.7 Obtención de sobrenadantes

Los aislamientos de los microorganismos seleccionados se reactivaron colocando 30 µl de suspensión de actinomicetos en 20 ml de caldo de extracto de levadura y glucosa (1 g/l de extracto de levadura, 4 g/l peptona de soya, glucosa 5 g/l, 10 g/l de almidón y 1 g/l de carbonato de calcio (CaCO₃), en un matraz de 50 ml. El matraz se incubó durante 48 horas a temperatura ambiente sobre un agitador magnético (Elmi DOS-20L Digital Orbital Shaker) a 150 revoluciones por minuto (33).

Transcurrido el tiempo de incubación 48 horas, el cultivo de actinomicetos se centrifugó en tubos falcon de 15 ml a 4000 x g durante 20 minutos para obtener el sobrenadante bacteriano libre de células, que se obtuvo descartando la parte sólida (pellet) obtenida de la centrifugación y transfiriéndolo a tubos eppendorf de 1,5 ml para otro proceso de centrifugado a 10 x g por 3 minutos. Las muestras obtenidas de sobrenadantes se filtraron con nalgane syringe de 0.2 µm, el cual se conservó a -20 ° C hasta su uso.

Para evaluar la efectividad de la actividad antagónica frente a *Fusarium sp.* y *Lasiodiplodia theobromae*, se pusieron a prueba los sobrenadantes obtenidos a partir de los actinomicetos. En una cabina de flujo laminar vertical (BIOBASE), se colocaron 10 ml de medio PDA en el fondo de una caja petri. Una vez gelificado el medio, se colocaron 200 µl del sobrenadante del cultivo concentrado en pocillos (formadas con un sacacorchos de 1 cm de diámetro y 1 cm de profundidad), y por último se colocó un tarugo (Ø 7 mm) del fitopatógeno en el centro de la placa. Se observó la actividad antagónica de las cepas de actinomicetos probadas midiendo la distancia desde el halo de inhibición.

3.6.1.8 Detección de actividades promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) in vitro

3.6.1.8.1 Preparación del material vegetal y desarrollo de los ensayos de inoculación

Para el desarrollo de los ensayos de inoculación, se evaluó la actividad promotora del crecimiento de los aislados de actinomicetos mediante el procedimiento “Ragdoll”. Cada aislado de actinomiceto se cultivó en matraces que contenían 50 ml de caldo ISP-2 y luego se incubaron en un agitador (150 rpm) a temperatura ambiente ($\pm 27^{\circ}\text{C}$) durante 7 días para obtener una concentración de (10^8 unidades formadoras de colonias $\text{UFC}/\text{ml}^{-1}$) (46).

Para la germinación e inoculación se sumergieron las semillas de maíz (hibrido Trueno NB 7443) en hipoclorito de sodio al 0.1% durante 1 minuto, transcurrido el tiempo se sumergieron en alcohol al 95 % dejando actuar durante 5 minutos; finalmente se hicieron 4 lavados con agua destilada para situar las semillas sobre papel toalla estéril.

Las semillas esterilizadas se sumergieron en las suspensiones de actinomicetos (10^8 $\text{UFC}/\text{ml}^{-1}$) que contenía una cepa individual durante un periodo de 60 min. El experimento de germinación de semillas de maíz se realizó por triplicado. Nueve aislamientos de actinomicetos se utilizaron para el tratamiento de recubrimiento de semillas que contiene treinta semillas de maíz y se colocaron sobre una toalla de papel húmeda en cajas petri.

A continuación, las semillas se cubrieron con papel absorbente humedecido con agua destilada estéril y se sellaron las cajas petri en bolsas de polietileno. Las semillas tratadas con agua destilada estéril y medio ISP-2 sin inocular sirvieron como control negativo. Para evaluar las variables, las cajas de Petri se colocaron en una incubadora a $\pm 27^{\circ}\text{C}$ durante 5 días. Todas las actividades previas a la incubación se realizaron en una cámara de flujo laminar en condiciones asépticas.

3.6.2 Datos Tomados y Formas de Evaluación

3.6.2.1 Morfología de cepa

Se evaluó la morfología en base a la tabla de caracteres microbiológicos bacterianos dejando crecer cada cepa en medio de cultivo durante 7 días a 27°C.

3.6.2.2 Porcentaje de germinación de semillas de maíz

Para el cálculo del porcentaje de germinación en semillas de maíz se consideraron semillas germinadas con una longitud radicular de 2-3 mm y se determinaron a los 3 días, el porcentaje de germinación se calculó dividiendo el número de semillas germinadas por el número total de semillas evaluadas, de acuerdo con la siguiente fórmula (47):

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{número de semillas germinadas con el inoculo bacteriano}}{\text{número de semillas germinadas con agua (testigo)}} * 100$$

3.6.2.3 Longitud radicular (cm)

La longitud de las raíces de las semillas emergidas se evaluó mediante un calibrador vernier en centímetros. Estos datos se tomaron después de la inoculación con actinomicetos *in vitro* después de 7 días de incubación, desde la punta inserción de la radícula y el cotiledón.

3.6.2.4 Longitud de hipocótilo (cm)

Usando una regla, se midió la longitud del hipocótilo desde el cuello del tallo hasta el ápice de la plántula durante un período de 7 días y se registró los datos en cm.

3.6.2.5 Peso fresco (g)

Luego de 7 días de incubación, se evaluó individualmente el peso de cada plántula con ayuda de una balanza de precisión Pioneer (PX163).

3.6.2.6 Peso seco (g)

Una vez secas las plántulas, se procedieron a pesar en una balanza de precisión Pioneer (PX163) para determinar su peso.

3.7 Tratamiento de los datos

El análisis estadístico de los resultados obtenidos de las variables de estudio se realizó mediante un análisis de varianza (DCA) y para determinar diferencia significativa, se aplicó la prueba de significación Duncan 5%.

3.8 Recursos Humanos y Materiales

3.8.1 Recursos humanos

La investigación se realizó con la orientación metodológica de Fernando Abasolo PhD., docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo. El manejo del ensayo toma de variables será realizado por la Srta. Miquinga Tucres Ana María, estudiante de la carrera de Agronomía.

3.8.2 *Materiales de Laboratorio*

- Tubos de Eppendorf (0.6 ml y 1.5 ml)
- Papel Parafilm
- Vasos de precipitación (50 ml, 250 ml y 500ml)
- Cajas Petri
- Guantes Quirúrgicos talla M
- Piseta de 500 ml
- Embudos simples de vidrio

3.8.3 *Equipos de Laboratorio*

- Balanza de 0,001 gr
- Cámara de flujo Laminar
- Microscopio
- Microondas
- Nevera
- Vórtex
- Destilador de agua
- Autoclave
- Estufa
- Centrifuga
- Incubadora
- Equipo de protección
- Etiqueta
- Marcadores

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

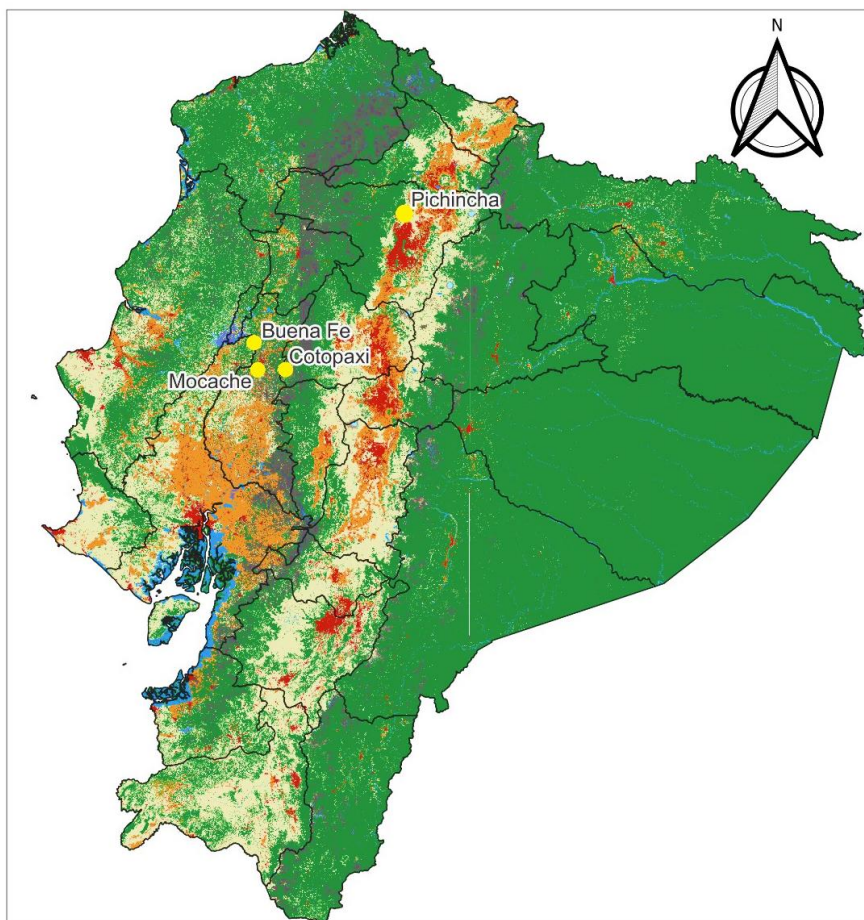
4.1 Resultados

4.1.1 Localización geográfica del muestreo

Con base en la información geoespacial de los distintos puntos de muestreo se elaboró un mapa con la posición de los sitios en los que fueron tomadas las muestras de suelo; cada uno esta denotado por un punto amarillo.

Figura 1

Mapa de localización de lugares de recolección de las muestras de suelo.



4.1.2 Aislamiento y caracterización de actinomicetos rizosféricos

Se aislaron un total 54 cepas de actinomicetos rizosféricos que procedían de tres cultivos, maíz, cacao y aguacate. El aislamiento se obtuvo luego de varias siembras sucesivas de las colonias en medio de cultivo ISP-2 en donde se observó un óptimo desarrollo de las cepas de actinomicetos, hasta obtener colonias puras, tomándose en cuenta para la caracterización morfológica la presencia de micelio vegetativo y micelio aéreo corto, así como la pigmentación; la textura seca típica y el olor a tierra húmeda, características de estas colonias de actinomicetos.

Del total de la población aislada en mayor número de aislados se encontró en los suelos agrícolas de la Provincia de los Ríos que representa un 55 % dentro de este grupo se encuentran los correspondientes al cantón Buena Fe con suelos productores de cacao de las cuales 22 colonias fueron analizadas, esto es influenciado por la gran cantidad de materia orgánica en descomposición, dentro de la localidad del cantón Mocache muestras de suelo procedentes de cultivo de maíz presentaron 8 aislados. En cambio, en la zona de la Provincia de Cotopaxi del cantón Pangua se realizó una recolección total del 26 % en la cual se rescató 14 cepas de actinomicetos. El registro para el Cantón Quito procedentes de huertas de aguacate con un 19% representando a 10 cepas bacterianas de actinomicetos (Figura 2).

Todos los actinomicetos presentaron variada morfología de acuerdo con cada cepa son determinadas por las condiciones de desarrollo de los sitios específicos de aislamiento y recolección de las muestras provenientes de diferentes lugares. En la caracterización de cultivo de las cepas aisladas se obtuvieron 4 grupos con características microscópicas y macroscópicas, que se muestra por la diversidad de colores del micelio aéreo y vegetativo, es decir, se observaron diversos pigmentos para las cepas que van desde blanco, amarillo, marrón claro y marrón oscuro. En cuanto a la textura, presentaron características propias de actinomicetos como textura seca, polvosa y adheridas al agar. Cuatro cepas presentaron secreciones transparentes posiblemente de geosmina las cuales fueron B11-B22-B3 y A14 (Figura 3).

Tabla 5*Características morfológicas de los actinomicetos aislados de la rizósfera*

Código Cepa	Textura	Pigmentación de la colonia		Código Cepa	Textura	Pigmentación de la colonia	
		Micelio aéreo	Reverso de la colonia			Micelio aéreo	Reverso de la colonia
B1	Seca, esporulada	Blanco	Beige	B21	Cremosa	Café	Amarillo
B2	Seca, polvosa	Blanco	Blanco	B22	Seca, polvosa	Amarillo	Blanco
B3	Seca, polvosa	Gris verdoso	Amarillo	M1	Seca, polvosa	Blanco	Café
B4	Seca, polvosa	Café	Amarillo	M2	Seca, polvosa	Crema rosa	Beige
B5	Cremosa	Naranja	Rojizo	M3-1	Polvosa, granular	Blanco	Beige
B6	Cremosa	Beige	Café	M4	Cremosa	Blanco	Café
B7	Seca polvosa	Blanco	Amarillo	M5	Seca, polvosa	Negro	Marrón oscuro
B8	Seca, esporulada	Grisácea	Amarillo	M6	Seca, polvosa	Marrón	Café
B9	Seca, polvosa	Blanco	Mostaza	M7	Seca, polvosa	Blanco	Beige
B10	Seca, polvosa	Crema	Rosado	M8	Seca, cerosa	Blanco	Beige
B11	Seca, polvosa	Marrón	Blanco	A1	Seca, polvosa	Café	Amarillo
B12	Cremosa	Marrón	Marrón oscuro	A2	Seca, polvosa	Gris	Amarillo
B13	Seca, esporulada	Blanco	Crema	A3	Seca, polvosa	Blanco	Marrón oscuro
B14	Cremosa	Crema	Blanco	A4	Seca, filamentosa	Café	Beige
B15	Seca, polvosa	Verduzco	Beige	A5	Cremosa	Blanco	Amarillo
B16	Seca, filamentosa	Gris	Negro	A6	Seca, polvosa	Café verdoso	Café
B17	Seca, polvosa	Blanco	Rosado	A7	Seca, cerosa	Café claro	Verde
B18	Cremosa, lisa	Blanco	Blanco	A8	Seca, esporulada	Blanco	Blanco
B19	Cremosa	Blanco	Rosado	A9	Seca, polvosa	Blanco	Beige
B20	Seca, polvosa	Blanco	Crema	A10	Cremosa, lisa	Blanco	Amarillo

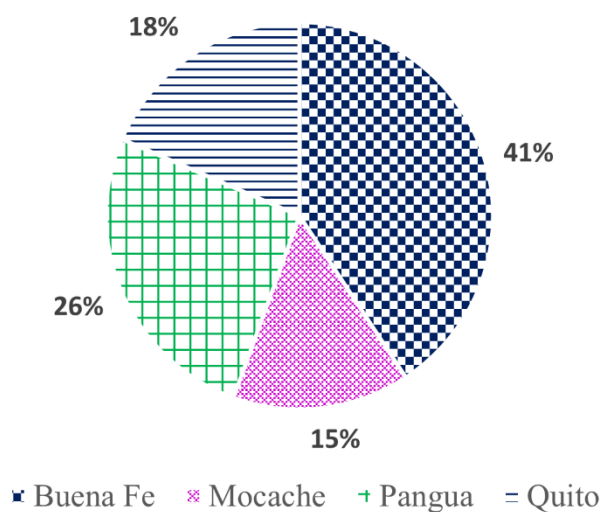
Tabla 6

Características morfológicas de actinomicetos aislados de la rizósfera

Código Cepa	Textura	Pigmentación de la colonia	
		Micelio aéreo	Reverso de la colonia
A11	Creмоса	Blanco	Beige
A12	Seca, cerosa	Café	Mostaza
A13	Seca, polvosa	Gris	Verdosa
A14	Seca, polvosa	Amarillo	Blanco
SQA1	Seca, polvosa	Marrón claro	Crema
SQA2	Creмоса	Café	Café
SQA3	Seca, filamentosa	Blanco	Mostaza
SQA4	Seca, polvosa	Marrón claro	Amarillo
SQA5	Seca, polvosa	Blanco	Blanco
SQA6	Seca, polvosa	Blanco	Amarillo claro
SQA7	Seca, polvosa	Crema	Blanco
SQA8	Creмоса, lisa	Beige	Blanco
SQA9	Seca, polvosa	Café	Café oscuro
SQA10	Seca, polvosa	Amarillo	Mostaza

Figura 2

Porcentaje de recuperación de actinomicetos aislados de la rizósfera



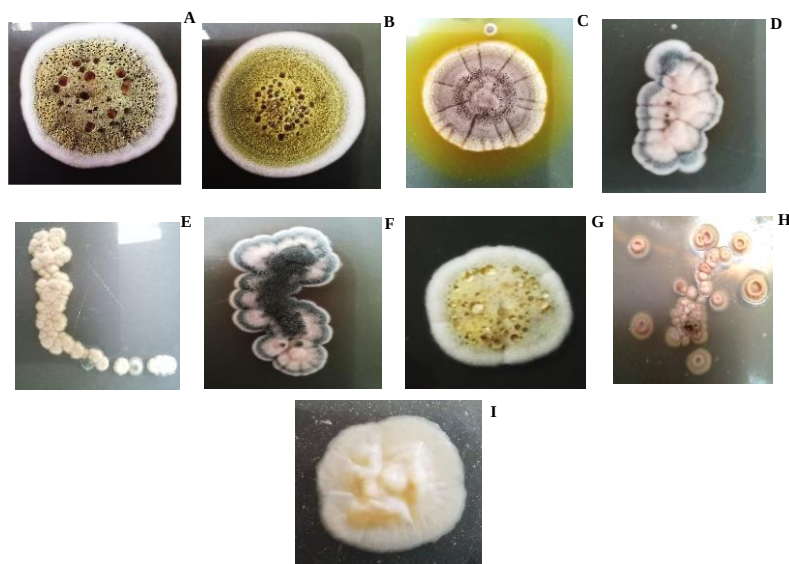
Nota: Porcentaje de recuperación de actinomicetos aislados de cuatro cantones de Ecuador

4.1.3 Caracterización de cepas de actinomicetos

Se seleccionaron 9 cepas de actinomicetos del total que fue purificado y en función de pruebas bioquímicas (Figura 3).

Figura 3

Características morfológicas de actinomicetos aisladas de la rizósfera.



Nota: Características morfológicas de colonias de actinomicetos. (A) cepa B11, (B) cepa B22, (C) cepa B3, (D) cepa M2, (E) cepa M3-1, (F) cepa M5, (G) cepa A14, (H) cepa SQA1, (I) cepa SQA7

4.1.4 Caracterización Bioquímica

En las pruebas bioquímicas realizadas revelaron que todas las bacterias aisladas y purificadas resultaron Gram positivas, es decir el color de la tinción es violeta esta característica química es debido a la estructura de la pared celular, debido a que las bacterias poseen varias capas interconectadas de peptidoglicano y es la responsable de retener el colorante por tanto, estas mismas cepas que presentaron rasgos relevantes se seleccionaron para inspeccionar la potencialidad de solubilizar macronutrientes.

La enzima catalasa, que hidroliza el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso, es producida por cada una de las nueve cepas aisladas de actinomicetos. Las observaciones de las pruebas bioquímicas revelaron la capacidad de las cepas de actinomicetos para desdoblar componentes como la urea, fosforo y potasio, las cepas con mejor capacidad fueron A14 y SQA7 que poseen una alta capacidad enzimática y metabólica mientras que los demás aislamientos revelaron bajo potencial en las pruebas realizadas.

Tabla 7

Caracterización bioquímica de aislados de actinomicetos

Actinomicetos	Tinción		Solubilización		
	Gram	Catalasa	Urea	Fósforo	Potasio
B11	+	+	+	+	+
B22	+	+	-	-	+
B3	+	+	+	++	+
M2	+	+	-	+	+
M3-1	+	+	++	+	+
M5	+	+	+	++	+
A14	+	+	++	+++	++
SQA1	+	+	-	+	+
SAQ7	+	+	+	+++	+++

+: Producción normal, ++ producción moderada, +++ producción alta

4.1.4.1 Actividad antifúngica in vitro de los actinomicetos

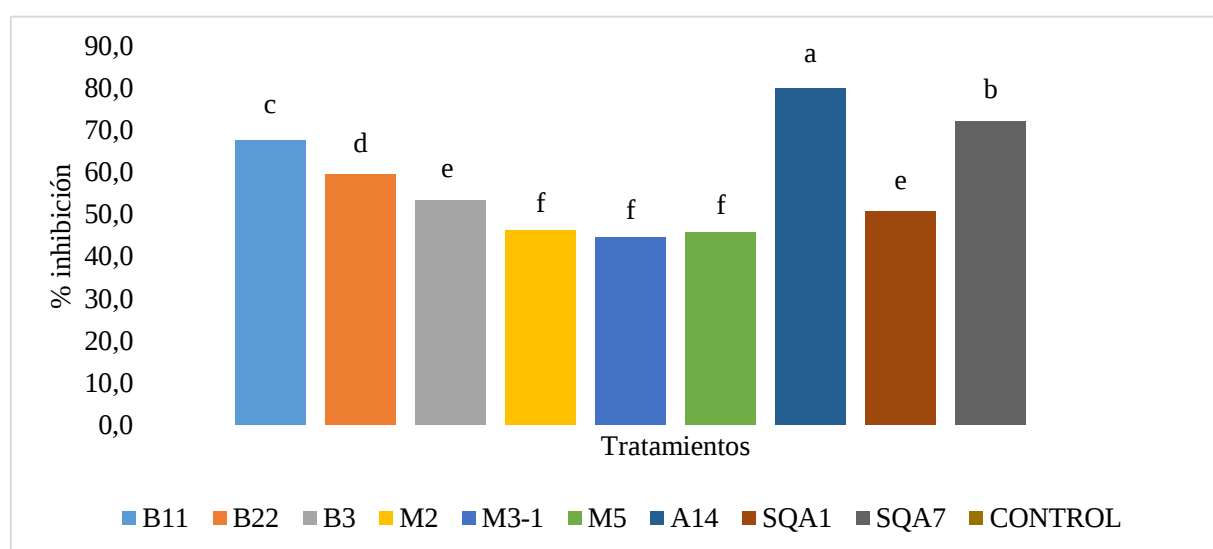
4.1.4.1.1 Efecto antagonista de actinomicetos sobre (*Fusarium* sp.)

La cepa A14 aislada de muestras obtenidas del cantón Pangua y evaluadas a partir de 7 días después de la inoculación presento el mayor porcentaje de inhibición con promedio

superior al 80.03 %, seguida de la muestra SQA7 obtenida a partir de muestras del cantón Quito presento un promedio de inhibición del 72.10 %, superando a los demás tratamientos seleccionados como el B11, B22 y B3 obtenidos de los cantones Buena Fe con valores del 67.50 %, 59,63% y 53.37%, respetivamente. Por último, la SQA1, M2, M3-2 y M5 aislados del cantón Quito y Mocache mostraron tener rangos entre 50.83% y 44.63%.

Figura 4

Porcentaje de inhibición de actinomicetos sobre el desarrollo de Fusarium sp.

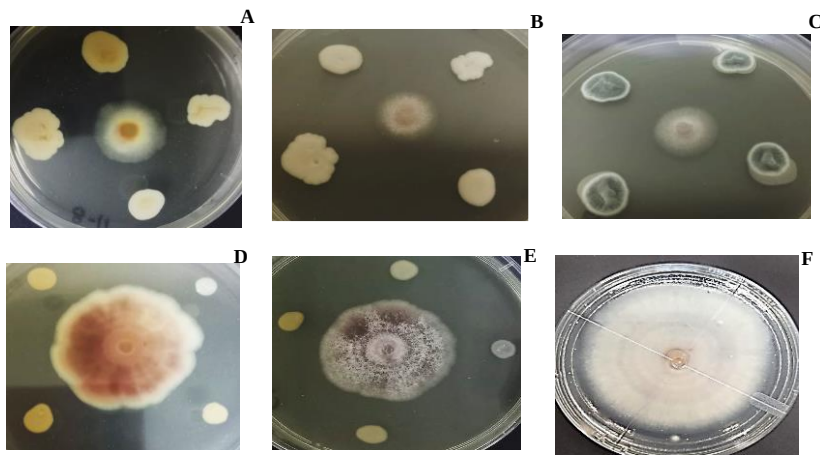


Las barras de error indican $\pm$ Desviación Estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Duncan).

En la Figura 5 se puede apreciar el poder antagonista del fitopatógeno causada por cinco cepas de actinomicetos (A14, SQA7, M5, B11 y B22), que mostraron mayor inhibición del crecimiento con respecto al control, donde se observó que el crecimiento del micelio del hongo disminuyo hacia la colonia del actinomiceto, y a partir de ese momento el patógeno detuvo su crecimiento, por la actividad antagonica de los actinomicetos.

Figura 5

Actividad antagónica de actinomicetos frente a Fusarium sp.



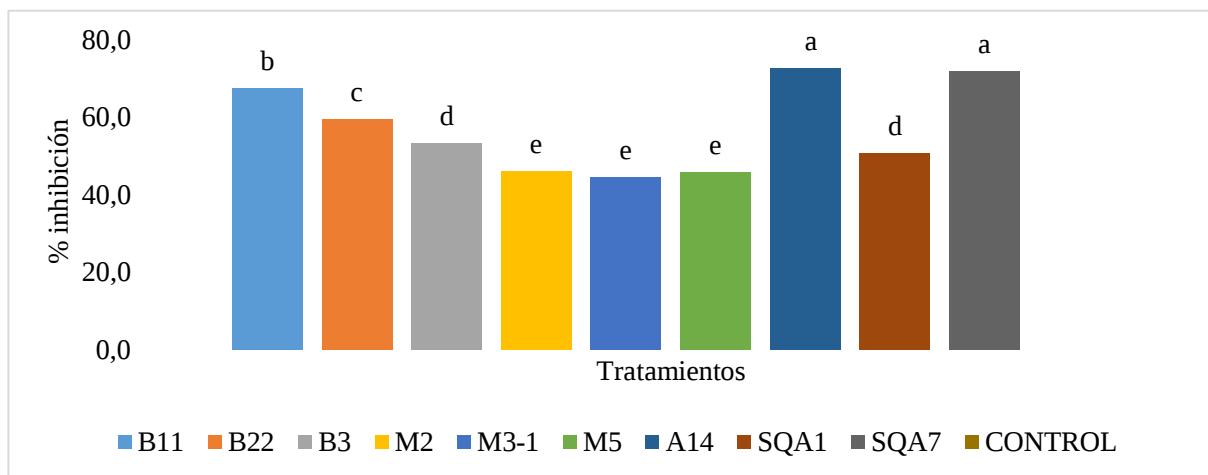
Nota: Actividad antagónica de actinomicetos frente a *Fusarium sp.* (A) cepa A14, (B) cepa SQA7, (C) cepa M5, (D) cepa B11, (E) cepa B22, (F) control.

4.1.4.1.2 Efecto antagonista de actinomicetos sobre (*L. theobromae*)

Las nueve cepas empleadas en el estudio generaron reducción sobre el crecimiento de *L. theobromae*. las cepas A14 y SQA7 obtenidas de muestras del cantón Pangua y Quito alcanzaron el mayor porcentaje de antagonista con promedios superiores al 72.93 % y 72.10% destacando de los demás actinomicetos empleados, B11- B22 y B3 que alcanzaron promedios de 67.50%, 59.63% y 53.37% respectivamente. En relación con el control que presento crecimiento acelerado de 7.2 cm.

Figura 6

Actividad antagónica de actinomicetos frente a L. theobromae.



Las barras de error indican $\pm$ Desviación Estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Duncan)

Todos los aislados de actinomicetos presentaron la capacidad antifúngica frente al hongo de la pudrición negra.

Figura 7

Inhibición del crecimiento de L. theobromae frente a actinomicetos.



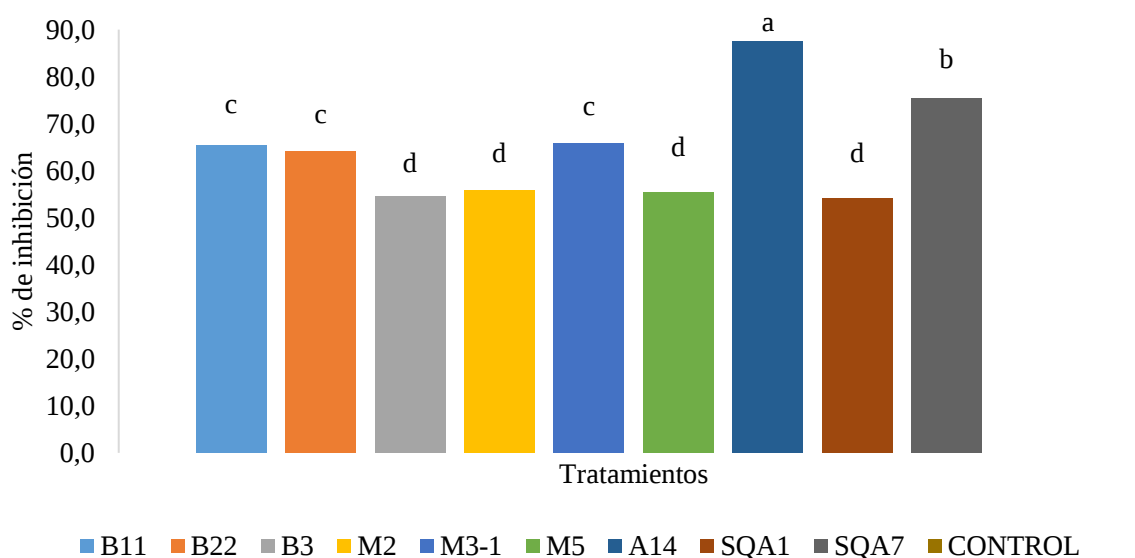
Nota: Efecto antagónico de actinomicetos (A) cepa A14, (B) cepa SQA7, (C) control.

4.1.4.1.3 Efecto de sobrenadantes de actinomicetos sobre (*Fusarium* sp.)

Se confirmó la disminución del crecimiento micelial de *Fusarium* sp, con la aplicación de los sobrenadantes de actinomicetos evaluadas, destacándose la cepa A14 procedente del cantón Pangua proporcionó una actividad antagonista superior con el 87.50%, mientras que en la cepa SQA7 de la zona de Quito se observó un porcentaje del 75.43%, seguida de las cepas M3-1, B11 y B22 procedentes del cantón Mocache, Buena Fe alcanzaron valores de 65.87%, 65%, 43% y 62.20% respectivamente superando al control que no presentó disminución alguna en su crecimiento.

Figura 8

Efecto de sobrenadantes de actinomicetos sobre el desarrollo de Fusarium sp.

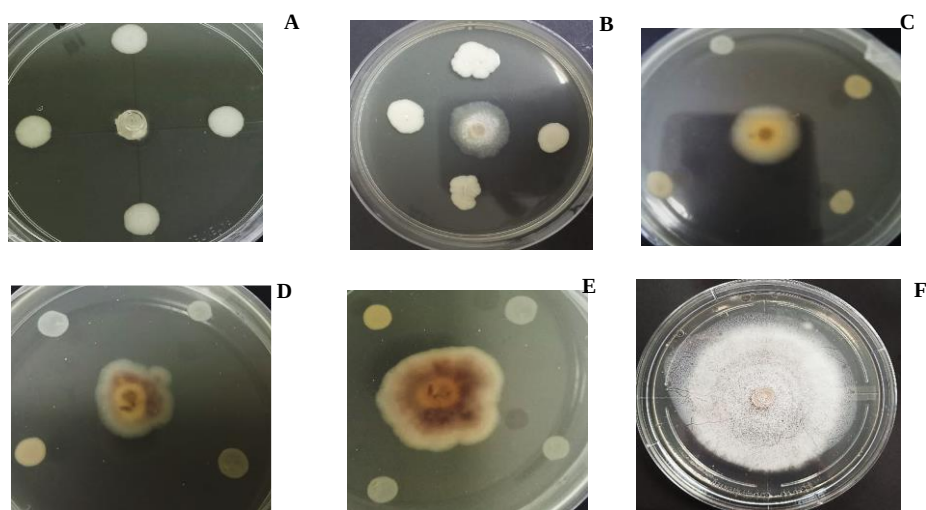


Las barras de error indican $\pm$ Desviación Estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Duncan).

La producción de metabolitos bioactivos exhibió la mayor actividad inhibitoria en medio sólido contra el crecimiento radial de la colonia de *Fusarium* sp. confrontado ante cada actinomiceto y del control fue medido después de los siete días de incubación y se determinó la capacidad antagonica en las confrontadas con los actinomicetos (Figura 9).

Figura 9

Capacidad antagonica de sobrenadantes de actinomicetos contra a Fusarium sp.



Nota: Sobrenadantes de actinomicetos frente a *Fusarium* sp. (A) cepa A14, (B) cepa SQA7, (C) cepa M3-1, (D) cepa B11, (E) cepa B22, (F) control.

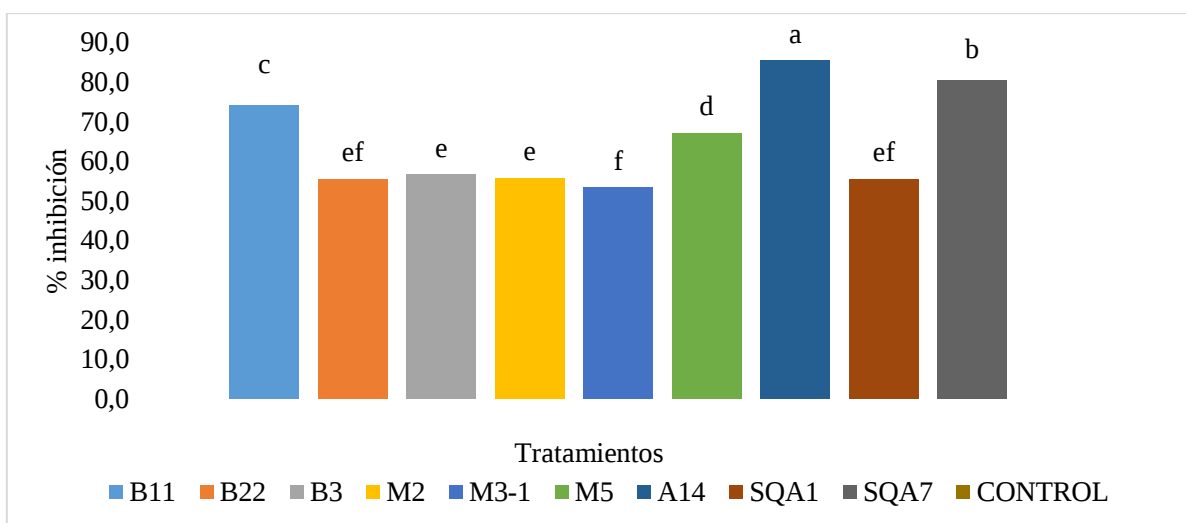
4.1.4.1.4 Efecto de sobrenadantes de actinomicetos sobre (*L. theobromae*)

Los sobrenadantes obtenidos a partir de actinomicetos para la determinación del porcentaje de inhibición frente a *L. theobromae* muestran que se generó diferencias significativas entre los tratamientos presentando la cepa A14 perteneciente al cantón Pangua presenta el mayor porcentaje de inhibición con 85.43 %; seguido de la cepa SQA7 pertenecientes a la zona del Cantón Quito alcanzo un promedio de 80.42%, mientras que las cepas B11, M5 y B3 del cantón Buena Fe y Mocache se observó un porcentaje de 74.20%,

67.10% y 56.70% respectivamente, superando al control que no mostro reducción del crecimiento miceliar.

Figura 10

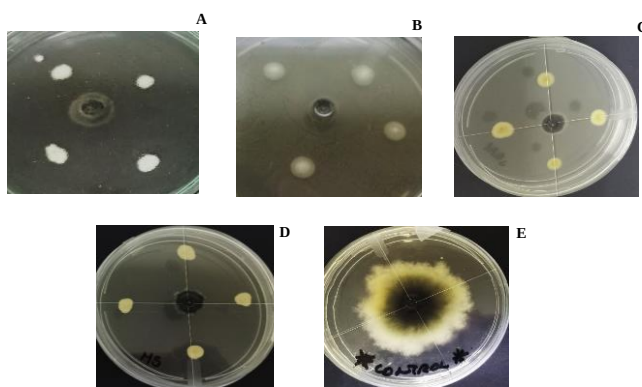
Efecto de sobrenadantes de actinomicetos frente a L. theobromae.



Las barras de error indican $\pm$ Desviación Estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Duncan).

Figura 11

Capacidad antagónica de sobrenadantes de actinomicetos contra L. theobromae.



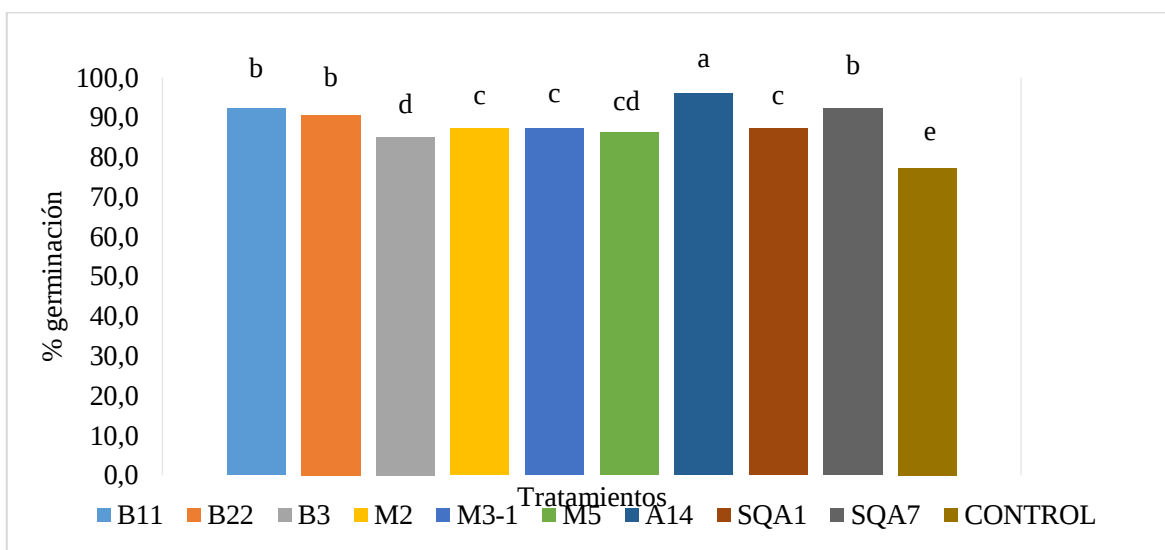
Nota: Sobrenadantes de actinomicetos frente a *L. theobromae*. (A) cepa A14, (B) cepa SQA7, (C) cepa B11, (D) cepa M5, (E) cepa B3, (F) control.

4.1.5 Porcentaje de germinación en semillas de maíz

Los resultados obtenidos en el ensayo para la determinación del porcentaje de germinación de las semillas de maíz a los 3 días de inoculación muestran que la aplicación de actinomicetos genero diferencias significativas entre los tratamientos siendo la cepa A14 perteneciente al cantón Pangua con mayor porcentaje de germinación obteniendo el 96 %; de manera similar la cepa SQA7-B11-B22 pertenecientes a las zonas del Cantón Quito y Buena Fe respectivamente alcanzaron porcentajes de 90%, mientras que el control genero la menor tasa de germinación con un porcentaje de 80 % de semillas germinadas.

Figura 12

Porcentaje de germinación de semillas de maíz con actinomicetos.



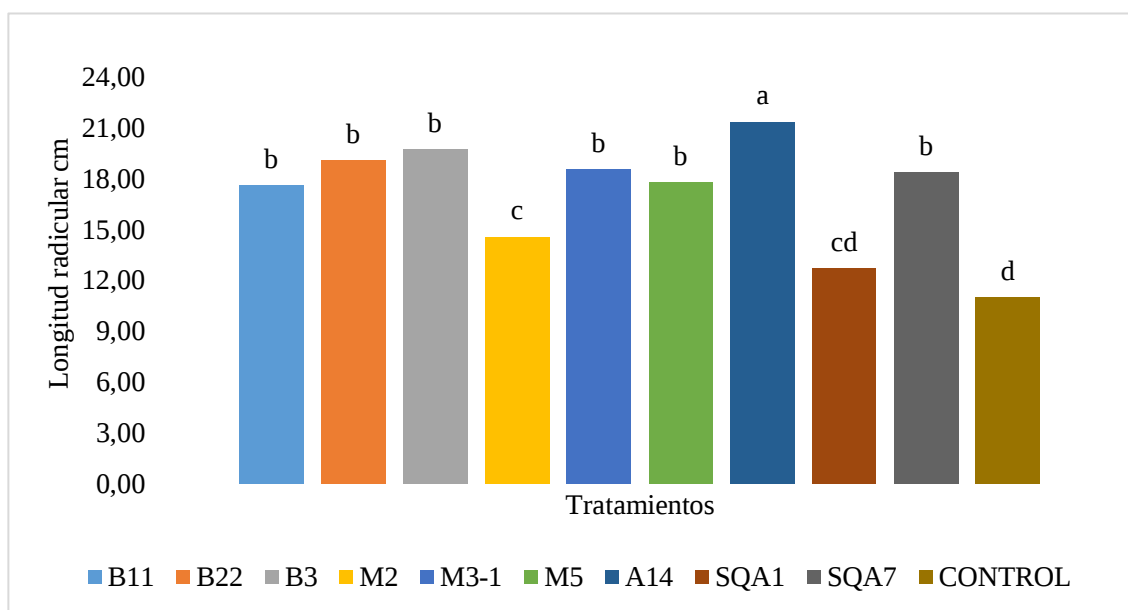
Las barras de error indican $\pm$ Desviación Estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Duncan).

4.1.6 Longitud radicular de plántulas de maíz

La aplicación de los aislados de actinomicetos en semillas de maíz, logro efectos bioestimulantes en la estructura del sistema radicular, después de 7 días de incubación, la cepa A14 obtenida del cantón Pangua mostro los mayores promedios en longitud radicular con valores de 21.33 cm, superando a los demás tratamientos B11, B22, B3, M3-1 y SQA7 aisladas del cantón Buena Fe, Mocache y Quito presentaron emisiones radiculares con valores promedios de 17.59,19.04,19.27,18.54 y 18.34 centímetros respectivamente, mientras que el tratamiento sin inoculante de actinomiceto presento un efecto negativo con menor longitud de la raíz con valores de 10.97 cm.

Figura 13

Longitud radicular de plántulas de maíz inoculadas con actinomicetos.

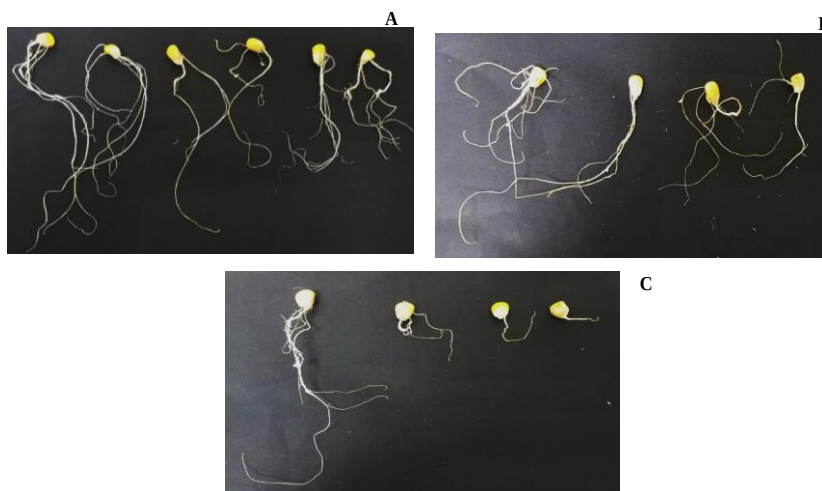


Las barras de error indican $\pm$ Desviación Estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Duncan).

El efecto de los actinomicetos sobre el crecimiento del maíz se observó que todos los aislamientos exhibieron un aumento en la longitud de la raíz, en comparación con el control. De los nueve aislamientos probados la cepa A14 mejoró significativamente la longitud radicular.

Figura 14

Efecto de actinomicetos en la longitud de raíces en plántulas de maíz.



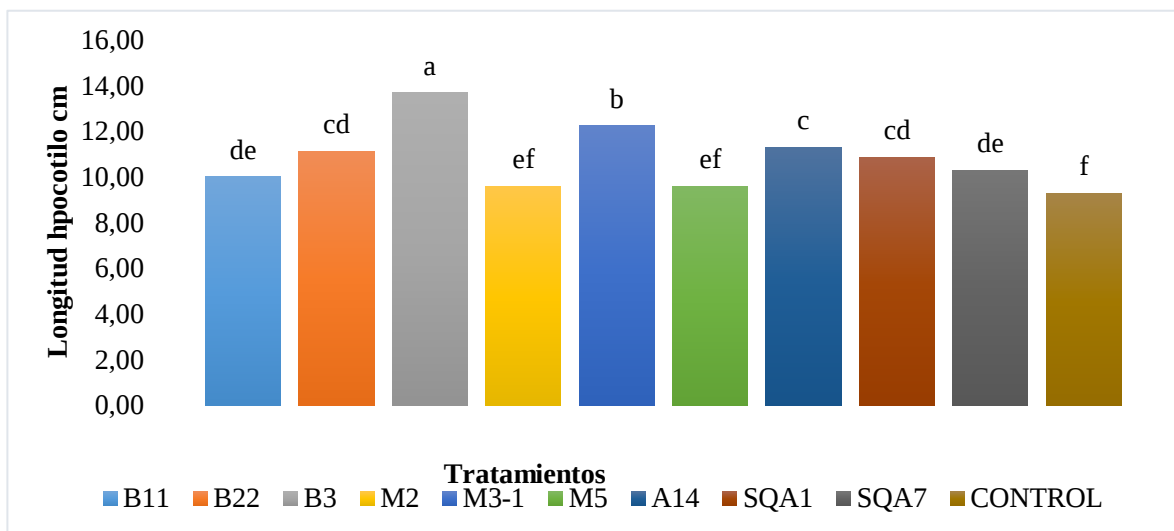
Nota: Efecto de actinomicetos en longitud radicular de maíz (A) cepa A14, (B) cepa B3, (C) control.

4.1.7 Longitud hipocótilo de plántulas de maíz

Se identificó que la inoculación con la cepa B3 aislada de la zona de Buena Fe presento una respuesta positiva promoviendo notablemente la longitud del hipocótilo con un promedio de 13.24 cm a diferencia de la cepa M3 obtenida del cantón Mocache con 12.25 cm. De igual manera la cepa A14, B2 y SQA1 procedentes del cantón Pangua, Buena Fe y Quito presentaron promedios que oscilan entre 11.31 cm y 10.87 cm, mientras se observó un proceso lento e igual al control de las semillas que no fueron tratadas con actinomicetos M5 y M2 aisladas del cantón Mocache obtuvieron un bajo promedio de 9.6 cm y 9.3 cm.

Figura 15

Longitud radicular de plántulas de maíz inoculadas con actinomicetos.



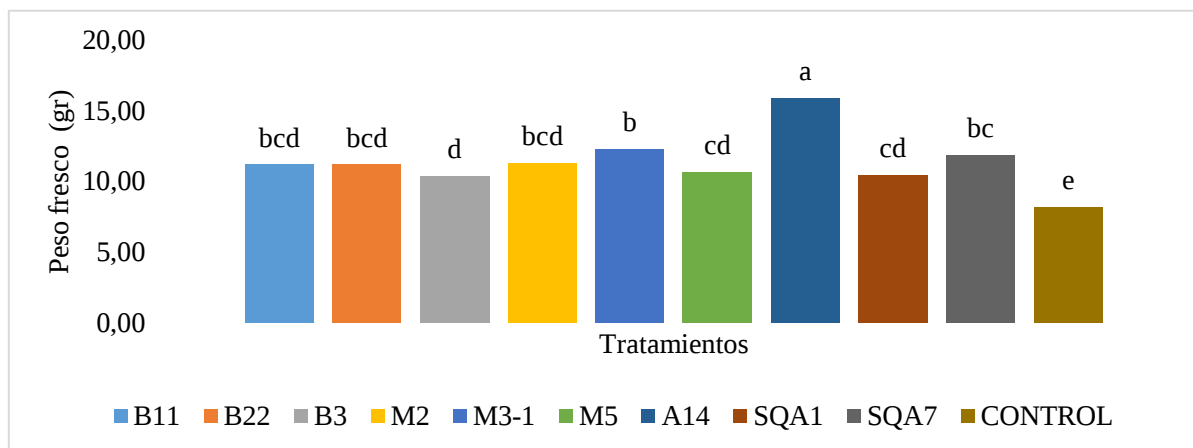
Las barras de error indican $\pm$ Desviación Estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Duncan).

4.1.8 Peso fresco

La inoculación con la cepa de actinomiceto A14 obtenida del cantón Pangua induce el aumento del peso fresco de las plántulas presentando diferencias estadísticas, obteniendo el promedio más alto ante las demás cepas, con valores promedio de 14.90 g, seguido con las cepas M3, aislada del cantón Mocache con valores de 12.27 g; SQA7 y B1 procedentes de los cantones Quito y Buena Fe se obtuvo un promedio de 11.87 g 11.17 g, mientras que sin la aplicación de actinomicetos se obtuvo un promedio bajo de 8.17 g.

Figura 16

Peso fresco de plántulas de maíz inoculadas con actinomicetos seleccionados.



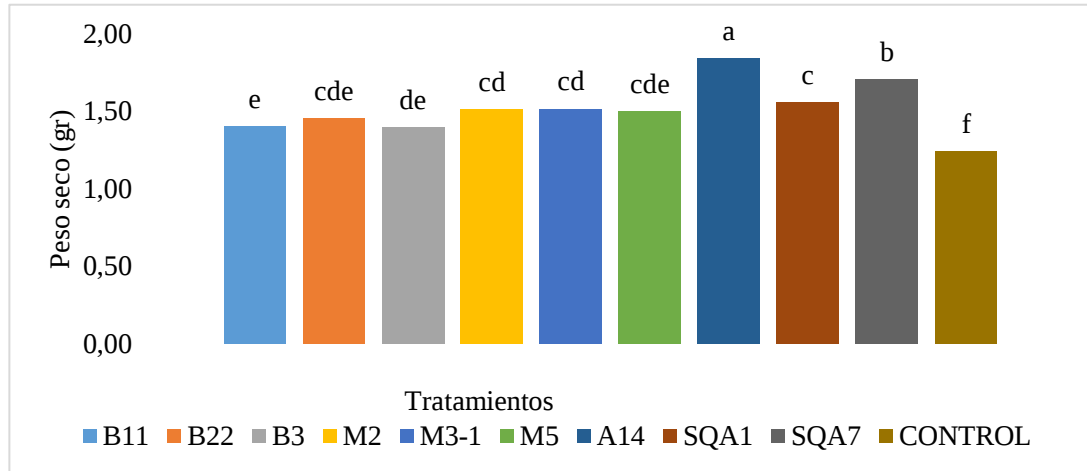
Las barras de error indican $\pm$ Desviación Estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Duncan).

4.1.9 Peso seco

Se determinó mayor peso seco de las plántulas en los tratamientos con inoculación de actinomicetos correspondientes a la cepa A14 provenientes del cantón Pangua genero diferencias significativas estadísticamente presentando valores de 1.85 g; SQA7 y SQA1 aislados del cantón Quito alcanzaron cifras de 1.67 g y 1.56 g respectivamente mientras que el control con valores 1.24 g.

Figura 17

Peso seco de plántulas de maíz inoculadas con actinomicetos seleccionados.



Las barras de error indican $\pm$ Desviación Estándar; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Duncan).

4.2 Discusión

Los actinomicetos se han considerado como uno de los grupos prominentes de microorganismos del suelo y están influenciados por aspectos físicos y químicos, incluidos el tipo de suelo, las condiciones climáticas, la ubicación geográfica y el pH del suelo Arifuzzaman *et al* (48). Una fuente potencial para recolectar actinomicetos es la rizosfera, la secreción de exudados de raíces en este hábitat proporciona un alto contenido nutricional necesario para el crecimiento microbiano Spaepen *et al.* (49). En este estudio, se aislaron cincuenta y cuatro actinomicetos de la rizosfera de maíz, cacao y aguacate recolectadas en las zonas de Mocache, Buena Fe, Pangua y Quito, Ecuador. Los aislamientos de actinomicetos recolectados exhibieron variaciones en su colonia y morfología celular. Esta investigación revela similitudes en cuanto al número y las características morfológicas encontradas por Gallegos (50), quien aisló y caracterizó 50 cepas de actinomicetos de cultivos de papa recolectados en 4 regiones diferentes del Perú. Otro estudio realizado por Oswald *et al.* (51), reportó 82 cepas de actinomicetos asociadas con papas de los Andes Centrales del Perú.

En la presente investigación, el aislamiento se basó en el examen macroscópico las cepas aisladas presentaron características morfológicas típicas de los actinomicetos observándose colonias secas y polvosas con olor a suelo húmedo. Sin embargo, para confirmar que se trataban de actinomicetos, se evaluaron sus características microscópicas la tinción de Gram permitió la confirmación de bacterias filamentosas Gram-positivas. Observaciones similares fueron anotadas por Araújo (52) donde observó *Streptomyces* como colonias secas, lisas o polvosas con micelio aéreo de diferentes colores. Jassim (38) reportó aislamientos de actinomicetos utilizando caracterización fenotípica (macroscópica, bioquímica y fisiológica), y en 80% de similitud, se agrupó junto con el género *Streptomyces* sp.

Estudios realizados por Anwar *et al.* (53) reportaron que los actinomicetos tienen el potencial de promover el crecimiento de las plantas, y tienen la capacidad para mejorar la disponibilidad de nutrientes. De acuerdo con lo anterior se evaluó la capacidad promotora del crecimiento vegetal utilizando una variedad de pruebas bioquímicas para determinar actinomicetos rizosféricos con estas características, como Hamdali *et al.* (54) hicieron en sus investigaciones. De acuerdo con lo anterior el ensayo de las pruebas bioquímicas se pusieron a prueba nueve aislados de actinomicetos seleccionados para evaluar su efecto de solubilizar nitrógeno, fósforo y potasio *in vitro*. Entre las nueve cepas seleccionadas, recalca las cepas A14, SQA7 recuperadas de muestras de suelo de la rizósfera procedente del cantón Pangua y Quito, M3-1 nativa de la zona de Mocache y B3 originaria de Buena Fe. Muchos microorganismos son capaces de disolver el fosfato inorgánico para ponerlo a disposición de las plantas para aumentar el rendimiento de los cultivos (54) y (55). Acorde con los datos obtenidos de Franco (56) obtuvo resultados similares, donde una gran cantidad de actinomicetos solubilizadores de fosfato rindieron en comparación con *Azotobacter*. Además, Gallegos (50) encontró once cepas de actinomicetos de rizosferas aislados mostraron halos de solubilización de fosfato que oscilaban entre 0,13 y 0,35 cm. Otros estudios también reportaron que actinomicetos de los géneros *Streptomyces*, *Micrococcus*, *Micromonospora* y *Thermobifida* puede promover el crecimiento de las plantas al solubilizar el fosfato, potasio y fijar nitrógeno (57).

La mayoría de los actinomicetos promotores de crecimiento vegetal sintetizan ácido indol acético, que es responsable del aumento del número de raíces adventicias que ayudan a las plantas a absorber un gran volumen de nutrientes y absorber agua, mientras que el aumento de los exudados de las raíces beneficia a la bacteria (58). Las actividades que promueven el crecimiento de las plantas, como la producción de sideróforos y auxinas o la disolución de fosfato, ayudan a las plantas a crecer, con énfasis el género *Streptomyces* tiene efectos positivos sobre el crecimiento de raíces, brotes y la germinación de semillas (57). En el presente estudio se evaluó el desarrollo morfológico de semillas de maíz que fueron inoculadas con los aislados de actinomicetos B11, B22, B3, M2, M3-1, M5, A14, SQA1 y SQA7 recolectadas de la

rizósfera, se destacaron en obtener un efecto estimulante en el porcentaje de tasa germinativa, longitud radicular, longitud del hipocótilo, peso fresco y peso seco de las plántulas de maíz.

De acuerdo con Shreevidya et al. (46), confirman que los actinomicetos de la rizósfera fueron capaces de estimular el crecimiento de las plantas y aumentar la biomasa vegetal. En esta investigación la aplicación de la cepa A14 ofrece un cambio sustancial en el proceso germinativo de las semillas, el desarrollo vegetativo y arquitectura del sistema radicular. Esto concuerda con lo planteado por Anwar et al (53), evaluaron la aplicación de actinomicetos con cepas de *Streptomyces* en semillas de trigo se observó los efectos de la inoculación mejoraron significativamente el crecimiento de la planta al aumentar la longitud de la raíz de la planta, la longitud de los brotes de la planta, el peso seco, el peso fresco, el número de hojas y el número de raíces sobre el control no inoculado. Este género de *Streptomyces* exhibió un excelente potencial para promover el crecimiento de las plantas, incluso en sorgo y arroz (59).

Los actinomicetos de la rizósfera están familiarizados con la actividad de controladores biológicos, estos microorganismos son capaces de producir quitinasa, el cual es responsable de inhibir el crecimiento de hongos patógenos contra plantas (60). En esta investigación la actividad antagónica de los actinomicetos se detectaron efectos de reducción de crecimiento micelial de los fitopatógenos *Fusarium* sp, y *Lasidiplodia theobromae* destacándose la cepa de actinomiceto A14 originaria de la zona de Pangua aislada de la rizósfera de plantas de cacao demostró obtener el mayor porcentaje inhibitorio de crecimiento micelial lo que se atribuye a la producción de metabolitos secundarios antimicrobianos y antifúngicos, los cuales, al entrar en contacto con el hongo, impiden su desarrollo radial normal. Del mismo modo Rehan et al. (33), indica que se ha demostrado el antagonismo de *Streptomyces*. *S. tricolor* cepa HM10 y *S. thinghirensis* cepa HM3 ejercieron un efecto significativo contra cuatro fitopatógenos, incluidos *Alternaria brassicae* y *Phytophthora capsici*. Además, *Streptomyces albireticuli* mostraron una fuerte inhibición del crecimiento de *Fusarium solani* porcentajes de inhibición del 97% y 55% con un diámetro de crecimiento micelial visualizados con rangos que van entre 38 mm y

2.5 mm (61). Se han propuesto varios mecanismos de fenómenos antagónicos contra hongos, incluyendo antibiosis y parasitismo. En algunos casos, las quitinasas como enzimas hidrolíticas y otras enzimas como glucanasas o proteasas juegan un papel importante en el biocontrol de enfermedades por *Fusarium* y pueden actuar contra la pared celular fúngica (62) y (63).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Se aislaron un total de 54 cepas de actinomicetos de tres provincias con diferentes pisos altitudinales a partir de la rizosfera de cultivos de plantas de cacao, aguacate y maíz de las cuales se seleccionaron nueve cepas que presentaron rasgos de importancia en la identificación de producción de catalasa, fosforo y potasio.
- La cepa A14 inhibió el desarrollo micelial de los hongos fitopatógenos *Fusarium* sp. y *Lasiodiplodia theobromae* con promedios superiores del 87% y 85 % respectivamente.
- La incubación de semillas de maíz con aislados de actinomicetos con énfasis la cepa A14 ejerció un efecto estimulante, en el crecimiento de las plántulas en las variables del porcentaje de germinación del 96 %, longitud radicular con 21.33 cm, longitud del hipocótilo de 13.24 cm, peso fresco de 14.9 g y peso seco 1.85 g en relación con el control.

5.2 Recomendaciones

- ✓ Emplear los aislados de actinomicetos A14 y SQA7, que presentaron mayor efecto PGPR en esta investigación, para aplicarlos en otras especies de interés agrícola.
- ✓ Combinar las cepas de actinomicetos para favorecer el sinergismo entre ellas.
- ✓ Identificar el efecto antagónico de las cepas de actinomicetos que presentaron alto porcentaje de inhibición para *Fusarium* sp. y *Lasiodiplodia theobromae* en otras especies de fitopatógenos de interés agrícola.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

6.1 Bibliografía

1. Viteri M del P, Tapia MC. Economía ecuatoriana: de la producción agrícola al servicio. Revista ESPACIOS [Internet]. 2018 [citado el 5 de diciembre de 2022];39(32). Disponible en: <https://www.revistaespacios.com/a18v39n32/18393230.html>
2. Caviedes Cepeda GM. Producción de semilla de maíz en el Ecuador: retos y oportunidades. Av Cienc Ing [Internet]. 2019;11(1). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.18272/aci.v11i1.1100>
3. Bonilla Bolaños AG, Singaña Tapia DA. La productividad agrícola más allá del rendimiento por hectárea: análisis de los cultivos de arroz y maíz duro en Ecuador. granja [Internet]. 2019 [citado el 5 de diciembre de 2022];29(1):70–83. Disponible en: <https://lagranja.ups.edu.ec/index.php/granja/article/view/29.2019.06>
4. ONU. La biodiversidad de los suelos es ignorada, pero es fundamental para alimentar al planeta [Internet]. Noticias ONU. 2020 [citado el 5 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://news.un.org/es/story/2020/12/1485132>
5. Tamayo Rivera PR. Caracterización de los principales grupos de microorganismos en un suelo volcánico de la zona Andina del Ecuador. [Quito]: UCE; 2021.
6. Chumpitaz Bermejo AC. Caracterización de actinomicetos rizosféricos aislados de cultivos orgánicos de papa nativa *Solanum tuberosum*, L y evaluación de su actividad antagonista a *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. [Lima, Perú]: Universidad Mayor de San Marcos; 2019.
7. Lino Navarro M, Morales Tello E, Castellanos Sanchez P, Acosta Román M, Soberon Lozano M. Respuesta antifúngica y propiedades PGPB de actinomicetos aislados de cultivos de “vid” *Vitis vinifera* (Vitaceae). Arnaldoa [Internet]. 2020 [citado el 5 de diciembre de 2022].

2022];27(2):571–86. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S2413-32992020000200571&script=sci_arttext

8. Caro Castro J, Mateo Tuesta C, Cisneros Mosco J, Galindo Cabello N, León Quispe J. AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE ACTINOMICETOS RIZOSFÉRICOS CON ACTIVIDAD ANTAGONISTA A FITOPATÓGENOS DE LA PAPA (*Solanum tuberosum* spp. andigena). Ecol apl [Internet]. 2019;18(2):101. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/ecol/v18n2/a01v18n2.pdf>
9. Wahyudi AT, Priyanto JA, Afrista R, Kurniati D, Astuti RI, Akhdiya A. Plant growth promoting activity of Actinomycetes isolated from soybean rhizosphere. Online J Biol Sci [Internet]. 2019;19(1):1–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3844/ojbsci.2019.1.8>
10. Moreno Sarmiento N. La agricultura sostenible un reto para la microbiología del suelo. Rev Colomb Biotecnol [Internet]. 2016 [citado el 6 de diciembre de 2022];18(1):5. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/57828>
11. Probanza A. Congreso Nacional del Medio Ambiente (Conama 2012) [Internet]. Conama.org. 2012 [citado el 6 de diciembre de 2022]. Disponible en: <http://www.conama2012.conama.org/>
12. Vélez C, Reymundo Meneses P, Zúñiga Dávila L. Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. Ecología Aplicada. 2008;7(1–2):141–8.
13. Hazarika SN, Thakur D. Actinobacteria. En: Beneficial Microbes in Agro-Ecology. Elsevier; 2020. p. 443–76.
14. Trujillo AB. Propiedades generales de los actinomicetos. Micología médica básica. 2015.

15. Quiñones-Aguilar E, Esmeralda ;., Zahaed ;., Rincón-Enríquez G. Los actinomicetos y su aplicación biotecnológica. *Elementos*. 2016;101:59–64.
16. Vázquez Castañeda S. Aislamiento y caracterización de actinomicetos endófitos de plantas endémicas cubanas como fuente de nuevos antibióticos (Doctoral dissertation, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas). 2021.
17. Franco-Correa M. Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización. *Rev Peru Biol* [Internet]. 2011;16(2). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v16i2.213>
18. Jog R, Pandya M, Nareshkumar G, Rajkumar S. Mecanismo de solubilización de fosfato y actividad antifúngica de *Streptomyces* spp. aislado de raíces de trigo y rizosfera y su aplicación en la mejora del crecimiento de las plantas. *Microbiología*. 2014;160(4):778–88.
19. Pérez Méndez DF. Evaluación del efecto de la aplicación de micorrizas y microorganismos solubilizadores de fósforo en la producción de tomate riñón (*Solanum Lycopersicum*), variedad Sheila Victory bajo invernadero en el cantón Mira. UPEC; 2021.
20. Calzada RL. Aislamiento de microorganismos solubilizadores de fósforo aislados del ANP Cerro del Cubilete, Guanajuato. 2017 [citado el 7 de diciembre de 2022]; Disponible en: <http://repositorio.ugto.mx/handle/20.500.12059/3425>
21. Cuevas Mejía J de J. Maíz: Alimento fundamental en las tradiciones y costumbres mexicanas. *PASOS Rev Tur Patrim Cult* [Internet]. 2014;12(2):425–32. Disponible en: http://www.pasosonline.org/Publicados/12214/PS0214_12.pdf
22. Guamán T, Paúl J. Estimación del rendimiento por hectárea de maíz duro seco en el Ecuador mediante redes neuronales artificiales. Quito, 2019.; 2019.

23. Alfredo. TFC. Rendimiento de 18 híbridos de maíz *Zea mays* en las condiciones edafoclimáticas de la comuna San Marcos, Santa Elena. [Santa Elena]: Universidad Estatal Península de Santa Elena; 2021.
24. Rodriguez M. Características del maíz que lo hacen una planta versátil [Internet]. delMaíz.info. Dr. Maria Rodriguez; 2022 [citado el 7 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://delmaiz.info/caracteristicas/>
25. Buñay G, Alexander D. Etapas fenológicas del maíz (*Zea mays* L.) VAR. Tusilla bajo las condiciones climáticas del cantón Cumandá, provincia de Chimborazo. 2017.
26. Martínez Gamiño MÁ, Osuna Ceja ES, Espinosa Ramírez M. Impacto acumulado de la agricultura de conservación en propiedades del suelo y rendimiento de maíz. Rev Mex De Cienc Agric [Internet]. 2019;10(4):765–78. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.29312/remexca.v10i4.1640>
27. Reyes Anistro GI, Adame Martínez S, Cadena Vargas E. Vulnerabilidad ante la variabilidad climática en los cultivos de maíz *Zea mays*. Soc ambiente [Internet]. 2018 [citado el 7 de diciembre de 2022];(17):93–113. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-65762018000200093
28. Calle V, Silvana N. Evaluación de la disponibilidad energética en el rendimiento de maíz (*Zea mays* L.) en el periodo septiembre 2020 – abril 2021. Quito: UCE; 2021.
29. Hidalgo M, Andrea J. Estudio del impacto de la variabilidad climática sobre el rendimiento del cultivo de maíz en Ecuador. Quito, 2020.; 2020.
30. Zayas AA, Fabré TB, Gómez GG, Rodríguez RAV. Respuesta agronómica del cultivo del tomate a la aplicación de cepas nativas de actinomicetos (Original). Redel Revista Granmense de Desarrollo Local. 2020;4:1154–64.

31. Wahyudi AT, Priyanto JA, Fijrina HN, Mariastuti HD, Nawangsih AA. *Streptomyces* spp. from rhizosphere soil of maize with potential as plant growth promoter. Biodiversitas [Internet]. 2019;20(9). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.13057/biodiv/d200916>

32. Cisneros J, Caro J, Mateo C, León J. In vitro assessment of plant growth-promoting potential of rhizosphere actinomycetes from *Solanum tuberosum* sp. andigena. Sci Agropecu [Internet]. 2020;11(3):391–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.03.11>

33. Rehan M, Alsohim AS, Abidou H, Rasheed Z, Al Abdulmonem W. Isolation, identification, biocontrol activity, and plant growth promoting capability of a superior *Streptomyces* tricolor strain HM10. Pol J Microbiol [Internet]. 2021;70(2):245–56. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.33073/pjm-2021-023>

34. Dai P, Zong Z, Ma Q, Wang Y. Isolation, evaluation and identification of rhizosphere actinomycetes with potential application for biocontrol of *Valsa mali*. Eur J Plant Pathol [Internet]. 2019;153(1):119–30. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-018-1547-z>

35. Zainal Abidin ZA, Abdul Malek N, Zainuddin Z, Chowdhury AJK. Selective isolation and antagonistic activity of actinomycetes from mangrove forest of Pahang, Malaysia. Front Life Sci [Internet]. 2016;9(1):24–31. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/21553769.2015.1051244>

36. Dede A, Güven K, Şahin N. Isolation, plant growth-promoting traits, antagonistic effects on clinical and plant pathogenic organisms and identification of actinomycetes from olive rhizosphere. Microb Pathog [Internet]. 2020;143(104134):104134. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104134>

37. Yamamura H, Hayakawa M, Nakagawa Y, Iimura Y. Characterization of *Nocardia asteroides* isolates from different ecological habitats on the basis of repetitive extragenic

palindromic-PCR fingerprinting. Appl Environ Microbiol [Internet]. 2004;70(5):3149–51. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.70.5.3149-3151.2004>

38. Jassim YA. Screening for Antimicrobial Activities and Enzymatic Activities Production of Some Actinomycetes spp. Isolated from different Soil Samples from Hilla Province. Medicon Microbiology. 2022;1:23–9.

39. Umi Fatmawati, Anja Meryandini, Abdjad Asih Nawangsih, Wahyudi AT. Screening and characterization of actinomycetes isolated from soybean rhizosphere for promoting plant growth. Biodiversitas [Internet]. 2019;20(10). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.13057/biodiv/d201027>

40. Rodríguez PA, Arenas R. Hans Christian Gram y su tinción. Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica. 2018;16:166–7.

41. Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet]. 2011;29(8):601–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>

42. Nguyen C, Yan W, Le Tacon F, Lapeyrie F. Genetic variability of phosphate solubilizing activity by monocaryotic and dicaryotic mycelia of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) P.D. Orton [Internet]. Vol. 143. 1992. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/bf00007873>

43. Li Q, Chen X, Jiang Y, Jiang C. Cultural, physiological, and biochemical identification of Actinobacteria. En: Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications. InTech; 2016.

44. Rashad FM, Fathy HM, El-Zayat AS, Elghonaimy AM. Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial, nematicidal and phytohormone

activities from marine environments in Egypt. Microbiol Res [Internet]. 2015;175:34–47. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2015.03.002>

45. Tuesta M. Actinomicetos nativos de la rizosfera de *Solanum tuberosum* subespecie andigena con potencial actividad antagonista a *Pectobacterium carotovorum*. 2017.

46. Sreevidya M, Gopalakrishnan S, Kudapa H, Varshney RK. Exploring plant growth-promotion actinomycetes from vermicompost and rhizosphere soil for yield enhancement in chickpea. Braz J Microbiol [Internet]. 2016;47(1):85–95. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.030>

47. Maguire JD. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. Crop Sci. 1962;2:176–7.

48. Arifuzzaman M, Khatun MR, Rahman H. Isolation and screening of actinomycetes from Sundarbans soil for antibacterial activity. African Journal of Biotechnology. 2010;9(29):4615–9.

49. Spaepen S, Vanderleyden J. Auxina e interacciones planta-microbio. Perspectivas de Cold Spring Harbor en biología. 2011;3(4).

50. Gallegos R. Capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del género *Azotobacter* y Actinomicetos aislados de cultivos de *Solanum tuberosum* Linnaeus, 1753 (Papa) cultivados en zonas altoandinas del Perú. 2009.

51. Oswald A, Calvo P. Uso de rizobacterias para mejorar la productividad de la papa. En: 15a Sociedad Internacional Trienal de Cultivos de Raíces Tropicales (ISTRC). Lima; 2009.

52. Araújo JM. Strategies for selective isolation of actinomycetes. Microbial Ecology Jaguariuna: EMBRAPA-CNPMA. 1998;351–67.

53. Anwar S, Ali B, Sajid I. Screening of rhizospheric Actinomycetes for various in-vitro and in-vivo plant growth promoting (PGP) traits and for agroactive compounds. *Front Microbiol* [Internet]. 2016;7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.01334>
54. Hamdali H, Hafidi M, Mj Y Ouhdouch Y. Actinomicetos solubilizadores de fosfato de roca: detección de actividades promotoras del crecimiento de las plantas. *Revista mundial de microbiología y biotecnología*. 2008;24(11):2565–75.
55. Gopalakrishnan S, Vadlamudi S, Bandikinda P, Sathya A, Vijayabharathi R, Rupela O, et al. Evaluation of *Streptomyces* strains isolated from herbal vermicompost for their plant growth-promotion traits in rice. *Microbiol Res* [Internet]. 2014;169(1):40–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.008>
56. Franco M. Evaluación de caracteres PGPR en Actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. [Granada]: Universidad de Granada; 2008.
57. Khamna S, Yokota A, Peberdy JF, Lumyong S. Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. *Eurasian J Biosci* [Internet]. 2010;23–32. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5053/ejobios.2010.4.0.4>
58. Zahir KA. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*. 2004;473–80.
59. Gopalakrishnan S, Pande S, Sharma M, Humayun P, Kiran BK, Sandeep D, et al. Evaluation of actinomycete isolates obtained from herbal vermicompost for the biological control of *Fusarium* wilt of chickpea. *Crop Prot* [Internet]. 2011 [citado el 7 de diciembre de 2022];30(8):1070–8. Disponible en: <http://oar.icrisat.org/id/eprint/38>
60. Larrea G. Aislamiento y caracterización morfológica de cepas nativas de actinomicetos y su actividad antagónica contra *Ralstonia solanacearum*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* sp. [Hondura]: Zamorano; 2017.

61. Evangelista-Martínez Z. Isolation and characterization of soil *Streptomyces* species as potential biological control agents against fungal plant pathogens. World J Microbiol Biotechnol [Internet]. 2014;30(5):1639–47. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-013-1568-x>
62. González-García S, Álvarez-Pérez JM, Sáenz de Miera LE, Cobos R, Ibañez A, Díez-Galán A, et al. Developing tools for evaluating inoculation methods of biocontrol *Streptomyces* sp. strains into grapevine plants. PLoS One [Internet]. 2019;14(1):e0211225. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0211225>
63. Newitt JT, Prudence SMM, Hutchings MI, Worsley SF. Biocontrol of cereal crop diseases using streptomycetes. Pathogens [Internet]. 2019;8(2):78. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens8020078>

CAPITULO VII

ANEXOS

7.1 Anexos

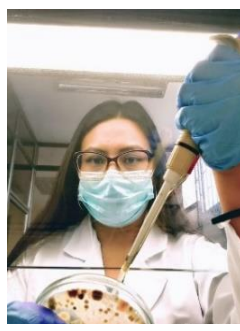
Anexo A. Aislamiento de actinomicetos de muestras de suelo de rizósfera.



Anexo B. Caracterización morfológica de aislados de actinomicetos



Diluciones seriadas



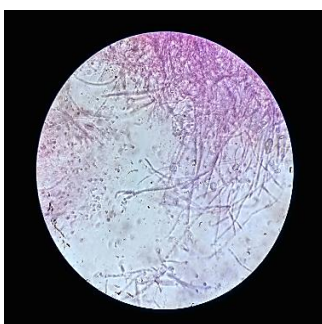
Observación macroscópica y microscópica de actinomicetos.



Anexo C. Caracterización microscópica tinción de Gram en cepas de actinomicetos



a. Cepa A14 lente 100x



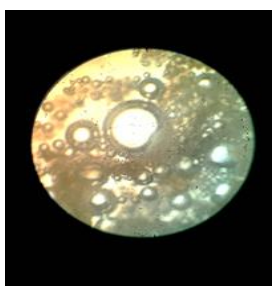
b. Cepa SQA7 lente 100x



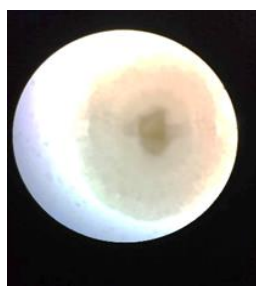
c. Cepa B11 Lente 100x

Anexo D. Desarrollo de pruebas bioquímicas en actinomicetos

Catalasa



Reacción positiva

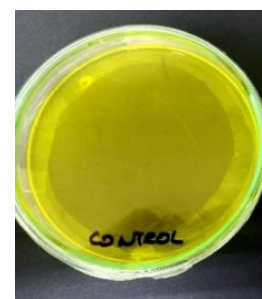


Reacción negativa

Ureasa

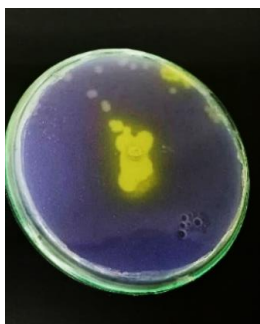


Reacción positiva

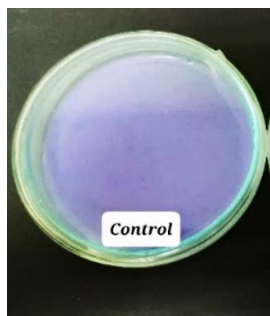


Reacción negativa

Fosfatasa

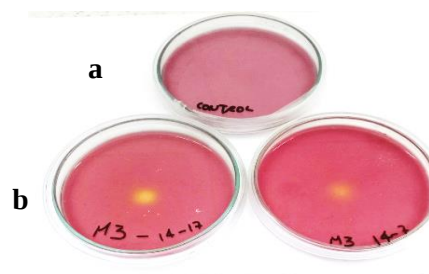


Reacción positiva



Reacción negativa

Potasio



Reacción negativa Reacción positiva

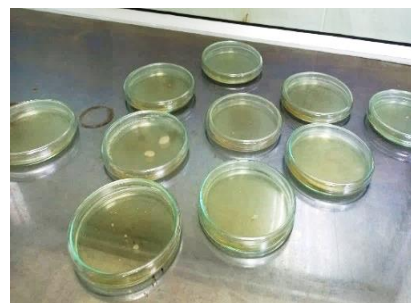
Anexo E. Ensayo de pruebas antagonista de actinomicetos



Activación del hongo
fitopatógeno



Siembra de actinomicetos



Incubación de placas

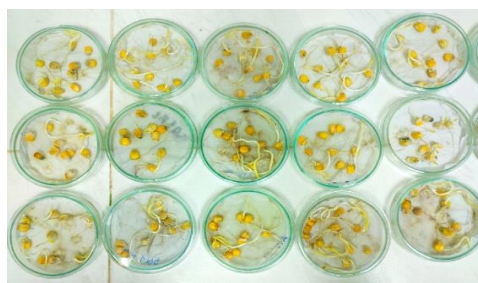
Anexo F. Detección de actividades (PGPr) de actinomicetos *in vitro*.



a. Crecimiento actinomicetos
ISP-2.



b. Conteo de UFC.



d. Semillas de maíz germinadas.



c. Inoculación de actinomicetos en
semillas de maíz.

Anexo G. Análisis de varianza de efecto antagonista de actinomicetos sobre *Fusarium* sp.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% Inhibición	30	0,99	0,99	3,48

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	12961,13	9	1440,13	439,96	<0,0001
CEPAS	12961,13	9	1440,13	439,96	<0,0001
Error	65,47	20	3,27		
Total	13026,59	29			

Anexo H. Análisis de varianza de efecto antagonista de actinomicetos sobre *L. theobromae*.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
ANTAGONISMO L theobromae	30	1,00	0,99	3,29

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	11904,01	9	1322,67	464,37	<0,0001
Tratamientos	11904,01	9	1322,67	464,37	<0,0001
Error	56,97	20	2,85		
Total	11960,97	29			

Anexo I. Análisis de varianza de sobrenadantes sobre *Fusarium* sp.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
sobrenadantes fusarium	30	1,00	1,00	1,65

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	14191,37	9	1576,82	1730,87	<0,0001
Tratamientos	14191,37	9	1576,82	1730,87	<0,0001
Error	18,22	20	0,91		
Total	14209,59	29			

Anexo J. Análisis de varianza de actinomicetos sobrenadantes sobre *L. theobromae*.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ²	Aj	CV
sobrenadantes lasidiplodia..	30	1,00	1,00	2,25	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	15013,21	9	1668,13	963,13	<0,0001
Tratamientos	15013,21	9	1668,13	963,13	<0,0001
Error	34,64	20	1,73		
Total	15047,85	29			

Anexo K. Análisis de varianza de porcentaje de germinación de semillas de maíz.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ²	Aj	CV
Germinacion	30	0,96	0,95	1,33	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	715,97	9	79,55	58,17	<0,0001
Tratamientos	715,97	9	79,55	58,17	<0,0001
Error	27,35	20	1,37		
Total	743,33	29			

Anexo L. Análisis de varianza de longitud de radicular de plántulas de maíz.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ²	Aj	CV
longitud radicular	30	0,91	0,87	7,08	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	297,71	9	33,08	23,04	<0,0001
Tratamientos	297,71	9	33,08	23,04	<0,0001
Error	28,72	20	1,44		
Total	326,43	29			

Anexo M. Análisis de varianza longitud hipocótilo de plántulas de maíz.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Longitud hipocotilo	30	0,90	0,85	4,56

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	42,16	9	4,68	19,35	<0,0001
Tratamientos	42,16	9	4,68	19,35	<0,0001
Error	4,84	20	0,24		
Total	47,00	29			

Anexo N. Análisis de varianza peso fresco

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
peso fresco	30	0,90	0,85	7,01

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	107,35	9	11,93	19,11	<0,0001
Tratamientos	107,35	9	11,93	19,11	<0,0001
Error	12,48	20	0,62		
Total	119,83	29			

Anexo O. Análisis de varianza peso seco

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PESO SECO	30	0,91	0,87	3,84

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,69	9	0,08	22,70	<0,0001
CEPAS	0,69	9	0,08	22,70	<0,0001
Error	0,07	20	3,4E-03		
Total	0,76	29			