

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
DIVISIÓN DE AGRONOMIA**



**Control Microbiano mediante bacterias esporuladas de la costra negra de la papa
(*Rhizoctonia solani*) Kühn en invernadero**

Por:

SALVADOR ORDAZ SILVA

**Presentada como Requisito Parcial para
Obtener el Título de:**

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Junio del 2004

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
DIVISIÓN DE AGRONOMIA**

**Control Microbiano mediante bacterias esporuladas de la Costra Negra de la Papa
(*Rizoctonia solani Kühn*) en invernadero**

**Por:
SALVADOR ORDAZ SILVA**

**TESIS
QUE SOMETE A CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR COMO
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE:
INGENIERO AGRÓNOMO PARASITOLOGO**

**DR. GABRIEL GALLEGOS MORALES
PRESIDENTE DEL JURADO**

**DR. F. DANIEL HERNÁNDEZ CASTILLO
SINODAL**

**DR. MELCHOR CEPEDA SILLER
SINODAL**

**DR. VICTOR MANUEL ZAMORA VILLA
SINODAL**

**M.C ARNOLDO OYERVIDES GARCIA
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE AGRONOMIA**

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, Junio del 2004

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la Memoria de mi Madre por darme la vida y la fortaleza para salir adelante a pesar de las adversidades.

Al pueblo de México que por medio de mi “Alma Mater” y el COECyT me permitieron dar un paso mas en mi vida profesional.

A Analí Ontiveros Cortés y a mi hijo David Salvador Ordaz Ontiveros por todo su apoyo, cariño y comprensión durante mi estancia lejos de ellos.

A la familia Ontiveros Cortés, por brindarme su confianza y apoyo para terminar mi carrera.

Al Dr. Gabriel Gallegos Morales por sus valiosos consejos y enseñanzas para la realización del presente trabajo.

Al Dr. Melchor Cepeda Siller por su amistad y colaboración en la revisión de este trabajo.

Al Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo por sus enseñanzas y por la revisión de la tesis.

Al Dr. Victor Manuel Zamora Villa por su valiosa ayuda en el análisis estadístico de los datos y por la revisión del presente trabajo.

A la Asociación de Estudiantes del Estado de Hidalgo por brindarme su amistad durante mi estancia en la Narro: Nicolás, Heriberto, José Manuel, Sebastián, Alfredo, Avelino, Francisco, Miguel, Mauricio,.....

A María Guadalupe Pérez Ovalle y Guillermina Reyna Sustaita por el apoyo brindado en los Laboratorios de Fitopatología del Departamento de Parasitología.

A mis amigos (as): Nicolasa, Rosalía, Martha, Adriana, Verónica, Angélica, Sussy, Jezabel, Beatriz Eugenia, Lupita, Marco Antonio, Ramón, Alex, y a todos mis compañeros de la generación XCVI.

DEDICATORIA

A la memoria de mi madre Teodosia Silva Jáuregui por darme la vida y la fuerza para salir adelante sin el tesoro mas preciado, donde quiera que estés te dedico este logro en mi vida.

A mi padre Alberto Ordaz Villa por sus sabios consejos para triunfar en la vida.

A mi hijo David Salvador y su madre Analí, que es un ejemplo de superación para mí.

A la familia Ontiveros Cortés: Guillermo Ontiveros, Hortensia Cortés, Beatriz, Benito, Néstor (+), Rogelio y Laura Ontiveros Cortés y sobre todo a mis sobrinos José Manuel, Mitzi, Daniela y Héctor.

A mis hermanos (as) y sus esposas (os):

Juan Carlos

Julián

Alberto

Tomás

Alma V. y

M. Guadalupe por brindarme su apoyo cuando lo requerí

A mis abuelos: Cornelia Villa, Julián Ordaz (+), Higinia Jáuregui (+) y Tomás Silva (+), por batallar conmigo en ausencia de mi madre durante todos estos años; a mis tíos, tías, primos, primas. GRACIAS.

A María Guadalupe Ramírez Castañeda y a Amelia Dimas Linares por su amistad y cariño a pesar del poco tiempo de conocerlas, a ellas que han estado siempre conmigo en las buenas y en las malas.

A Pedro Barcenás, Osmar Ventura López y Rebeca González por su apoyo y gran amistad.

A Cristina Sánchez, Silvia Ovalle y Faustino Lara por sus sabios consejos y enseñanzas durante mi estancia en el CISEF.

INDICE DE CONTENIDO

	PAG
INTRODUCCIÓN-----	1
REVISIÓN DE LITERATURA-----	4
Generalidades de cultivo de la papa-----	4
Historia-----	4
Importancia mundial-----	5
Importancia nacional-----	5
Costra negra de la papa-----	7
Antecedentes históricos-----	7
Ubicación taxonómica-----	7
Distribución y hospederos-----	8
Importancia-----	9
Características morfológicas-----	10
Epidemiología-----	11
Sintomatología-----	12
Medidas de control-----	13
Control químico-----	13
Control cultural-----	14
Control biológico-----	14
Modo de acción de los microorganismos antagónicos-----	17
Antagonismo-----	17
Antibiosis-----	18
Fungistático-----	18
Antibiótico-----	18

	PAG
Competencia-----	19
Inhibición-----	19
MATERIALES Y METODOS-----	21
Localización del área de trabajo-----	21
Obtención del material biológico-----	21
Bacterias antagonicas-----	21
Cultivo del hongo de <i>Rhizoctonia solani</i> -----	22
Activación del material biológico-----	22
Evaluación de la actividad antagonica de las cepas bacterianas contra <i>Rhizoctonia solani</i> -----	23
Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> -----	24
Propagación y obtención de esporas de las cepas bacterianas-----	26
Conteo de esporas-----	28
Pruebas bioquímicas de identificación de cepas de <i>Bacillus</i> spp-----	29
Ensayo experimental de antagonismo en invernadero-----	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN-----	35
Antagonismo <i>in vitro</i> -----	35
Pruebas bioquímicas-----	37
Experimento de invernadero-----	42
CONCLUSIONES-----	45
BIBLIOGRAFÍA-----	46
APÉNDICE-----	51

INDICE DE CUADROS

	PAG
Cuadro 1. Características del crecimiento de los aislados Antagónicos al crecer en agar nutritivo-----	23
Cuadro 2. Pruebas bioquímicas realizadas en laboratorio para la identificación de las cepas B ₁₅ , BCC-1 y *3-----	30
Cuadro 3. Medias (cm) del radio de crecimiento micelial de <i>Rhizoctonia solani</i> en presencia de bacterias antagónicas a diferentes tiempos de incubación-----	36
Cuadro 4. Resultados de las pruebas bioquímicas y comparación con las especies identificadas-----	38
Cuadro 5. Medias (peso en gramos) de las variables en los diferentes tratamientos-----	43
Cuadro 6. Medias del radio de crecimiento micelial de <i>Rhizoctonia solani</i> en placas de agar nutritivo en confrontación antagónica con bacterias esporuladas a las 24 horas-----	51
Cuadro 7. Medias del radio de crecimiento micelial de <i>Rhizoctonia solani</i> en placas de agar nutritivo en confrontación antagónica con bacterias esporuladas a las 48 horas-----	52
Cuadro 8. Medias del radio de crecimiento micelial de <i>Rhizoctonia solani</i>	

en placas de agar nutritivo en confrontación antagónica con
bacterias esporuladas a las 72 horas-----53

Cuadro 9. Medias del radio de crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani*
en placas de agar nutritivo en confrontación antagónica con
bacterias esporuladas a las 96 horas-----54

Cuadro 10. Medias del radio de crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani*
en placas de agar nutritivo en confrontación antagónica con
bacterias esporuladas a las 120horas-----55

Cuadro 11. Medias del radio de crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani*
en placas de agar nutritivo en confrontación antagónica con
bacterias esporuladas a las 144 horas-----56

Cuadro 12. Medias (peso en gramos) de las variables en los diferentes
tratamientos del experimento de invernadero-----57

INDICE DE FIGURAS

	PAG
Figura 1. Ramificación en ángulo recto de <i>Rhizoctonia solani</i> -----	10
Figura 2. Síntomas de <i>Rhizoctonia solani</i> en tubérculos de papa-----	12
Figura 3. Matraces en agitación con caldo nutritivo inoculado con las cepas bacterianas-----	26
Figura 4. Producción de esporas en laboratorio de las cepas bacterianas Del tipo de <i>Bacillus</i> spp-----	27
Figura 5. Cámara de Neubauer o hemacitómetro-----	28
Figura 6. Representación esquemática del ensayo experimental en Invernadero-----	34
Figura 7. Inhibición del crecimiento de <i>Rhizoctonia solani</i> por el Aislado B ₁₅ -----	36
Figura 8. Inhibición <i>in vitro</i> de <i>Rhizoctonia solani</i> por la cepa BCC-1 (izquierda) y *3 (derecha)-----	37
Figura 9. Prueba de hidrólisis de almidón por las cepas B15 y *3-----	39
Figura 10. Prueba de Voges-Proskauer-----	39

Figura 11. Prueba de reducción de nitratos-----	40
Figura 12. Prueba de Oxidación-Fermentación-----	40
Figura 13. Crecimiento en caldo nutritivo con cloruro de sodio al 7%-----	41
Figura 14. Prueba de Ryu (izquierda, positivo; derecha, negativo)-----	41

INTRODUCCIÓN

El suelo es un sustrato donde se llevan a cabo una serie de interacciones entre sus habitantes, donde cada especie tiene un rol y un nicho a explotar, de tal manera que sus poblaciones están en un balance natural hasta que la intervención del hombre se lo permite (García, 2002), citado por (Cadenas, 2003).

La rizósfera es la región del suelo inmediata a la raíz, en esta zona la actividad microbiana suele ser muy intensa, además de que la cantidad de bacterias casi siempre es superior en la rizósfera que en las regiones del suelo donde no hay raíces; esto se debe a que éstas secretan cantidades considerables de azúcares, aminoácidos, hormonas y vitaminas, estimulando el crecimiento de hongos y bacterias que a menudo forman microcolonias en la superficie de las raíces (Walter *et al.*, 1982). Dentro de éstos microorganismos encontramos a algunos que producen antibióticos o algún otro compuesto que inhibe el crecimiento de patógenos del suelo (Cadenas 2003).

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es originaria de la región andina del Sur de América. Se ha confirmado que la papa ha sido cultivada en estos lugares desde hace 8,000 años. De las 2000 especies conocidas en el género botánico *Solanum*, aproximadamente de 160-180 son plantas que forman tubérculos, 8 especies son cultivadas como plantas alimenticias pero solo *Solanum tuberosum* esta ampliamente distribuida en todo el mundo. Hoy en día la papa es un cultivo de gran importancia en la nutrición humana, ocupa el cuarto lugar en producción a nivel mundial, después del trigo, maíz y arroz.

En cuanto a sanidad se refiere, la papa tiene cientos de plagas y patógenos, incluyendo muchas malezas, insectos, nematodos, hongos, bacterias y virus, los cuales pueden ser fácilmente diseminados por el hombre debido a la forma de propagación vegetativa del cultivo, que es a través de tubérculos. La rizoctoniasis, también conocida como costra negra (por la presencia de esclerocios en la superficie de los tubérculos afectados) y cancro del tallo (por las lesiones necróticas en éste) es una enfermedad que está presente en todas las zonas productoras de papa del mundo (Frank, 1981).

Rhizoctonia solani, es un patógeno del suelo que presenta diferentes grupos de anastomosis (GA) que difieren en su patogenicidad, virulencia y rango de hospederos; en el cultivo de la papa encontramos los siguientes grupos: GA-2, GA-3, GA-4, GA-5, y GA-7 (Alonso, 1994; Pérez, 2000 y Virgen, 2000), siendo el más importante GA-3, que causa la enfermedad conocida como costra negra de la papa (Bains y Bisht, 1995). En un intento por combatir a esta enfermedad y otras que incluso pueden ser más devastadoras como el tizón tardío (*Phytophthora infestans*), se han utilizado varios funguicidas que en su inicio resultaron ser efectivos, pero que con el paso del tiempo, y debido a un mal manejo ha ocasionado que los patógenos generen resistencia hacia estos. Por otra parte, el uso irracional de los pesticidas ha ocasionado que las poblaciones de los organismos benéficos de la rizósfera decline a tal grado que el inóculo de los organismos fitopatógenos presentes en el suelo aumenten su densidad de población y causen cada día mayores pérdidas económicas a los productores. En la actualidad, el manejo de enfermedades es hacia el empleo de productos biológicos que permitan en el corto plazo restablecer la microflora y fauna benéfica de la rizósfera, que se

ha visto disminuida por el empleo excesivo de fungicidas, insecticidas y bactericidas.

Por todos los problemas antes mencionados se plantearon los siguientes objetivos para la realización del presente trabajo:

- Evaluar el antagonismo *In vitro* de cepas bacterianas (B₁₅, *3 y BCC-1) aisladas de la rizósfera de papa contra el grupo de anastomosis, GA-3 de *Rhizoctonia solani*, causante de la costra negra de la papa.
- Formular concentrados acuosos para su evaluación en invernadero contra la costra negra de la papa
- Identificar las cepas bacterianas aisladas de la rizósfera de papa mediante pruebas bioquímicas

Hipótesis

Al menos un aislado de *Bacillus* spp será identificado y tendrá actividad antagónica útil para el control de *Rhizoctonia solani*.

REVISIÓN DE LITERATURA

Generalidades del Cultivo de la Papa

Historia

El cultivo de la papa es considerado desde hace 500 años como cultivo básico de los Incas en el Perú y nativos del altiplano mexicano (Moorby, 1968).

Salamaw (1949), en estudios realizados en la escuela rusa, señalan a la Isla de Chiloe, en Chile como el centro de origen de la papa, mientras que Fernández (1981), afirma que la papa es originaria de los Andes, entre Perú y Bolivia, en donde se sabe que el cultivo existió mucho antes de la época de los Incas.

El centro de origen de la papa es la región del Cuzco y el Lago Titicaca, por ser el lugar donde existe el mayor número de especies silvestres y cultivadas de esta planta (Bukazov y Christiancen , citados por López, 1987).

La introducción de la papa a Europa fue en 1492, aunque no fue ampliamente establecida como un cultivo alimenticio. Eventualmente el cultivo se estableció en áreas del norte de este continente, especialmente en Irlanda, donde a mediados de los '70s la dieta de la mayoría de la población era a base de papa y leche (Brown, 1993).

Importancia Mundial

La papa es un cultivo de gran importancia en la nutrición humana, ocupa el cuarto lugar en producción a nivel mundial, después del trigo, maíz y arroz (Niederhauser, 1993). Esta solanácea se cultiva en mas de 125 países, con una producción anual de cerca de 250 millones de toneladas.

Villarreal (1983) menciona que la papa es uno de los alimentos mas importantes de América, ya que posee proteínas balanceadas de alta calidad con un alto contenido de lisina, que es un aminoácido básico.

Importancia Nacional

La papa se cultiva en casi todos los estados del país, comprendido desde 0 hasta 4000 msnm (SARH, 1993). En 1996 la superficie sembrada fue de 64,251 ha con una producción promedio de 1'271,951 ton. con un rendimiento promedio de 20 ton/ha (SARH, 1996). Las principales estados productores de papa en México son: Nuevo León, México, Coahuila, Puebla, Chihuahua, Tlaxcala, Veracruz, Sinaloa y Sonora, aportando el 70% de la producción nacional (SAGAR, 1995).

A principios de 1950 en las regiones de los estados de Nuevo León y Coahuila se comenzó a cultivar papa a escala comercial, hoy en día llegan a sembrarse aproximadamente 6,892 ha, motivo por el cual se considera a estos dos estados como una zona productora importante en la producción nacional de papa (SAGAR, 1995).

Dada la diversidad de condiciones climáticas de cada uno de los estados antes mencionados, México es uno de los pocos países que dispone de tubérculos todo el año (Cepeda y Gallegos, 2003).

Los rendimientos promedio en las regiones productoras de papa varían de 10-35 ton/ha, debido a las condiciones climáticas y edáficas de cada una de ellas, pero principalmente al nivel de tecnología presente en estas regiones (Villarreal, 1995; Rangel, 1998), citado por Cepeda y Gallegos, 2003.

Ramos (1992) menciona la importancia del cultivo de la papa en la región de Arteaga, Coahuila y Navidad, Nuevo León, ya que debido a la gran adaptación del cultivo y aunado al buen manejo agronómico del mismo se han obtenido resultados en rendimiento de hasta 50 ton/ha.

Bayer (1995) menciona que los investigadores y agrónomos mexicanos han logrado adaptar algunas variedades a las diversas regiones económicas y ecológicas del país, ya que en poco tiempo se han incrementado considerablemente los rendimientos en variedades como Alpha, Atlantic, Gigant, entre otras.

A pesar de lo anterior, las enfermedades han sido determinantes para este cultivo debido a que éstas afectan la cantidad y calidad de la producción. Entre las enfermedades mas importantes destacan el tizón tardío (*Phytophthora infestans*), el tizón temprano (*Alternaria solani*) y la costra negra de la papa (*Rhizoctonia solani*). Las pérdidas en papa causadas por ésta última están en relación con la proporción de esclerocios presentes en el suelo

o tubérculos de siembra, así como con el grado de emergencia de brotes, el cual se ve retrasado por la infección de los tubérculos (Smith *et al.*, 1989).

La Costra Negra de la Papa (*Rhizoctonia solani* Kühn)

Antecedentes Históricos

De Candolle en 1815 describió al género *Rhizoctonia*, asignando el nombre de *R. crocorum* (Pers.) D.C. a la especie parásita del azafrán, posteriormente en 1862, Kühn describió la enfermedad de la papa denominándola *Rhizoctonia solani* (Walker, 1965) .

Ubicación Taxonómica

La ubicación taxonómica de la costra negra de la papa, según Alexopoulos y Mims (1979) es de la siguiente manera:

Reino.....Mycetae
División.....Amastigomycota
Subdivisión.....Deuteromycotina
Clase.....Deuteromycetes
Subclase.....Hyphomycetidae
Orden.....Agonomycetales (Mycelia sterilia)
Género.....*Rhizoctonia*
Especie.....*R. solani* Kühn

En la cuarta edición de Alexopoulos *et al.*, (1996) se ubica al género *Rhizoctonia* dentro de la clase Basidiomycetes debido a su Teleomorfo *Tanatephorus cucumeris* (Frank) Donk.

Distribución y Hospederos

Rhizoctonia solani ataca una amplia gama de cultivos, entre ellos judía, remolacha, crucíferas (col, brócoli, repollo, etc), papa, tomate, así como muchas ornamentales herbáceas y especies consideradas como malezas en los cultivos (Smith *et al.*, 1992).

Esta enfermedad ocurre en todo el mundo y causa pérdidas en la mayoría de los cultivos (Agrios, 1996).

En México se encuentran presentes los grupos de anastomosis AG-2, AG-3, AG-4, AG-5 Y AG-7 (Hernández, 2002).

Comúnmente el ataque de este patógeno es limitado, desde la siembra hasta unas cuatro o seis semanas después; sin embargo en solanáceas puede ejercer acción patogénica durante todo el ciclo del cultivo (Mendoza, 1996).

R.solani es un hongo habitante del suelo, patógeno de plantas y con un amplio rango de hospederos (Liu y Sinclair, 1992), que se adapta fácilmente a condiciones diversas en todo el mundo.

Importancia

Las plantas atacadas por este patógeno pueden morir antes de emerger del suelo (ahogamiento preemergente) debido a la obstrucción del meristemo apical; si las plantas logran emerger, entonces el ataque es en la base del tallo, donde tiene lugar una pudrición húmeda que provoca que las plántulas caigan y mueran, a este síntoma se le conoce como ahogamiento postemergente (Romero, 1996), a la vez el investigador menciona que en suelos húmedos y ricos en materia orgánica el hongo produce en la base del tallo micelio de color blanco oscuro, sobre el que se originan las basidiosporas, que dan una apariencia polvorienta, considerándose ésta como la fase perfecta del hongo.

En México este hongo ha ocasionado pérdidas hasta del 30% en la producción de lechuga (Gutiérrez y Romero, 1980) y en el cultivo de frijol ha originado pérdidas superiores al 50% (Campos, 1987).

La costra negra de la papa reduce la producción y calidad del tubérculo (Carling y Leiner, 1990), ocasionando disminución en el rendimiento comercial (Otrysko y Banville, 1992).

En condiciones húmedas y frescas la enfermedad reduce la calidad de la cosecha por la formación de esclerocios, que van de un color negro a un color café, dando la apariencia de costras en la superficie de los tubérculos (Holguin, 1999).

Platt (1989) demostró que las semillas infestadas por este patógeno reducen el vigor de las plantas en un 15 % después de 30 días de siembra.

Carling y Leiner (1989) señalan que el inóculo del hongo presente en los tubérculos de papa retarda la emergencia hasta en un 23.9% de la población.

La enfermedad afecta la calidad culinaria y sanitaria de los tubérculos, pero en relación a la pérdida en los rendimientos, en la literatura existen reportes contradictorios (Castro, 1989).

En el estado de Puebla *R. solani* presenta una incidencia en tubérculos de papa de un 75% (Mendoza y Campos, 1991); en el estado de Hidalgo, de un 35% (Ponce y Mendoza, 1992); y de un 97% en el estado de Nuevo León, (Hernández *et al.*, 1993), citados por López, (1997).

Características morfológicas

Las características de *R. solani* son: ramificaciones en ángulo recto (Fig.1), un septo en la ramificación cercana al punto de origen, desarrollo de células moniloides y multinucleadas (tres o mas núcleos por célula) (Ogoshi, 1987).



Figura 1. Ramificación en ángulo recto de *Rhizoctonia solani*

El micelio es hialino en un principio y se va tornando de un color café a castaño oscuro conforme va desarrollando (Barnett y Hunter, 1987). Los esclerocios son masa compactas de células moniloides o hifas no diferenciadas de color variable según la especie; café (*R. solani*), salmón (*R. oryzae*), blanco (*R. cerealis*). El diámetro de los esclerocios varía de menos de 1 hasta 8 mm y pueden presentarse dentro o fuera del hospedero (Sneh et al., 1991). El estado teleomórfico o sexual se presenta en *Tanatephorus cucumeris* (Frank) Donk. La fase teleomórfica de *R. solani* se caracteriza por poseer basidios subcilíndricos o claviformes con cuatro esterigmas que salen a manera de verrugas, adoptando después la forma de un cuerno, las basidiosporas son elipsoidales u oblongas con paredes delgadas aplanadas en el lado interno, un poco mas ancha en la porción media (Gilman, 1963).

Epidemiología

R. solani se incrementa en terrenos donde se cultiva papa como un monocultivo o en terrenos donde se hacen rotaciones muy eventuales con otros cultivos, o bien donde se usa semilla infestada con esclerocios, suelos con temperaturas bajas (18°C óptima) y altos niveles de humedad, (Hooker, 1990).

La costra negra de la papa es mas severa en suelos moderadamente húmedos que en suelos secos o inundados, (Agrios, 1996). Por su parte Carling y Leiner, (1990) señalan que este hongo es mas frecuente en lugares con climas frescos y húmedos que en ambientes cálidos y secos.

Sintomatología

En condiciones favorables el hongo ataca plántulas antes o después de que estas emerjan; las lesiones son hundidas de color rojizo, de tamaño variable, si las condiciones son las óptimas para el hongo (exceso de humedad en el suelo y temperatura alrededor de 15°C) puede causar estrangulamiento o bien pudrición de brotes (Mendoza y Pinto, 1985).

Agrios, (1991), establece que en la mayoría de las plantas los síntomas son ahogamiento de plántulas, pudrición de raíz y plantas adultas, cáncer de tallos, y en la superficie de tubérculos la presencia de esclerocios negros endurecidos conocidos como costra negra (Fig.2).



Figura 2. Síntomas de *Rhizoctonia solani* en tubérculo de papa (costra negra)

Medidas de Control

Debido a que la enfermedad es muy difícil de controlar o manejar la única alternativa para disminuir los daños causados por este hongo es mediante técnicas de un manejo integrado de la enfermedad. Hernández *et al.*, (1993) señalan que este hongo es muy difícil de controlar, debido a que no existen medidas prácticas y efectivas de control.

Romero (1988) señala que para reducir daños de este hongo debe contarse con un buen drenaje, erradicación de malezas, rotación de cultivos, incluyendo pastos y cereales, modificar fechas de siembra para evadir el tiempo frío y húmedo que favorecen al patógeno.

Control Químico

Agrios (1996) señala que hay varios fungicidas incluyendo algunos de contacto como el iprodione y clorotalonil, así como algunos sistémicos (carboxina, triadimefon y tiofanato de metilo) que proporcionan un buen control de la enfermedad.

Ugalde (1993), (citado por Cepeda 2003) señala que los mejores fungicidas para el control de la incidencia de la enfermedad son el Pencycuron, el PCNB y la anilazina.

Romero (1988) menciona que en campo, se pueden reducir los daños de *Rhizoctonia solani* aplicando terraclor (PCNB, 12.5 kg/ha) o benomilo a 1000 ppm.

Control Cultural

Agrios (1996) señala que el uso de semilla libre de esclerocios es una buena medida de control para reducir pérdidas por esta enfermedad.

Para reducir los daños ocasionados por *R. solani*, debe ponerse especial atención en la selección de los tubérculos, suelo con buen drenaje, erradicación de malezas, rotación de cultivos incluyendo pastos y cereales y manejar fechas de siembra evadiendo el tiempo frío y húmedo que favorecen al patógeno (Romero, 1988).

Roberts y Boothroyd (1978) sugieren la plantación poco profunda de los tubérculos; además mencionan que si a los tubérculos de siembra se les permite que broten a la luz, en una semana se formaran brotes verdes y vigorosos que resistan la penetración del hongo.

Control biológico

Aunque en la práctica, el control biológico solamente debe ser considerado como un componente del control integrado, en algunos países ya se tienen a nivel comercial algunos microorganismos antagonistas para controlar algunas enfermedades de las plantas (Lewis y Papavizas, 1991).

Muchos métodos de control de las enfermedades de las plantas son de naturaleza esencialmente biológica; uno de los objetivos de dicho método es

alterar el comportamiento del ecosistema del cultivo para perjudicar al patógeno (Manners, 1986); el otro objetivo del control biológico no es la erradicación de una plaga o enfermedad, sino la reducción de éstas a niveles económicos de la densidad de población (N.A.S., 1986).

Entre los enemigos naturales de *R. solani*, los más eficientes son *Trichoderma harzianum*, *Rhizoctonia binucleada* (Gutiérrez y Torres, 1990).

Liu y Baker (1980) observaron en laboratorio que *Trichoderma harzianum* es capaz de atacar a *Rhizoctonia solani*; por su parte Sidhu y Young (1991) (citados por Carvajal, 2003) detectaron que el hongo *Laetisaria arvalis* ejercía control sobre el hongo.

Virgen y López (1992) reportaron a la bacteria *Bacillus subtilis* como antagonica de *Rhizoctonia solani* in vitro.

Bacillus subtilis tiene una marcada antibiosis sobre *Fusarium oxysporum* f sp *niveum* en pruebas de laboratorio, deformando y destruyendo especialmente el micelio. La inoculación con 1.6×10^6 bacterias por 100 gramos de semilla, protegió la raíz de sandía mejor que la dosis comercial (8×10^9) contra el ataque de este patógeno (Díaz, 1990).

Herrera y Herrera (1963) encontraron que el antibiótico producido por *B. subtilis* es capaz de inhibir a *R. solani*, *Alternaria* sp y parcialmente a *Colletotrichum* sp.

Castañeda (2001) utilizó a *B. subtilis* y *Bacillus* sp. para evaluar técnicas de antagonismo *in vitro*, en sus resultados determinó que *B. subtilis* presenta un efecto antagonista hacia *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*.

Ensayos realizados por De la Garza (1996) muestran que la aplicación de *B. subtilis* en drupáceas con una suspensión de 10^8 células por ml reduce la pudrición de los frutos causada por *Monilia fruticola*. Este mismo autor señala que la bacteria a una dosis de 10^6 a 10^7 células bacterianas por ml se utilizó para inocular semillas de cebada, trigo y avena sembradas en terrenos infestados con *R. solani*, *Pythium* sp. y *Fusarium* sp. lo cual aumentó el crecimiento y rendimiento de las cosechas (Citado por Castañeda, 2001).

De las bacterias del género *Bacillus* utilizadas para el control biológico existen algunas que a futuro pueden ser indispensables para tal efecto, tal es el caso de *B. mesentericus*, *B. obicuitarius*, *B. agri*, *B. mutabilis*, *B. rufescens*, *B. cereus*, *B. macerans*, *B. brevis*, *B. maculatus*, *B. palustris*, *B. granularis* y *B. fusiformis* (Bryan, 1981).

Las especies de *Bacillus* son las mas estudiadas por su amplia variedad en la habilidad de controlar enfermedades en las plantas. Estas especies son las mejores candidatas para el control biológico de fitopatógenos debido a que producen endosporas que son tolerantes a la temperatura y a la desecación (Weller, 1988).

Modo de Acción de los Microorganismos Antagónicos

Los mecanismos que afectan a las poblaciones de patógenos, no siempre son claros pero en general se pueden atribuir a uno de los siguientes factores: parasitismo directo y muerte del patógeno; competencia por el alimento; efectos tóxicos directos sobre el patógeno por medio de sustancias antibióticas liberadas por el antagonista. Los microorganismos antagonistas que se incorporan al suelo de un campo de cultivo no pueden competir con la microbiota que existe en él y no sobreviven durante mucho tiempo (Agrios, 1996).

En la superficie del suelo existen numerosas bacterias, la mayoría de ellas del tipo gram negativas saprofitas de los géneros *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas*, y en menor número gram positivos como *Bacillus* y *Lactobacillus* (Agrios, 1996).

Los hongos del suelo coexisten con varios microorganismos antagonistas que causan un ambiente de inanición y de metabolitos tóxicos; las esporas de muchos hongos que viven en el suelo son incapaces de germinar en este o sus tubos germinativos mueren rápidamente; sin embargo esto se contrarresta por los exudados de la raíz de las plantas hospederas que crecen en las cercanías, por lo que las esporas pueden germinar e iniciar la infección (Agrios, 1996).

Antagonismo

Todo organismo que se opone de alguna manera a la acción, presencia o supervivencia de otro, se considera que es un organismo antagonista. Esta

relación antagónica puede manifestarse por antibiosis, lisis, reacciones inmunológicas, competencia, parasitismo y predación; siendo las más importantes en el control biológico de fitopatógenos en el hiperparasitismo, la antibiosis y la competencia. El antagonismo es un fenómeno que se observa entre microorganismos del suelo y también en la rizósfera, los antagonistas producen antibióticos, actúan en competencia por nutrientes y/o inducen resistencia en el hospedero (De la Garza, 1996).

Antibiosis

Es la inhibición o destrucción de un organismo por el producto metabólico de otro; es extremadamente común entre los microorganismos, las contaminaciones bacterianas detienen en los cultivos con frecuencia el desarrollo de hongos (De la Garza, 1996).

Fungistático

Es un compuesto que evita el crecimiento de un hongo sin matarlo (Agrios, 1996).

Antibiótico

Es una sustancia química derivada de un organismo vivo, que es capaz de inhibir o incluso destruir el crecimiento de los microorganismos patógenos (Burdon, 1978).

Las sustancias antibióticas son activas, razonablemente estables, no fitotóxicas y absorbidas rápidamente, pero no se acumulan en las frutas y hortalizas; algunas actúan como protectores externos, otros se acumulan en las capas subepidérmicas y las restantes son claramente sistemáticas (Stackman y Harrar, 1968).

Competencia

Cuando dos especies ocupan un mismo hábitat y utilizan uno o varios de los mismos recursos, ambas poblaciones crecerán hasta un punto en que la mortalidad se equilibra con la reproducción. Cuando el elemento requerido es esencial, las dos poblaciones serán inevitablemente más pequeñas que si ocupasen el hábitat solo una de ellas (Nason y Dehaan, 1982).

En algunos casos de competencia microbiana, un microorganismo puede inhibir el crecimiento o metabolismo de otros. Esto puede producirse mediante la excreción de inhibidores específicos, como los antibióticos, o debido a la actividad fisiológica de un organismo que produce un producto tóxico, como el ácido que resulta de la fermentación de los azúcares (Madigan *et. al.*, 1988).

Inhibición

Es la reducción del crecimiento microbiano a causa de una disminución del número de organismos presentes, o de alteraciones en el entorno microbiano (Madigan *et al.*, 1988).

Dada la importancia que reviste actualmente el manejo de plagas y enfermedades de los cultivos agrícolas, y principalmente el cultivo de la papa donde se utilizan una gran cantidad y variedad de fungicidas para el control de enfermedades del suelo como costra negra (*R. solani*), antracnosis (*Colletotrichum coccodes*), marchitez (*Fusarium* sp), tizón tardío (*Phytophthora infestans*), roña de la papa (*Streptomyces scabies*), todas éstas reportadas en las zonas paperas de México, y particularmente en el área de influencia de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, aunado a los primeros reportes de resistencia de diversos grupos de *R. solani* a fungicidas, se planteo buscar alternativas biológicas como el empleo de bacterias antagonicas previamente reportadas para el combate de enfermedades del suelo, utilizando a la costra negra de la papa (*R. solani*) como modelo experimental de enfermedades del suelo en papa y a bacterias esporuladas del tipo de *Bacillus* spp como antagonicas hacia este hongo.

MATERIALES Y METODOS

Localización del área de trabajo

Las pruebas de antagonismo bacteriano de los aislados esporulados de experimentos de laboratorio (cepas B₁₅, BCC-1 y *3) contra el hongo (*Rhizoctonia solani*) se llevaron a cabo en el laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” (U.A.A.A.N.). El ensayo experimental de invernadero se efectuó en el invernadero del Departamento de Parasitología localizado en la Región Noreste de la Universidad, la cual se encuentra ubicada a 25° 25’ de latitud norte y 101° 00’ de longitud oeste con una altura sobre el nivel del mar de 1588 metros.

Obtención del Material Biológico

Bacterias Antagónicas

El aislado de la cepa B₁₅ se obtuvo del proyecto “Aislamiento e identificación de actinomicetos de rizósfera de suelo con actividad antagónica contra *R. solani* de las zonas paperas de Coahuila y Nuevo León (Castillo, 2001) aislada de la rizósfera de papa (reportada por Castillo 2001); el aislado BCC-1 se obtuvo de una cepa contaminada de laboratorio de cultivo de *Colletotrichum coccodes*); el aislado *3 es producto del proyecto de Tesis de Maestría en proceso de Romel de la Garza; y *B. subtilis* aislado del producto comercial Kodiak^{MR}.

Cultivo del Hongo *Rhizoctonia solani*

El grupo de anastomosis causante de la costra negra de la papa (GA3), fue proporcionado por el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología de la U.A.A.A.N.

Activación del material biológico

Para la recuperación de cada una de las cepas bacterianas se tomó una asada del cultivo en refrigeración y se sembró en cajas petri con agar nutritivo (pH 7.0) mediante la técnica de estría cruzada. Una vez realizada la siembra en las placas se incubaron durante 24-48 h a 28°C. Para corroborar la pureza de estas colonias, se tomó una colonia aislada y se volvió a realizar la siembra mediante la misma técnica. La estría se hizo lo mas cerrada posible al principio y separada al final para que se fuera diluyendo la concentración de inóculo en el asa y poder tener colonias aisladas de la bacteria.

Una vez corroborada la pureza se realizó otra siembra y se incubó por 144 h a 28°C, de donde cada 24 h se realizaó un frotis en vivo y tinción de gram para observar al microscopio compuesto las características morfológicas de cada una de las cepas y determinar el tiempo que la bacteria tardó en producir y liberar la espora (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características de crecimiento de los aislados antagónicos al crecer en Agar Nutritivo.

Tiempo (h)	F a s e d e l a b a c t e r i a		
	BCC-1	B ₁₅	*3
24	Vegetativa	Vegetativa	Vegetativa
48	Vegetativa	Vegetativa	Vegetativa
72	Formación de espora	Vegetativa	Formación de espora
96	Liberación de espora	Vegetativa	Las tres fases
120	Espora	Formación de espora	Las tres fases
144	Espora	Liberación de espora	Espora

La recuperación de la cepa del hongo *Rhizoctonia solani* se realizó en cajas petri con medio de cultivo agar nutritivo (AN) y papa dextrosa agar (PDA). Con un sacabocados estéril se tomó un explante del hongo y se colocó al centro de la placa con medio de cultivo para su reproducción; para corroborar la pureza de la cepa se realizaron preparaciones en portaobjetos con lactofenol y se observaron al microscopio compuesto.

Evaluación de la Actividad Antagónica de las Cepas Bacterianas contra *Rhizoctonia solani*

Para realizar las confrontaciones se utilizó medio de cultivo agar nutritivo, el cual favorece el crecimiento de los organismos en cuestión (García *et al.*, 2002). El método utilizado para este fin fue el propuesto por Korsten *et al.*,(1995) (citado por Cadenas, 2003). En una caja petri sin medio de cultivo se marcaron dos ejes, uno vertical y otro horizontal; en la

intersección de éstos se marco un punto, el cual representó el centro de la caja. A partir del centro se midieron 3.5 cm a cada uno de los puntos cardinales y se colocó una marca. Esta caja marcada sirvió como molde para posteriormente realizar las confrontaciones, colocando al centro de la caja con medio de cultivo el explante del hongo y en los cuatro puntos cardinales la bacteria antagonica.

Pruebas de Antagonismo *in vitro*

Con un sacabocados estéril de 5 mm de diámetro se marcaron suficientes explantes del hongo sembrado en cajas con medio de cultivo PDA. Posteriormente con una aguja de disección se colocó un explante del hongo en el centro de la caja petri con medio de cultivo AN y con un asa microbiológica también estéril se colocó el inóculo de la bacteria en cuestión en cada uno de los cuatro puntos marcados en los ejes. La caja petri se rotuló con los datos correspondientes de la bacteria en cuestión. Este procedimiento se llevó a cabo para cada una de las bacterias antagonicas en estudio.

En otra caja petri con medio de cultivo AN se colocó un explante del hongo al centro de la misma, esta caja es la que sirvió como testigo para las pruebas de confrontación.

Después de la identificación las cajas se sellaron con kleen pack para incubar a 28°C hasta que el hongo testigo llenara por completo la misma. Cada 24 h se midió el crecimiento del hongo hacia la bacteria, reportando la media de cuatro repeticiones como una sola medida y analizando los datos de cada cepa en un Diseño Completamente al Azar.

Para transformar el crecimiento del hongo en porcentaje de inhibición, se utilizó la fórmula propuesta por Skidmore (1976) citado por García (2002):

$$GI = \frac{Kr-r1}{Kr} \cdot 100$$

Donde:

GI = Porcentaje de inhibición

Kr = Distancia (cm) del crecimiento del hongo, medida del punto de inoculación al margen de la colonia en la caja petri utilizada como testigo

r1 = Distancia del crecimiento del hongo, a partir del punto de inoculación al margen de la colonia en dirección del antagonista

Propagación y Obtención de Esporas de las Cepas Bacterianas

La bacteria se inoculó a matraces con caldo nutritivo estéril con un asa bacteriológica y se colocó este en el agitador a 150 rpm y 29°C durante tres días (Fig. 3).



Figura 3. Matraces en agitación con caldo nutritivo inoculado con las cepas bacterianas

Posteriormente se tomaron 5 ml con una pipeta estéril y se inoculó homogéneamente en frascos con agar nutritivo (AN) para la producción de esporas en fase sólida.

La conservación de las bacterias se llevó a cabo en placas con medio agar nutritivo y la propagación de las mismas se hizo de la siguiente manera: en un frasco rectangular de 2 l de capacidad se prepararon 225 ml de AN y se dejó solidificar de manera horizontal (Fig. 4).

Los frascos se incubaron a 29°C durante 5-8 días y posteriormente se hizo un barrido del crecimiento bacteriano para recolectar las bacterias en tubos de ensayo de 50 ml y calcular la concentración de bacterias en número de esporas por ml, lo anterior se hizo por medio de la cámara de Neubauer o hemacitómetro. Antes de realizar el barrido se hizo un frotis *in vivo* para corroborar la pureza de la bacteria y presencia de esporas.



Figura 4. Producción de esporas en laboratorio de las cepas bacterianas del tipo de *Bacillus spp*

La concentración obtenida en el laboratorio se ajustó a una concentración de 1×10^7 , que es la concentración recomendada comercialmente para otras bacterias antagónicas, como es el caso de *Bacillus subtilis* (Kodiak^{MR}).

Conteo de Esporas

Para realizar el conteo de esporas de la solución stock obtenida de cada una de las bacterias se realizaron 3 diluciones en tubos Eppendorf con agua destilada estéril (9:1). Posteriormente se tomó con una micropipeta una muestra de 100 microlitros para colocarla en la cámara de Neubauer y realizar el conteo bajo el microscopio compuesto. Para el cálculo de el número de esporas por mililitro se contaron 5 cuadros de 16 cuadrantes cada uno y se dividió entre cinco para sacar el promedio por cuadro. Posteriormente se multiplicó por 25, que es el número de cuadros de la cámara, por 1000, que es el número de diluciones (10^{-3}), y por 10,000, que es la profundidad del hemacitómetro (Fig. 5).

La fórmula para obtener el número de esporas por ml esta dada por:

No de esporas/ml = [(Número total de esporas contadas en 5 cuadros)/5]X25X1000X10000



Figura 5. Cámara de Neubauer o hemacitometro

Pruebas Bioquímicas de Identificación de Cepas de *Bacillus* spp

El género *Bacillus* comprende las bacterias en forma de bastón capaces de formar endosporas refráctiles aeróbicamente, las cuales son mas resistentes que las células vegetativas al calor, sequía y otros agentes adversos, además este género es generalmente catalasa positivo. Debido a la gran dificultad para diferenciar a las especies, no solo de este género, sino de la gran mayoría de géneros y especies bacterianas, es necesario llevar a cabo una serie de métodos y pruebas en diferentes medios de cultivo para hacer una clasificación de éstas.

En el presente trabajo se realizaron una serie de pruebas bioquímicas en laboratorio para la identificación de las cepas bacterianas utilizadas durante el mismo (Cuadro 2).

Ensayo Experimental de Antagonismo en Invernadero

El experimento se realizó en el invernadero del Departamento de Parasitología ubicado en la parte Noreste de la Universidad, colindando al Norte con los invernaderos del Departamento de Forestal. Este se llevó a cabo en una cama de 1x7 m, en la cual se sembraron papas inoculadas con las bacterias antagónicas colocando seis tubérculos por tratamiento, los cuales fueron: aislado de la cepa B₁₅ aislada de la rizósfera de papa (reportada por Castillo 2001) ; BCC-1 (contaminante de laboratorio de cultivo de *Colletotrichum coccodes*); *3 (cepa aislada y reportada clave de Tesis de Maestría en proceso por Romel de la Garza, 2004; *Bacillus subtilis* (aislado

Cuadro 2. Pruebas bioquímicas realizadas en laboratorio para la identificación de las cepas B₁₅, BCC-1 y *3

Prueba
Tinción de Gram.
Prueba de Ryo
Tipo de espora
Crecimiento en agar anaeróbico
Voges-Proskauer
Utilización de arabinosa
Utilización de manitol
Hidrólisis de almidón
Caseinasa
Reducción de nitratos
Crec. en cloruro de sodio (7%)
Crecimiento a 3°C
Temperatura máxima de crec.
Utilización de citratos
Crec. en pH 5.7
Motilidad
Licuefacción de gelatina
Oxido/fermentación
Catalasa
Crecimiento en YDC

Las pruebas anteriores se citan en el Manual de agricultura No 427 (Gordon, E.R., 1973), en la Guía para prácticas de microbiología general (Castillo, T.J., 1973) y en el Manual de Bergey (1974).

del producto Comercial Kodiak^{MR}); Pentacloro nitrobenzono (PCNB) como testigo comercial; Mezcla de las tres cepas bacterianas de laboratorio (B₁₅+BCC-1+3); y un testigo absoluto.

El suelo de la cama fue previamente inoculado con esclerocios de *R. solani* para asegurar la presencia de la enfermedad. El material enfermo fue colectado de los mercados de la ciudad y la obtención de los esclerocios se hizo retirando la cáscara con síntomas y signos característicos, la cual se puso a secar para posteriormente molerla en la licuadora hasta obtener el polvo que se aplicó al suelo.

La cama experimental fue previamente surcada de forma manual, posteriormente a cada surco se le aplicó aproximadamente 2.5 g del polvo con esclerocios y se fertilizó con 17-17-17 (15 g aprox.); la papa se colocó en el surco, la cual se sumergió previamente en la solución a probar para inocularla con el tratamiento o producto a probar (bacteria, mezcla, PCNB). Cada tratamiento se regó con una solución líquida de fertilizantes que consistió de: Biozime TF^{MR} como regulador de crecimiento (10 ml), Raizplant^{MR} como enraizador (10 ml) y Bionex^{MR} como coadyuvante (2 ml). Finalmente se cubrió el surco con suelo y se tapó la cama con hule para acelerar la brotación y emergencia (Fig. 6).

Las variables medidas en invernadero fueron peso total (PT), peso de tubérculos (Ptub) y peso del follaje (PF), todos por planta (repetición). Para medir las variables se realizó la cosecha en bolsas de papel destrasa y se llevó a laboratorio para pesar el contenido (PT); posteriormente se retiró el follaje y se peso el tubérculo o rendimiento (Ptub); el peso del follaje se sacó por diferencia entre las dos variables pesadas ($PF=PT-Ptub$).

El diseño utilizado para el análisis de los datos de laboratorio e invernadero fue un Diseño Completamente al Azar (DCA) con igual número

de repeticiones (cinco) en laboratorio y con diferente número de repeticiones en invernadero (un dato perdido en el tratamiento con BCC-1). En laboratorio cada repetición representa la media de cuatro mediciones.

Los datos se analizaron bajo el DCA que funciona bajo el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij} \text{ donde:}$$

Y_{ij} = valor observado de la variable

μ = efecto de la media general del experimento

T_i = efecto del i ésimo tratamiento

E_{ij} = error experimental

Para la comparación de medias se utilizó la Diferencia Mínima Significativa (DMS) al 0.05% para la variable de laboratorio con la fórmula siguiente:

$$DMS = \sqrt{\frac{2s^2}{r}}$$

donde:

s^2 = cuadrado medio del error

r = número de repeticiones

Para la variable de invernadero se uso una prueba de “t” dela forma siguiente:

$$t_c = \frac{X_i - X_j}{sd}$$

donde:

X_i = media del tratamiento i

X_j = media del tratamiento j

sd= error estándar de la diferencia entre las medias i e j

Fig. 6. Representación esquemática del ensayo experimental en invernadero



a) Surcado de la cama



b) Aplicación del polvo con Rhizoctonia y fertilizante (17-17-17)



c) Siembra de la papa inoculada



d) Fertilización con la mezcla

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Antagonismo *in vitro*

Los datos obtenidos en laboratorio (Cuadro 3) muestran una clara diferencia entre las cepas utilizadas con respecto al testigo, por lo cual se considera al antagonismo *in vitro* como una buena técnica para conocer los efectos de las bacterias sobre hongos causantes de enfermedades.

El aislado de la cepa B₁₅ muestra en menor tiempo mayor porcentaje de inhibición contra *Rhizoctonia solani* (92.68%), resultado semejante a lo reportado por García (2002) y Cadenas (2003).

La bacteria B₁₅ mostró el mejor antagonismo hacia el hongo causante de la costra negra de la papa (*R. solani*), (Fig. 7), ya que en un menor tiempo (48 h) inhibió el crecimiento de éste (92.68% de inhibición). Las cepas *3 y BCC-1 mostraron resultados similares en cuanto al tiempo y forma de inhibición con un porcentaje de inhibición de 53.14 y 56.4%, respectivamente (Fig. 8). Los análisis estadísticos muestran que hay una diferencia significativa entre tratamientos, encontrando hasta cuatro grupos de significancia en la interacción tiempo-tratamiento (Cuadro 3). Se aprecia también que en el tiempo de 24 h las cepas BCC-1 y *3 dejaron crecer menos al hongo, tendencia que tiende a cambiar a partir de las 72 horas en el siguiente orden: B₁₅, *3 BCC-1 y testigo, no mostrando diferencia significativa entre los tratamientos BCC-1 y *3, pero si con respecto al testigo. De acuerdo con De la Garza (1996) (citado por Cadenas, 2003), la cepa B₁₅ ejerce su poder antagonista mediante competencia, ya que presenta una alta capacidad para

desarrollarse y difundirse sobre el medio de cultivo inhibiendo el desarrollo de *R. solani* y de otros hongos, mientras que las cepas *3 y BCC-1 inhiben por antibiosis dado que al parecer el crecimiento del hongo se detiene antes de llegar al crecimiento de la bacteria, factiblemente debido a una sustancia de excreción biocida, no así para con el aislado B₁₅, el cual crece aun sobre el desarrollo del hongo (Fig. 7).

Cuadro 3. Medias (cm) del radio del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* en presencia de bacterias antagonicas a diferentes tiempos de incubación

Tratamiento	T	I	E	M	P	O
	24	48	72	96	120	144
B ₁₅	0.367 B	0.256 B	0.256 C	0.256 D	0.256 D	0.256 D
*3	0.222 BC	0.41 B	0.746 B	1.358 B	1.598 B	1.64 B
BCC-1	0.13 C	0.4 B	0.886 B	1.236 C	1.31 C	1.526 B
Testigo	1.12 A	1.92 A	2.55 A	3.112 A	3.44 A	3.5 A

* Medias con la misma letra no muestran diferencia significativa

Figura 7. Inhibición del crecimiento de *Rhizoctonia solani* por el aislado antagonico B₁₅

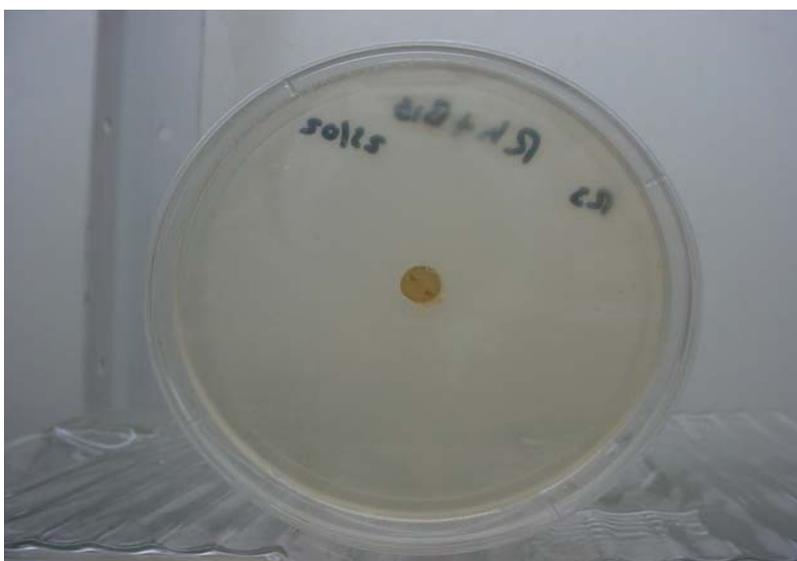


Figura 8. Inhibición in vitro de *Rhizoctonia solani* por la cepa BCC-1 (Izquierda) y *3 (Derecha)



Pruebas Bioquímicas

De acuerdo a las pruebas bioquímicas realizadas en el laboratorio (Cuadro 4, Figuras 9-14) y siguiendo las claves de el manual de agricultura No. 427 The Genus *Bacillus* (Gordon, 1973) se determinó que las cepas utilizadas para el presente trabajo correspondían a las siguientes especies:

BCC-1-----*Bacillus polymyxa* con un 99% de similitud

*3-----*Bacillus subtilis* con un 100% de similitud

B₁₅-----*Bacillus pumilus* con un 94.12% de similitud

La cepa B₁₅ se identificó como *B. pumilus* debido al porcentaje de similaridad con esta especie (94.12%), aún que con la clave utilizada se llegó a la especie de *Bacillus megaterium*, con la cual se presentó una similitud de apenas un 90% en las pruebas bioquímicas, sin tomar en cuenta las

características coloniales, las cuales concuerdan totalmente con las de *B. pumilus*.

Cuadro 4. Resultados de las pruebas bioquímicas y comparación con las especies identificadas

Prueba	B	A	C	T	E	R	I	A
	B. megaterium	B ₁₅	B. pumilus	BCC-1	B. poymyxa	*3	B. subtilis	
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+
Ryu	Nd	-	Nd	-	nd	-	nd	
Espora	S/T	S	S/T	S	T	S	T	
Crec. en agar anaeróbico	-	-	-	+	+	-	-	
V-P	-	-	+	+	+	+	+	
Utilización de arabinosa	+	+	+	+	+	+	+	
Utilización de manitol	+	+	+	+	+	+	+	
Hidrólisis de almidón	+	-	-	+	+	+	+	
Caseinaza	+	+	+	+	+	+	+	
Reducción de nitratos	D	-	-	+	+	+	+	
Crec. en NaCl (7%)	+	+	+	-	-	+	+	
Crec. a 3°C	+	+	+	-	-	+	+	
Temp. máxima de crecimiento	45°C	45°C	45-50°C	45°C	35-45°C	55°C	55°C	
Utilización de citratos	+	+	+	-	-	-	+	
Crec. en pH 5.7	+	+	+	+	+	+	+	
Motilidad	+	+	+	+	+	+	+	
Licuefacción de gelatina	+	-	-	-	nd	+	+	
O/F	nd	+	Nd	+	+	+	+	
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	
Crecimiento en YDC	nd	+	Nd	+	nd	+	nd	

nd = no determinado, S = Subterminal, T = Terminal, d = difiere.

Figura 9. Prueba de hidrólisis de almidón por las cepas B15 y *3



Figura 10. Prueba de Voges- Proskauer



Figura 11. Prueba de reducción de nitratos



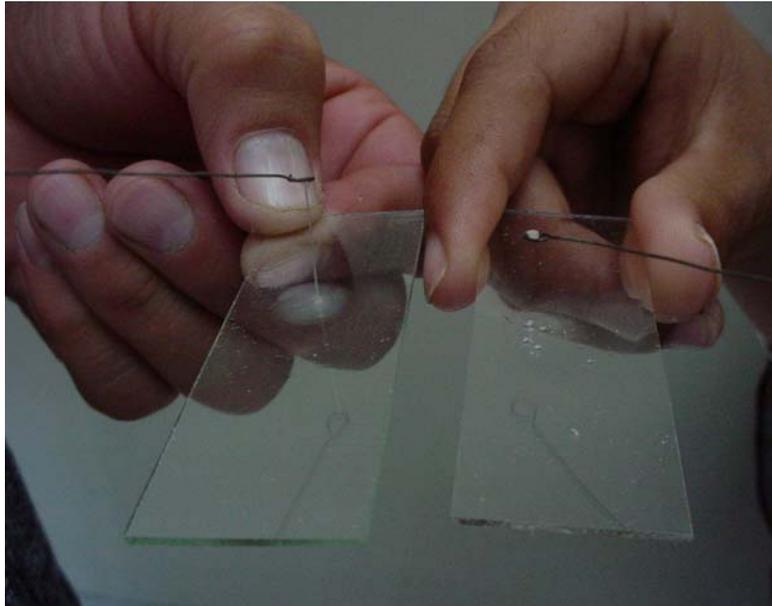
Figura 12. Prueba de Oxidación-Fermentación



Figura 13. Crecimiento en caldo nutritivo con cloruro de sodio al 7%



Figura 14. Prueba de Ryu (Izquierda, positivo; derecha, negativo)



Experimento de Invernadero

La incidencia y severidad de *Rhizoctonia solani* sobre los tubérculos y tallos de papa mostraron datos muy heterogéneos que incluyeron a un testigo sin la presencia de la enfermedad por lo que solo se analizaron los efectos sobre biomasa producidos en cada uno de los tratamientos. El tratamiento con la inoculación de la bacteria B₁₅ fue el que presentó datos de variables de producción con mayor valor, aunque no hubo diferencia significativa entre los tratamientos utilizados. La única diferencia observada fue con las cepas *3 y B₁₅ con respecto al testigo en las variables Peso Total (PT) y Peso del Tubérculo (Ptub), mientras que en la variable Peso de Follaje (PF) no hubo diferencias entre tratamientos (Cuadro 5).

Trabajos realizados con anterioridad por Cadenas (2003), Castillo (2001), Lagunas (2001) y Gutiérrez (2002) muestran inhibición *in vitro* sobre cultivo de hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, *Colletotrichum gloesporoides* y *Fusarium oxysporum* pero no muestran datos de ensayo de invernadero o campo con estos aislados, sin embargo existen reportes (Díaz, 1990) que señalan que las bacterias esporuladas del tipo de *Bacillus* muestran un efecto hormonal sobre el crecimiento de las plantas y su efecto biocida sobre fitopatógenos, tal y como se encontró en esta investigación.

Cuadro 5. Medias (peso en gramos) de las variables en los diferentes tratamientos

Tratamiento	Medias (peso en gramos de las diferentes variables)*		
	PT	Ptub	PF
*3	968.33 A	760.83 A	207.50 A
B ₁₅	938.33 A	778.33 A	160.00 A
BCC-1	794.00 AB	564.00 AB	230.00 A
Kodiak	720.83 AB	535.00 AB	185.83 A
Mezcla	698.33 AB	517.50 AB	180.83 A
PCNB	645.00 AB	494.16 AB	150.83 A
Testigo	490.00 B	275.833 B	214.16 A

* Medias con la misma letra no muestran diferencia significativa

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran una clara tendencia de las cepas utilizadas hacia la inhibición de la enfermedad conocida como costra negra de la papa, sobre todo de la bacteria identificada como *Bacillus pumilus* para el caso de antagonismo *in vitro* y de *B. pumilus* (B₁₅) y *B. subtilis* (*3) para el caso de invernadero, ya que estas fueron las únicas que mostraron una diferencia significativa en relación con el testigo.

Los resultados obtenidos sobre el potencial de control de las cepas de *Bacillus pumilus*, *B. polymyxa* (resultados de este trabajo), *Bacillus firmus* (Lagunas, 2001) comprueban claramente el potencial de biocontrol de esporulados de suelo que poseen las bacterias reportadas.

De igual manera, datos publicados por García (2002) y Castillo (2001) muestran a *Bacillus pumilus* (B₁₅) como una bacteria con amplias posibilidades

de ser empleado como agente antagónico para el control de la costra negra, dado que experimentos realizados *in vitro* con este aislado muestran porcentajes de inhibición que oscilan entre un 50 y un 87% (García, 2002) para diferentes grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani*. La bacteria *Bacillus pumilus* (B₁₅) se puede considerar como un agente potencial para el control de esta y otras enfermedades de la papa en un programa de manejo integrado del cultivo debido a que en las confrontaciones de laboratorio, prácticamente no dejó crecer al hongo y de presentarse este mismo efecto en campo favorecerá reducir fuertemente el uso de fungicidas para el control de fitopatógenos del suelo.

CONCLUSIONES

Las tres bacterias utilizadas presentaron inhibición *in vitro* contra *Rhizoctonia solani*, siendo B₁₅ la que presentó mejores resultados (92.68%), dado que solo requirió de 48 h para inhibir el crecimiento del hongo, en tanto que las cepas BCC-1 y *3 requirieron de 144 h (6 días).

Las pruebas bioquímicas indican que el aislado B₁₅ es *B. pumilus* debido al porcentaje de similaridad con esta especie (94.12%), aún que con la clave utilizada se llegó a la especie de *Bacillus megaterium*, con la cual se presentó una similitud de apenas un 90% en las pruebas bioquímicas, sin tomar en cuenta las características coloniales, las cuales concuerdan totalmente con las de *B. pumilus*; el aislado BCC-1 es la especie *B. polymyxa* con un 99% de similitud y *3 con un 100% de similitud con *B. subtilis*.

En el experimento de invernadero se observa que solamente las cepas B₁₅ y *3 muestran diferencia con el testigo en las variables Peso Total y Peso de Tubérculo, mientras que la cepa BCC-1, la mezcla de las tres, el testigo químico (PCNB) y el testigo comercial (Kodiak, a base de *B. subtilis*) no mostraron ninguna diferencia estadística con el testigo en ninguna de las tres variables evaluadas (PT, Ptub, PF), aunque numéricamente si la hubo.

Por su desempeño en invernadero las cepas B₁₅ y *3 favorecieron una mayor producción respecto al testigo absoluto, sin diferencia en el peso del follaje.

BIBLIOGRAFÍA

Agrios, G.N. 1996. Fitopatología. 2^a edición. Editorial Limusa; México. 838 p.

Alexopoulos, C.J. 1979. Introducción a la Micología. Tercera edición. Editorial Universitaria de Buenos Aires, Argentina: pp 424-425.

Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., and Backwell, M. 1996. Introductory Micology 4^a edition. John Wiley and Sons, Inc. New York. 869 p.

Alvarado, N.R 1997. Patogenicidad de tres cepas de *Rhizoctonia* aisladas de maleza, frijol y zanahoria en las variedades de papa (*Solanum tuberosum* L) Alpha y Mundial. Tesis Maestría U.A.A.A.N. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México: pp 5.

Anderson, N.A. 1982. The Genetic and pathology of *Rhizoctonia solani* Ann. Rev. Phytopathology. 20: 329-374.

Bains, P.S., and Bisht, V. S. 1995. Anastomosis Group Identity and Virulence of *Rhizoctonia solani* isolates collected from potato plants in Alberta, Canada. Plant Dis. 79: 241-242.

Barrera, J.F. 1999. Introducción, filosofía y alcance del Control Biológico. X Curso Nacional de Control Biológico. Montecillo, Estado de México. 271 p.

Buchanan, R.E. and Gibbons N.E. 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology. Eighth Edition. Editorial Board: 1268 p.

Cadenas, V.A. 2003. Actividad antagónica de *Bacillus* sp B₁₅ para *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani*. Tesis de Licenciatura U.A.A.A.N. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México: 59 p.

Calderón, A.V. 1978. Enfermedades de la papa y su control. 1ª Edición. Editorial Hemisferio Sur, Argentina: pp 45-47.

Carvajal, C.C.R. 2003. Susceptibilidad a Funguicidas de grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* del estado de Chihuahua, México. Tesis de Maestría. U.A.A.A.N. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México: 41 p.

Castañeda, P.N. 2001. Métodos *in vitro* para determinar el efecto antagónico de *Bacillus subtilis* y *Bacillus* sp sobre el complejo de la secadera del chile (*Capsicum annuum* L). Tesis de Licenciatura U.A.A.A.N. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México: 80 p.

Castillo, F.E. 2001. Efectividad *in vitro* de actinomicetos aislados de la rizósfera de la papa (*Solanum tuberosum* L) de los Estados de Coahuila y Nuevo León sobre *Rhizoctonia solani* Kühn. Tesis de Maestría. U.A.A.A.N. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 50 p.

Castillo, T.J., Herminia M.R. y Homero G.C. 1973. Guía para prácticas de microbiología general. Universidad Autónoma de Nuevo León: 58 p.

Cepeda, S. M. Y Gallegos, M. G. 2003. La papa, el fruto de la tierra. 1ª Edición. Editorial Trillas: 249 p.

Díaz, P.A. 1990. Antagonismo de *Bacillus subtilis* contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* y su eficiencia en el control del marchitamiento de la sandía en Invernadero. Tesis de Licenciatura U.A.A.A.N. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 34 p.

Flores, A.G. 1995. Antibiosis de bacterias del rizoplano contra hongos causantes de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L). Tesis de Licenciatura. U.A.A.A.N. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 35 p.

Gallegos, M.G., García, F. J., Hernández, C.F.D., Flores, O.A., Cepeda, S.M. y Zamora, V.V.M., 2002. Evaluación *in vitro* de bacterias antagónicas de rizósfera de papa contra grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* presentes en México. XXIX congreso internacional de la sociedad mexicana de fitopatología. Memorias. F-40.

García, F.J. 2002. Evaluación *in vitro* de Bacterias Antagónicas aisladas de la rizósfera de papa contra trece grupos de anastomosis multinucleados de *Rhizoctonia solani*. Tesis de Licenciatura. U.A.A.A.N. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 67 p.

Gordon, E.R. 1973. The genus *Bacillus*. Agricultural Handbook No 427. U.S.D.A.: 283 p.

Gutiérrez, A.J.G., Gutiérrez, A.O., Nieto, A.D., Teliz, O.D., Delgadillo, S.F. y Vaquera, H.H. 2002. Evaluación *in vitro* de agentes biológicos y físicos para el

control de *Colletotrichum gloeosporoides* (Penz.). revista mexicana de Fitopatología. pp 199.

Hernández, C.F.D., Corona, Z.A., Pérez, Ch.A., Carvajal, C.C., Lira, S.H., Cepeda, S.M. y Gallegos, M.G., 2002. Grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* en diferentes regiones paperas de México. Conferencia panamericana de fitopatología. pp 7.

Lagunas, L.J., Zavaleta, M.E., Osada, K.S., Aranda, O.S., Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Luna, R.I. y Vaquera, H.H. 2001. *Bacillus firmus* como agente de control biológico de *Phytophthora capsici* Leo en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Revista Mexicana de fitopatología. pp 62.

López, N.L. 1997. Estudio de la efectividad biológica del Tiofanato de Metilo para el control de la costra negra de la papa en San Felipe, Municipio de Arteaga, Coahuila. Tesis de Licenciatura. U.A.A.A.N. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 48 p.

Mendoza, Z.C. 1996. Enfermedades fungosas de hortalizas. Universidad Autónoma Chapingo, México: pp 39-44.

Randall, C.R. 1993. Potato health management. The American Phytopathological Society. USA: 178 p.

Romero, C.S. 1993. Hongos Fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo, México: 347 p.

SARH. 1993. El cultivo de la papa. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Delegación Estatal Coahuila: 8 p.

SARH. 1995. Manual de estimación de cosechas del cultivo primavera-verano y temporal 1995/1995. SARH Delegación Estatal Chihuahua.

Sidhu, J. and Young, R.J. 1991. Biological control of Rhizoctonia stem canker and black scurf of potato with a basidiomycetous fungus *Phytopathology* 81 (5): 704.

APENDICE

Cuadro 6. Medias del Radio de Crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* en placas de agar nutritivo en confrontación antagónica con bacterias esporuladas a las 24 h..

Tratamiento	R E P E T I C I O N E S*				
	1*	2*	3*	4*	5*
B ₁₅	0.34	0.31	0.495	0.34	0.35
BCC-1	0.1	0.1	0.0	0.2	0.25
*3	0.23	0.15	0.3	0.15	0.28
Testigo	1.2	1.0	0.9	1.2	1.3

*Medias del radio de crecimiento de *Rhizoctonia solani* en cm

ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente	g.l	SC	CM	Valor de F	P>F
Tratamiento	3	3.0489	1.0163	86.84**	0.0001
Error	16	0.1872	1.1081		
Total	19	3.2362			

** Altamente significativo a un 99.99% de probabilidad

Cuadro 7. Medias del Radio de Crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* en placas de agar nutritivo en confrontación antagónica con bacterias esporuladas a las 48 h..

Tratamiento	R E P E T I C I O N E S				
	1	2	3	4	5
B ₁₅	0.45	0.4	0.0	0.43	0.0
BCC-1	0.47	0.5	0.23	0.31	0.49
*3	0.42	0.31	0.52	0.29	0.51
Testigo	1.9	1.9	1.7	2.1	2.0

ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente	g.l	SC	CM	Valor de F	P>F
Tratamiento	3	9.2549	3.0849	119.13**	0.0001
Error	16	0.4143	0.0258		
Total	19	9.6692			

** Altamente significativo a un 99.99% de probabilidad

Cuadro 8. Medias del Radio de Crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* en placas de agar nutritivo en confrontación antagónica con bacterias esporuladas a las 72 h..

Tratamiento	R E P E T I C I O N E S				
	1	2	3	4	5
B ₁₅	0.45	0.4	0.0	0.43	0.0
BCC-1	1.0	0.9	0.7	0.83	1.0
*3	0.85	0.75	0.74	0.52	0.87
Testigo	2.48	2.4	2.1	2.92	2.85

ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente	g.l	SC	CM	Valor de F	P>F
Tratamiento	3	14.9279	4.9759	97.36**	0.0001
Error	16	0.8177	0.0511		
Total	19	15.7456			

** Altamente significativo a un 99.99% de probabilidad

Cuadro 9. Medias del Radio de Crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* en placas de agar nutritivo en confrontación antagónica con bacterias esporuladas a las 96 h..

Tratamiento	R E P E T I C I O N E S				
	1	2	3	4	5
B ₁₅	0.45	0.4	0.0	0.43	0.0
BCC-1	1.15	1.37	1.24	1.25	1.17
*3	1.6	1.43	1.32	1.08	1.36
Testigo	3	2.95	2.81	3.4	3.4

ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente	g.l	SC	CM	Valor de F	P>F
Tratamiento	3	21.1778	7.0592	164.17**	0.0001
Error	16	0.6880	0.0430		
Total	19	21.8658			

** Altamente significativo a un 99.99% de probabilidad

Cuadro 10. Medias del Radio de Crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* en placas de agar nutritivo en confrontación antagónica con bacterias esporuladas a las 120 h.

Tratamiento	R E P E T I C I O N E S				
	1	2	3	4	5
B ₁₅	0.45	0.4	0.0	0.43	0.0
BCC-1	1.22	1.46	1.3	1.32	1.25
*3	1.89	1.64	1.5	1.42	1.54
Testigo	3.5	3.4	3.3	3.5	3.5

ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente	g.l	SC	CM	Valor de F	P>F
Tratamiento	3	26.3281	8.7760	336.09**	0.0001
Error	16	0.4178	0.0261		
Total	19	26.7459			

** Altamente significativo a un 99.99% de probabilidad

Cuadro 11. Medias del Radio de Crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* en placas de agar nutritivo en confrontación antagónica con bacterias esporuladas a las 144 h..

Tratamiento	R E P E T I C I O N E S				
	1	2	3	4	5
B ₁₅	0.45	0.4	0.0	0.43	0.0
BCC-1	1.42	1.63	1.45	1.6	1.53
*3	1.97	1.71	1.51	1.49	1.54
Testigo	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5

ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente	g.l	SC	CM	Valor de F	P>F
Tratamiento	3	26.7764	8.9254	353.98**	0.0001
Error	16	0.4034	0.0252		
Total	19	27.1798			

** Altamente significativo a un 99.99% de probabilidad

Cuadro 12. Medias (peso en gramos) de las variables en los diferentes tratamientos del experimento de invernadero

Tratamiento	Medias (peso en gramos de las diferentes variables)		
	PT	Ptub	PF
*3	968.33 A	760.83 A	207.50 A
B ₁₅	938.33 A	778.33 A	160.00 A
BCC-1	794.00 AB	564.00 AB	230.00 A
Kodiak	720.83 AB	535.00 AB	185.83 A
Mezcla	698.33 AB	517.50 AB	180.83 A
PCNB	645.00 AB	494.16 AB	150.83 A
Testigo	490.00 B	275.833 B	214.16 A

Tratamientos con la misma letra no presentan diferencia significativa

ANALISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE PESO TOTAL (PT)

Fuente	g.l	SC	CM	Valor de F	P>F
Tratamiento	6	1001378.67	166896.44	1.56**	0.1883
Error	34	3631640.83	106812.96		
Total	40	4637019.51			

** Altamente significativo con un 81.17% de probabilidad

ANALISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE PESO TUBÉRCULO
(PTUB)

Fuente	g.l	SC	CM	Valor de F	P>F
Tratamiento	6	1053174.71	175229.11	2.81**	0.025
Error	34	2124253.33	62478.03		
Total	40	3177428.04			

** Altamente significativo con un 97.5% de probabilidad

ANALISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE PESO FOLLAJE (PF)

Fuente	g.l	SC	CM	Valor de F	P>F
Tratamiento	6	28504.77	4750.79	0.33**	0.9161
Error	34	488670.83	14372.67		
Total	40	517175.60			

** Altamente significativo con un 8.39% de probabilidad

