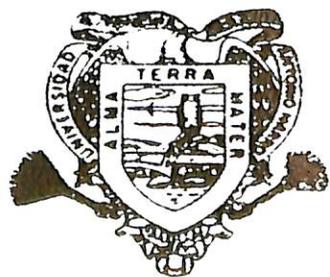


**EFFECTIVIDAD IN VITRO DE ACTINOMICETOS
AISLADOS DE LA RIZOSFERA DE LA PAPA
(*Solanum tuberosum* L.) DE LOS ESTADOS DE
COAHUILA Y NUEVO LEON SOBRE
Rhizoctonia solani KUHN**

EPIFANIO CASTILLO FABELA

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
EN PARASITOLOGIA AGRICOLA**



Universidad Autónoma Agraria

"Antonio Narro"

PROGRAMA DE GRADUADOS

Buenvista, Saltillo, Coah.

DICIEMBRE DE 2001

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

EFFECTIVIDAD *IN VITRO* DE ACTINOMICETOS AISLADOS DE LA
RIZÓSFERA DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.) DE LOS ESTADOS DE
COAHUILA Y NUEVO LEÓN, SOBRE *Rhizoctonia solani* KÜHN.

TESIS

POR

EPIFANIO CASTILLO FABELA

Elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada
como requisito parcial para optar al grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

COMITÉ PARTICULAR

Asesor principal:


Dr. Gabriel Sallegos Morales.

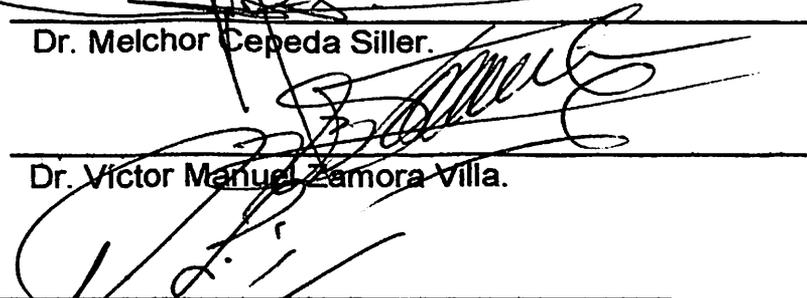
Asesor:

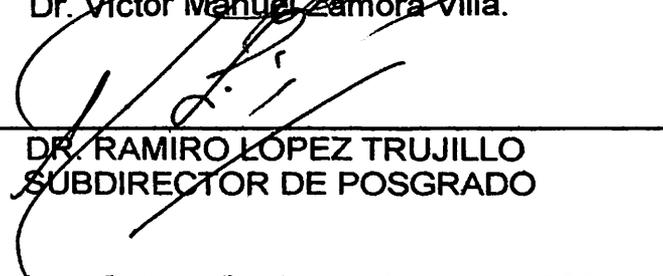

Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo.

Asesor:


Dr. Melchor Cepeda Siller.

Asesor:


Dr. Víctor Manuel Zamora Villa.


DR. RAMIRO LÓPEZ TRUJILLO
SUBDIRECTOR DE POSGRADO

Buenavista, Saltillo, Coahuila. Diciembre 2001.

AGRADECIMIENTOS.

A MI ALMA MATER. Por acogerme en su seno y permitirme culminar con mis estudios de Postgrado.

AL CONACYT. Por el apoyo económico brindado para realizar una maestría.

AL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA. Por contribuir en mi formación y por las enseñanzas adquiridas.

AL COMITÉ ASESOR. Por su apoyo en la conducción y revisión del presente trabajo.

A MIS AMIGOS, AMIGAS Y COMPAÑEROS DE LA MAESTRÍA. Por compartir alegrías y tristezas, triunfos y fracasos; por todos esos momentos compartidos que quedarán para siempre en mi vida y que difícilmente los podré olvidar.

DEDICATORIA.

CON TODO MI AMOR Y CARIÑO PARA MIS PADRES.

Por darme esta maravillosa familia y por enseñarme a luchar por los objetivos que nos planteamos en la vida.

Porque en todo momento me demostraron su apoyo, cariño y comprensión.

Gracias mamá.

Gracias papá.

A MIS HERMANOS.

Por sus sabios consejos, que me ayudaron a culminar una etapa más de mi vida.

Porque gracias a su apoyo, me permitieron salir adelante y lograr mi meta; terminar mi Maestría.

COMPENDIO

Efectividad *in vitro* de actinomicetos aislados de rizósfera de papa (*Solanum tuberosum* L.) de los estados de Coahuila y Nuevo León, sobre *Rhizoctonia solani* Kühn.

POR

EPIFANIO CASTILLO FABELA

MAESTRIA EN PARASITOLOGIA AGRICOLA

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. DICIEMBRE 2001

Dr. Gabriel Gallegos Morales - Asesor-

Palabras clave: Antagonismo, Antibiosis, Inhibición, Papa.

Esta investigación se realizó con la finalidad de recuperar actinomicetos de rizósfera con efecto antagónico hacia *Rhizoctonia solani* en suelos de la región papera de Coahuila y Nuevo León.

Se realizó un muestreo de suelo de la rizósfera de diferentes localidades de las regiones citadas, de cada una de las muestras obtenidas se colocaron 10 gr en un frasco de dilución con 90 ml de agua destilada con 631 µg de fenol; se realizaron diluciones seriadas de 10^{-2} a 10^{-4} y se sembró por difusión en medio agar caseína almidón suplementado con glicerol, las cajas Petri se incubaron a 30 ± 2 °C durante 5 días. Las colonias con

morfología típica polvosa típica de actinomicetos, olor a tierra mojada y mostraran halos de inhibición fueron purificados en medio Czapek Dox Agar, para posteriormente confrontarlos contra *R. solani*.

Se evaluaron 90 cepas de actinomicetos por el método de cultivos duales en medio de cultivo Czapek, colocando cuatro explantes de cada cepa en cuatro puntos equidistantes, posteriormente se colocó al centro de la caja Petri el explante de micelio de *R. solani*. Se evaluó el crecimiento diametral del hongo contra las cepas, con el crecimiento del testigo, donde sólo se colocó al centro de la placa el explante de *R. solani*. De las 90 cepas evaluadas, 24 fueron seleccionadas por mostrar un mayor efecto inhibitorio para una segunda evaluación. La cepa AC 77 fue mejor estadísticamente (Tukey $P=0.05$) con 87.05 por ciento de inhibición, seguida de la cepa AC12 con 73.90 por ciento; y las cepas AC68, AC70, AC66, AC81, AC71 y AC33 con porcentajes de inhibición que oscilaron de 72.45 a 68.80 por ciento, algunas cepas mostraron inhibición de hasta 35 por ciento.

Los actinomicetos de la rizósfera de papa pueden actuar como agentes de control biológico de *Rhizoctonia solani* Kühn.

ABSTRACT

Effectiveness in vitro of actinomycetes isolated of potato rizosphere (*Solanum tuberosum* L.) of the states of Coahuila and Nuevo León on *Rhizoctonia solani* Kühn.

BY

EPIFANIO CASTILLO FABELA

MASTER OF SCIENCE AGRICULTURAL PARASITHOLOGY
UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. DECEMBER 2001

Dr. Gabriel Gallegos Morales -Advisor -

Words key: Antagonism, Antibiosis, Inhibition, Potato.

This investigation was carried out with the purpose of recovering rizosphere actinomycetes with antagonistic effect toward *Rhizoctonia solani* in soils of the region goiter of Coahuila and Nuevo León.

A sampling was carried of soil of the rizosphere of different towns of the mentioned regions, of each one of the obtained samples 10 gr was placed in a dilution flask with 90 ml of water distilled with 631 µg of phenol; they were carried out serial dilutions from 10^{-2} to 10^{-4} and it was sowed by diffusion in agar casein starch medium supplemented with glycerol, the Petri plate was incubated at 30 ± 2 °C during 5 days. The colonies with morphology typical powdery of actinomycetes, scent to wet earth and they

showed inhibition halo they were purified in Czapek Dox Agar medium, to confront them against *R. solani*.

90 strains of actinomycetes were evaluated by the method of dual culture in Czapek medium, placing four transplant disc of each strain in four equidistant points, later transplant disc of mycelium of *R. solani* was placed at the center of the Petri plate. Growth diametrical of fungi against strains was evaluated, comparing the fungal diameter growth of control, where only the disc transplant of *R. solani* mycelium was placed to the center of the plate. From the 90 strains of actinomycetes, 24 were selected as they showed the best (Tukey = 0.05) with a 87.05 percentage of inhibition followed by the strain AC12 with 73.9 percentage and AC68, AC70, AC66, AC81, AC71 and AC33 with an inhibition percentage rate of 72.45 to 68.8. Other strains showed an inhibition percentaje up to 35.

The actinomycetes from the rizosphere of potatoes could act as agents of biological control of *Rhizoctonia solani* Kühn.

INDICE DE CONTENIDO

	Página
INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivos.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Costra negra de la papa <i>Rhizoctonia solani</i> Kühn.....	4
Importancia.....	4
Ubicación taxonómica.....	5
Características morfológicas.....	5
Grupos de anastomosis de <i>R. solani</i>	6
Condiciones favorables a la enfermedad.....	7
Infección.....	8
Sintomatología.....	8
Ciclo de la enfermedad.....	9
Manejo de <i>Rhizoctonia solani</i>	10
Control cultural.....	10
Control químico.....	12
Control biológico.....	13
Historia e importancia del control biológico.....	14
Características de la rizósfera.....	17
Agentes de control biológico.....	18
Mecanismos de control biológico.....	20
Competencia.....	20
Antibiosis.....	21
Explotación.....	22
Resistencia inducida.....	22
Características de los actinomicetos.....	23
Control biológico con actinomicetos.....	24
ARTICULO CIENTÍFICO	
EFFECTIVIDAD <i>IN VITRO</i> DE ACTINOMICETOS AISLADOS DE	
RIZÓSFERA DE PAPA SOBRE <i>Rhizoctonia solani</i> KÜHN.....	27
CONCLUSIONES GENERALES.....	42
LITERATURA CITADA.....	43

INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L) es la dicotiledónea más importante en la alimentación humana, constituye el cuarto alimento en el ámbito mundial, superada sólo por trigo, arroz y maíz. Sin embargo, el rendimiento de proteína por unidad de superficie, excede al trigo, arroz y maíz por factores de 2.02, 1.33 y 1.2 respectivamente. La papa se cultiva en cerca de 20 millones de hectáreas en 125 países. (CONPAPA, 1999). En nuestro país se siembran aproximadamente 52, 207 ha en 22 estados. El rendimiento promedio nacional oscila entre 20 y 21 ton/ha. contrastando con los rendimientos más altos del país obtenidos en Coahuila, de 30 ton/ha (INIFAP, 1999).

Entre los principales problemas que limitan la producción de papa están los fitosanitarios destacando entre estos las enfermedades, algunas de las enfermedades más importantes en el mundo causadas por hongos en este cultivo son: *Phytophthora infestans* (tizón tardío), *Alternaria solani* (tizón temprano), *Rhizoctonia solani* (costra negra), *Fusarium spp.* (marchitamiento vascular), las cuales son consideradas como nativas del suelo (Jeger *et al.*, 1996).

En nuestro país el cultivo de la papa es el que más fungicidas consume con una cantidad de 21.3 por ciento de la suma total de fungicidas aplicados en los cultivos, lo que representa una derrama

económica de 100 millones de pesos la cual se destina principalmente para el control de *P. infestans* y *R. solani* (Virgen, 2001).

En el cultivo de la papa, *R. solani* se presenta en todas las áreas productoras de este cultivo (Hooker, 1990). Los daños ocasionados por este hongo se asocian con la reducción del vigor de la planta, y frecuentemente producen tubérculos deformados, agrietados o con esclerocios sobre la superficie (Powelson *et al.*, 1993). Así mismo el ataque de este fitopatógeno puede producir lesiones en tallos en más del 90 por ciento de las plantas y reducir el rendimiento total (hasta en un 35.01 por ciento), rendimiento comerciable, peso promedio de los tubérculos y gravedad específica de los mismos (Carling *et al.*, 1989; Banville, 1989).

El control de *R. solani* en papa se realiza básicamente mediante la aplicación de compuestos químicos. Sin embargo, este tipo de combate puede causar serios problemas al ambiente, así como elevar el costo de producción. La búsqueda de nuevas estrategias de combate incluyen el uso de microorganismos como agentes de control biológico, lo cual se ha incrementado notablemente en los últimos 65 años (Weller, 1988). El gran interés en el uso de microorganismos de la rizósfera se debe a que ellos son capaces de solubilizar muchos nutrientes, minimizar la lixiviación de los mismos, controlar patógenos, etc. Así mismo, la inoculación de microorganismos en la rizósfera es cada vez más común y el desarrollo de la biotecnología, proyecta un futuro interesante en la inoculación de microorganismos (Atkinson y Watson, 2000). Por lo anterior en este trabajo se planteó como Objetivos:

- Recuperar actinomicetos de la rizósfera de papa de la región papera de Coahuila y Nuevo León.
- Evaluar el efecto *in vitro* de los actinomicetos sobre *R. solani* como una selección de posibles agentes de control microbiano.

REVISIÓN DE LITERATURA

Costra Negra de la Papa *Rhizoctonia solani* Kühn.

Importancia.

Rhizoctonia solani es un hongo que daña un amplio rango de hospederos que incluye a frutales, hortalizas, ornamentales, forestales, cultivos básicos y otros; ocasionando cuantiosas pérdidas (Valadez, 1993). En México la enfermedad ha ocasionado pérdidas de hasta un 30 por ciento en la producción de lechuga (Gutiérrez y Romero, 1980) y en el cultivo del frijol causa pérdidas superiores al 50 por ciento (Campos, 1987).

En el cultivo de la papa, *R. solani* ataca a tallos, raíces, estolones y tubérculos; teóricamente se puede decir que por cada estolón atacado (una planta produce varios estolones) se pierde un tubérculo que a la madurez puede llegar a pesar 100 a 150 gr y se considera una población de unas 45,000 plantas por hectárea, se perderían de 4,000 a 6,000 kg de papa (Talavera, 1981).

Ubicación taxonómica.

Walker (1975) y Tu y Kimbrough (1978), mencionan que existe cierta confusión en la taxonomía del género *Rhizoctonia* debido a que produce una amplia variedad de tipos de micelio, forma de esclerocios y estados perfectos. Además muchas especies producen estados basidiales intermedios en morfología entre Heterobasidiomycetos y

Homobasidiomycetos. También los Basidiomycetos ofrecen por lo general limitadas características de clasificación, especialmente a nivel de género, lo que ha originado frecuentemente cambios, como prueba de esta inestabilidad taxonómica, podemos mencionar el hecho de que el estado perfecto o basidial de *R. solani* ha sido incluido en los géneros siguientes: *Hipochnus filamentosus*, Patovillard, 1891; *Hipochnus solani*, Prillicux y Delacroix, 1891; *Corticium vagum*, Berk y Curt var *solani*, Burt, 1903; *Botryobasidium solani* (Prill y Del.) Donk, 1931; *Pellicularia filamentosa*, Rogers, 1943; *Ceratobasidium cucumeris* (Frank) Donk, 1956.

Abundantes estudios muestran que *Thanetophorus cucumeris* es el estado perfecto o sexual de *R. solani*.

Alexopoulos y Mims (1979) clasifican a *R. solani* Kühn de la siguiente manera:

Super reino.....Eukaryota
 ReinoMycetae
 División.....Amastigomycota.
 Subdivisión.....Deuteromycota.
 Clase.....Deuteromycetes
 Subclase.....Hiphomycetidae
 Orden.....Aganomycetales = Mycelia esterilia.
 Género.....*Rhizoctonia*
 Especie.....*solani*

Características morfológicas.

Hooker (1990) señala que las características más típicas de *R. solani* son sus ramificaciones en ángulo recto (90 grados), con ligeras

Homobasidiomycetos. También los Basidiomycetos ofrecen por lo general limitadas características de clasificación, especialmente a nivel de género, lo que ha originado frecuentemente cambios, como prueba de esta inestabilidad taxonómica, podemos mencionar el hecho de que el estado perfecto o basidial de *R. solani* ha sido incluido en los géneros siguientes: *Hipochnus filamentosus*, Patovillard, 1891; *Hipochnus solani*, Prillicux y Delacroix, 1891; *Corticium vagum*, Berk y Curt var *solani*, Burt, 1903; *Botryobasidium solani* (Prill y Del.) Donk, 1931; *Pellicularia filamentosa*, Rogers, 1943; *Ceratobasidium cucumeris* (Frank) Donk, 1956.

Abundantes estudios muestran que *Thanetophorus cucumeris* es el estado perfecto o sexual de *R. solani*.

Alexopoulos y Mims (1979) clasifican a *R. solani* Kühn de la siguiente manera:

Super reino.....Eukaryota
 ReinoMycetae
 División.....Amastigomycota.
 Subdivisión.....Deuteromycota.
 Clase.....Deuteromycetes
 Subclase.....Hiphomycetidae
 Orden.....Aganomycetales = Mycelia esterilia.
 Género.....*Rhizoctonia*
 Especie.....*solani*

Características morfológicas.

Hooker (1990) señala que las características más típicas de *R. solani* son sus ramificaciones en ángulo recto (90 grados), con ligeras

constricciones en el punto de origen de la ramificación, formación de un septo en la rama cercana a su origen. El micelio es casi siempre de color café o castaño oscuro. Las hifas son algo gruesas, y cuando jóvenes tienen sus células multinucleadas y se ramifican cerca de la septa distal de la célula.

Agrios (1985) señala que *R. solani* rara vez produce un estado perfecto del basidiomiceto conocido como *Thanetophorus cucumeris*. Esta etapa perfecta se forma cuando hay suficiente humedad, tiene el aspecto de un mildiu fino que se desarrolla sobre el suelo u hojas y tallos infectados que se encuentran inmediatamente por arriba de la superficie del suelo.

Cepeda y Hernández (1987) describen este estado, mencionando que las fructificaciones son blancuzcas y se forman sobre un himenio discontinuo de basidios oblongos o en forma de barril, en racimos terminales o erectos. Los basidios frecuentemente están conectados y cada basidio produce cuatro esterigmas erectos levemente divergentes. En cada esterigma se produce una basidiospora hialina, de pared delgada, lisa, elipsoide con un lado aplanado o ampliamente ovalado y ápice truncado, citan a la vez que las basidiosporas germinan por repetición.

Grupos de anastomosis de *R. solani*.

Rhizoctonia solani está dividido en grupos basados en la anastomosis hifal. Esta es una manifestación somática mostrando incompatibilidad entre aislamientos. La hifa de un aislamiento representando el mismo grupo de anastomosis (AG por sus siglas en inglés) puede anastomosarse con alguna otra del mismo grupo, pero no con hifas de grupos diferentes; actualmente hay 12 grupos de anastomosis conocidos (Carling y Leiner, 1990).

Adams y Butler (1979) mencionan que la primera subdivisión natural de *R. solani* fue hecha en 1936 por Schultz, quien dividió las especies según la anastomosis hifal. Parmeter *et al.*, (1969) reconocieron cuatro grupos de anastomosis: AG-1, AG-2, AG-3 y AG-4. Los aislamientos del AG-3 son identificados como la principal causa de la enfermedad ocasionada por *Rhizoctonia solani* en papa, aunque en recientes investigaciones ha llamado la atención la patogenicidad de aislamientos de AG-4 y AG-5. Además, AG-2-1, AG-2-2, y AG-9 han sido asociados con plantas enfermas de papa (Carling y Leiner, 1990). Los grupos de anastomosis restantes incluyendo AG-8, no han sido reportados en asociación con papa (Carling y Leiner, 1986).

Condiciones favorables a la enfermedad.

Brenchley y Wilcox (1979) mencionan que la luz, la temperatura y la humedad del suelo tiene un efecto considerable sobre la actividad parasítica de *R. solani*, pero en la práctica probablemente actúan conjuntamente. Los mismos autores citan que antes de la plantación, los brotes expuestos a la luz son menos atacados que aquellos mantenidos en la oscuridad, pero después de la plantación, los brotes que han emergido bajo condiciones de luz parecen ser más resistentes al ataque que aquellos que emergen antes.

Carling y Leiner (1990) señalan que *R. solani* comúnmente se presenta donde prevalecen condiciones ambientales frescas y húmedas, es menos común o puede no ocurrir donde las condiciones ambientales son normalmente cálidas y secas. En investigaciones realizadas por los mismos autores para determinar el efecto de la temperatura sobre la virulencia de *R. solani* en papa determinaron que a temperaturas frescas (10°C) los

aislamientos de AG-3 son más virulentos. A temperaturas más cálidas (21.1°C) los aislamientos de AG-5, y AG-8 pueden ser más importantes en la etiología de la enfermedad. No se tienen reportes previos de que AG-8 este en asociación con papa, pero se cree que este patógeno es potencialmente muy dañino.

Infección.

Campos (1987) menciona que el patógeno penetra a través de la cutícula y epidermis en forma mecánica, inicialmente produce un cojinete de infección a partir del cual emite clavijas de infección o mediante hifas individuales; además, puede penetrar por aberturas naturales o por heridas.

Sintomatología.

Hooker (1990) menciona que en la superficie de los tubérculos maduros se forman esclerocios de color negro o castaño oscuro. Los esclerocios pueden ser chatos y superficiales, grandes e irregulares en forma de terrones, de ahí el nombre común de “costra negra”. Generalmente la epidermis del tubérculo por debajo de los esclerocios no presenta ninguna anomalía. Otros síntomas en los tubérculos incluyen agrietaduras, malformaciones, concavidades y necrosis en el extremo de unión con el estolón.

Mendoza y Pinto (1983) señalan que en condiciones favorables a *R. solani* ataca plántulas antes de que hayan emergido o poco después de la emergencia del suelo; las lesiones son hundidas, de tamaño variable, con coloraciones de café canela a café rojizo. Si las condiciones son favorables, las lesiones se extienden y adquieren un aspecto hundido y pueden llegar a

cubrir todo el tallo y destruir las raíces debilitando a la planta o causando un acentuado amarillamiento.

Los daños más severos a la planta se producen en primavera poco después de la siembra; el hongo mata los brotes subterráneos retardando o anulando su emergencia, especialmente en suelos fríos y húmedos, lo que da como resultado campos con plantas desiguales en el crecimiento, plantas débiles y reducción en el rendimiento. Los brotes que llegan a emerger también se infectan, formándose cánceres en los tallos en desarrollo, los que a menudo llegan a estrangularlos ocasionando su colapso. El estrangulamiento parcial de los tallos puede suscitar diversidad de síntomas como retardo en el desarrollo de la planta, arrosetamiento del ápice, necrosis cortical del tejido leñoso, pigmentación púrpura de las hojas, aparición de tubérculos aéreos y a menudo clorosis y amarillamiento (Hooker, 1990; Walker, 1975).

Las lesiones que se forman en los estolones son de color castaño rojizo y provocan la muerte de los mismos. En suelos húmedos y ricos en humus *R. solani* produce en la base del tallo de la papa y de algunas malezas un fieltro micelial de color blanco sucio, sobre las que se originan las basidiosporas y le dan a la superficie una apariencia polvorienta, considerándose a esta como la fase perfecta del hongo (Romero, 1988).

Ciclo de la enfermedad.

León (1988) señala que *R. solani* sobrevive en el suelo y en tubérculos en forma de esclerocios o como micelio en residuos de cosecha. La siembra de tubérculos infestados con esclerocios favorece el desarrollo de la enfermedad, siendo el inóculo del tubérculo más importante en los

estados tempranos del desarrollo de la enfermedad (Frank, y Leach, 1980), dado que los esclerocios del tubérculo, son más virulentos que los presentes en el suelo (Hill y Anderson, 1989), Bajo condiciones favorables para el hongo se considera que tan sólo el 5 por ciento de esclerocios sobre la superficie del tubérculo puede causar serios daños en la brotación de la papa (Powelson *et al.*,1993). En estudios realizados en León, Gto. se encontró que el inoculo de semilla puede reducir el rendimiento hasta en un 25 por ciento (Virgen, 2001).

Hooker (1990) menciona que en la primavera cuando las condiciones son generalmente favorables, los esclerocios germinan e invaden los tallos de papa o los brotes emergentes, especialmente a través de heridas. Durante la etapa de crecimiento de las plantas, tanto las raíces como los estolones son invadidos a medida que se van desarrollando. La formación de esclerocios sobre los tubérculos nuevos se realiza en cualquier momento, dependiendo de las condiciones ambientales, sin embargo, el desarrollo máximo ocurre después de que ha matado la planta, cuando los tubérculos permanecen aún enterrados.

Mendoza y Pinto (1983) señalan que los esclerocios se producen al inicio de las lluvias y que estos germinan entre los 8 y 30 °C, con óptimo de 21 a 25 °C.

Manejo de la Costra Negra de la Papa.

Control cultural.

Paredes (1989) recomienda que para evitar la presencia del hongo en un terreno es conveniente realizar rotación de cultivos durante dos o cuatro

años consecutivos, usar semilla sana y no utilizar como abono el estiércol proveniente de animales que se hayan alimentado con papa o plantas enfermas.

Por su parte López (1989) determinó el efecto de extractos de crucíferas (col, coliflor y brócoli) *in vitro* y residuos de las mismas a nivel de invernadero, sobre el desarrollo de *R. solani*. En el laboratorio utilizó concentraciones de extractos (0, 500, 1000, 1500 y 2000 ppm), mientras que en invernadero utilizó diferentes partes de plantas (hoja, tallo y raíz); y encontró que las dosis de 1000 y 1500 ppm afectaron más el desarrollo del hongo, el extracto del tallo inhibió más el desarrollo micelial de *R. solani*, seguido de la hoja, planta completa y raíz. En invernadero concluye que los extractos y residuos de coliflor fueron más eficientes, sobre el desarrollo de *R. solani*, posteriormente los de col y por último los de brócoli.

Robert y Boothroyd (1978) sugieren la plantación poco profunda de los tubérculos; además menciona que si a los tubérculos de siembra se les permite que broten a la luz, en una semana se forman brotes verdes y vigorosos, que resisten la penetración de *R. solani*.

Por su parte Agrios (1985) recomienda sembrar tubérculos libres de la enfermedad, evitar sembrar en tierras húmedas y poco drenadas, debe haber espacios amplios entre plantas para que se permita una buena aireación de la superficie del suelo y de las plantas.

Martinson y Rehiyani (1991) determinaron que el uso de estiércol animal (pollo y cerdo) agregado a suelo infestado con esclerocios de *R. solani* puede reducir el potencial de la enfermedad. Ambos autores determinaron que el potencial de la enfermedad es mucho menor en suelos

abonados con estiércol que en suelos no abonados, por lo que ellos consideran el estiércol como un recurso para una estrategia de control de este patógeno.

Brennan (1991) determinó que la incidencia y severidad de *R. solani* declinó de 45.9 y 27 por ciento a 32.7 y 9.1 por ciento respectivamente con la aplicación de fertilizante nitrogenado (nitrato de amonio) y fertilizantes a base de cobre.

Control químico.

Escamilla (1996) evaluó los funguicidas Pencycuron a dosis de 1, 2, y 2.5 kg/ton, Tolcofos-metil a 5.0, 6.5 y 8 kg/ha y PCNB a 12, 16 y 20 litros/ha; determinó que el Pencycuron a las diferentes dosis controla mejor la severidad de la enfermedad, así mismo menciona que los productos químicos Pencycuron (2 kg/ton) y Tolcofos-metil (5 kg/ha) presentaron mayor número de tubérculos. Resultados similares encontró Davies *et al.*, 1996 comparando los funguicidas Azoxystrobin 500 g i.a./kg, Fludioxonil 100 g i.a./litro y Pencycuron 250 gr i.a./litro; encontrando que Fludioxonil fue el que presentó menor incidencia y severidad de *R. solani*, seguido de Pencycuron y por último Azoxystrobin a la dosis de 224 g/ha.

Phillips (1992) menciona que el funguicida Tolclofos-metil se ha usado en combinación con otros funguicidas para la desinfección de suelo, tratamiento de semillas y aplicaciones foliares; además también cita que la mezcla de Tolclofos-metil con iprodione mostró un control adecuado de *R. solani* y *Botrytis* en lechuga.

Por otra parte Ugalde (1993), considera que los mejores funguicidas para el control de *R. solani* son el Pencycuron (2.5 kg i.a/ha), PCNB (18.8 kg

i.a./ha) y la Anilazina (3.8 kg i.a./ha). El Pencycuron controló mejor la incidencia y severidad de la enfermedad en el tubérculo. Además determinó que ningún fungicida presentó algún efecto en el rendimiento del cultivo.

Ponce (1994), en evaluaciones de Fluazinam para el control de la costra negra de la papa en Tlaxcala, observó que la dosis más baja de Fluazinam (1.5 kg/ha) en combinación con tratamiento a la semilla, dio mejor resultado de control con un 90.2 por ciento, así mismo la combinación de la aplicación al fondo del surco con la dirigida al cuello de la planta, obtuvo 84 por ciento de eficacia, aunque recomienda hacer el tratamiento a la semilla y al fondo del surco.

Virgen (1995), en pruebas de sensibilidad *in vitro* de cinco grupos de anastomosis de *R. solani* aislados de papa a tres fungicidas; Fluazinam 3.25 g i.a./litro, Tolclofos-metil 10 g i.a./litro, Pencycuron 4.5 y 5.82 g i.a./litro. Los resultados indican que a las 48 horas todos los tratamientos son eficientes en el control de AG-2 y AG-3, no así para el AG-4, AG-5 y AG-ND, en donde el mejor tratamiento fue Tolclofos-metil. A los 45 días después de la siembra los mejores tratamientos para inhibir el desarrollo del AG-2 y AG-3, fueron Pencycuron en ambas concentraciones. Así mismo Fluazinam mostró el mejor efecto sobre el AG-5 y AG-ND.

Control biológico.

Sidhu y Young (1991) en experimentos realizados con *Laetisaria arvalis* (Basidiomyceto habitante del suelo) observaron que se tiene control efectivo de *R. solani* en invernadero y bajo condiciones de campo. La incorporación al suelo de *L. arvalis* cultivado en granos de avena estériles, redujo las lesiones del tallo en 68 por ciento en experimentos de

invernadero. En campo semillas infectadas con esclerocios de *R. solani* fueron cubiertas con esclerocios de *L. arvalis* antes de sembrar; se observó que las plantas obtenidas fueron 15 por ciento más numerosas en comparación con semillas sin tratamiento; también el rendimiento fue significativamente incrementado. La severidad de la enfermedad fue reducida cuando la semilla fue tratada y cuando se incorporó al suelo granos de avena y salvado de trigo con *L. arvalis*; también, la formación de esclerocios sobre los tubérculos hijos fue significativamente reducida.

Liu y Baker (1980) determinaron que existe antagonismo de *Trichoderma harzianum* contra *R. solani*. En laboratorio observaron que las ramificaciones de *Trichoderma* son capaces de atacar y enrollarse alrededor de las hifas de *R. solani*. Posteriormente observaron lisis y separación de las hifas de *R. solani* atacadas. No se observó penetración de las hifas de *Trichoderma* sobre *R. solani*. Además generaron la supresión de *R. solani* del suelo a partir de monocultivos sucesivos con rábano en intervalos semanales en suelos infectados con el patógeno. Sucesivas plantaciones de pepino también generaron supresión la cual fue asociada con poblaciones de *Trichoderma sp.*

Historia e Importancia del Control Biológico.

El estudio del control biológico de los patógenos del suelo se remonta a inicios del siglo XX. Potter en 1908 hizo una demostración de que la actividad de un patógeno puede inhibirse por acumulación de sus propios productos metabólicos. Sanford en 1926 sugirió que el control de la roña de

la papa *Streptomyces scabies* por la adición de abonos verdes fue debido a un incremento de bacterias saprofiticas que se multiplican sobre el material orgánico (Virgen, 1990). El mismo investigador reporta el control de la roña en papa desarrollada en suelo estéril e inoculados con *S. scabies* a través de inoculaciones simultaneas del suelo con *S. preacox*, una especie saprofitica vigorosa. A partir de entonces el número de escritos sobre control biológico se ha incrementado, especialmente después de 1965 (Baker, 1987).

Se considera que en el futuro el control biológico puede tener un papel importante en la agricultura, por el hecho de que varias empresas tienen programas para desarrollar agentes de control con esta clase de organismos como productos comerciales, esto es una respuesta al peligro del uso de pesticidas químicos; los microorganismos que pueden crecer en la rizósfera son ideales para usarlos como agentes de control biológico, puesto que la rizósfera provee la línea frontal de defensa para las raíces al ataque de los patógenos (Weller, 1988).

El control biológico en Fitopatología ha sido enfocado principalmente al control biológico de fitopatógenos de suelo (rizósfera), de ahí que la mayoría de los productos biológicos comerciales desarrollados para el control de fitopatógenos, lo sean para patógenos radicales . Lo anterior se ha intentado principalmente tomando ventaja de los antagonistas residentes o nativos partiendo del hecho de que en la naturaleza existen infinidad de enemigos naturales de los patógenos, y mediante la introducción de antagonistas (Andrews, 1992).

Otro aspecto que permite vislumbrar un futuro bastante prometedor para el control biológico de fitopatógenos es la manipulación genética de los antagonistas, que va desde la simple selección de variantes más eficaces de ocurrencia natural, hasta la identificación y manipulación de genes, pasando por mutaciones inducidas y fusión de protoplastos (Hosanna y Mischke, 1990). La manipulación genética constituye una herramienta importante para mejorar la eficacia y otras características de los antagonistas de patógenos, por ejemplo, tolerancia a plaguicidas comúnmente usados, habilidad para competir en la rizósfera, tolerancia a condiciones ambientales extremas, crecimiento vigoroso y esporulación abundante en la producción comercial, y larga vida de anaquel (Stasz, 1990).

Tanaka y Omura (1993), mencionan que en el desarrollo de un programa de control biológico, lo primero que se debe tomar en cuenta es el conocimiento del organismo que se desea controlar, el modo de acción de los organismos descubiertos, la necesidad que se tiene de controlar el problema, tamaño de mercado y el desarrollo de métodos apropiados para evaluar los organismos antagonistas.

Los microorganismos juegan un papel importante tanto en la mejora del estatus nutricional como de la fitoprotección, sin embargo el uso de microorganismos representa solamente el 1.4% (380 millones de dólares del mercado global para el control de plagas) de los 28 billones de dólares (Gaugler, 1997), indicando que existe una amplia brecha entre el uso de químicos y los microorganismos. Algunos ejemplos exitosos del uso de microorganismos en la agricultura en donde se han obtenido incrementos rentables en trigo en Inglaterra (Webster, *et al.*, 1999), mientras que en

condiciones de invernadero también se han utilizado con beneficios prometedores (VanLenteren, 2000).

Características de la Rizósfera.

Considerando que los microorganismos se encuentran en el suelo se pueden dividir en los siguientes grupos: 1) Aquellos que pasan la mayor parte de su vida en el suelo, 2) Aquellos que primeramente atacan animales o plantas, pero pueden continuar su desarrollo en el suelo al menos por un tiempo y 3) Aquellos que están en el suelo por accidente, usualmente en forma de propágulos y pueden permanecer latentes por largo tiempo (Burgess, 1965).

En el suelo se han encontrado gran cantidad de hongos; alrededor de 200 Oomycetos, 32 Ascomycetos y 385 Hongos imperfectos, haciendo un total de más de 600 especies (Alexander, 1980). Se consideran alrededor de 1600 especies de bacterias, de las cuales se han encontrado 250 en el suelo, distribuidas en 50 géneros.

Estudios anteriores a 1979 sobre la rizósfera la consideraban como una entidad estática, es decir no se consideraban los procesos dinámicos tales como sucesiones ecológicas, interacciones entre organismos, etc., sino más bien aspectos cuantitativos (Atkinson y Watson, 2000). De hecho un gran número de microorganismos se pueden encontrar frecuentemente en la rizósfera tales como: bacterias, hongos, actinomicetos, protozoarios y algas (Glick, 1995).

En el amplio sentido, los microorganismos benéficos de la rizósfera incluyen los simbióticos y saprofitos de vida libre, aquellos que incrementan la disponibilidad de los nutrientes o de sustancias para el desarrollo de las plantas y los que suprimen el desarrollo de patógenos (Tinker, 1984 y Elad *et al.*, 1987).

En muchos casos en las plantas sanas, se ha determinado que están rodeadas de millones de células de muchos tipos de bacterias y hongos, estos son capaces de vivir en raíces, alrededor de ella, en hojas y aún dentro de las plantas, la presencia de estos se ha asociado con un mejor desarrollo de las plantas (Sobero *et al.*, 2000).

Por otra parte Savamani y Gnanamanickman (1988) encontraron que la bacteria *Pseudomonas fluorescens* aparte de suprimir el marchitamiento del plátano causado por *Fusarium oxysporum f sp. cubense*, también promovió el desarrollo de raíces y de la planta, determinando que la promoción del desarrollo se debe a la colonización agresiva y desplazamiento de componentes dañinos de la microflora de las raíces, como la habían determinado (Schroth y Hancock, 1982).

Agentes de Control Biológico.

Los agentes factibles para usarse en control biológico de patógenos en la rizósfera lo constituyen principalmente las rizobacterias y las micorrizas. Entre las rizobacterias que se han probado por sus efectos de control biológico se encuentran: *Actinoplanes*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Amorphosporangium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Cellulomonas*,

Enterobacter, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micromonospora*, *Pseudomonas*, *Pasteuria*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Serratia*, *Streptomyces* y *Xanthomonas* (Weller, 1988).

Mew y Rosales (1986) reportaron que bacterias fluorescentes y no fluorescentes inhiben el desarrollo micelial de *R. solani*, afectaron la viabilidad del esclerocio y promueven ligeramente la germinación de semillas de arroz. También se encontró que una raza designada como M51 de la bacteria *Bacillus subtilis* es particularmente activa hacia *F. oxysporum f sp. dianthi in vitro* e *in vivo* y fue inhibidora hacia otras tres especies de *Fusarium*; *F. oxysporum* se previno por un periodo de dos meses después del tratamiento de las plantas con *B. subtilis* M-51, y se sugirió que la protección de las plantas depende de la presencia física de la bacteria sobre las células de las raíces (Filippi *et al.*, 1984 y Filippi *et al.*, 1987).

Dentro de los hongos más estudiados por su efecto de control biológico se encuentran *Penicillium*, *Trichoderma* y *Aspergillus*. (Virgen, 1990) encontró una asociación entre la alta incidencia de *Trichoderma viridae* en el rizoplano y la resistencia al marchitamiento del tomate causada por *Verticillium*, sugiriendo que la resistencia está ligada con la predominancia de este hongo en el rizoplano. Se han encontrado hongos micorrícicos que protegen infecciones por patógenos de la rizósfera. Entre los principales hongos micorrícicos se encuentran: *Boletus bovinus*, *B. subtumentosus*, *Lactarius deliciosus* (micorrizas ectotróficas), *Psilotum*, *Pysolitus* (micorrizas endotróficas) de gran interés son las micorrizas vesiculo-arbusculares que están ampliamente distribuidas en el reino

vegetal, y existe gran interés en ellas por su posible significado biológico (Harley, 1965).

Las bacterias promotoras del crecimiento han sido utilizadas como agentes de control biológico, además de incrementar el rendimiento. (Kleopfer, 1999), sumergió tubérculos de papa en una suspensión de cepas bacterianas individuales y luego las sembró en macetas con suelo de campo, las bacterias promotoras del crecimiento estimularon el desarrollo temprano de los estolones y la producción entre el 5 y 25 por ciento con un promedio de aumento entre 10 a 12 por ciento, además las bacterias se encontraron también en la superficie de los tubérculos al final de la cosecha, aunque murieron rápidamente después de la cosecha debido a la intolerancia a la luz.

Mecanismos de Control Biológico.

En 1960 se suscribió el uso del término antagonismo para todas aquellas interacciones en la cual al menos una de las especies interactuantes es dañada. Los mecanismos de supresión del patógeno por un agente de control biológico son; competencia por sustrato, exclusión, antibiosis y explotación (que incluye parasitismo y predación), sideroforos y resistencia inducida (Baker, 1987).

Competencia.

En la competencia por nutrientes proporcionados por los exudados de raíces y semillas probablemente ocurren muchas interacciones entre microorganismos patógenos y no patógenos (Weller, 1988); en concreto,

competencia es cualquier interacción entre dos o más poblaciones de especies de las cuales afectan su desarrollo y sobrevivencia. Los microorganismos benéficos especialmente actinomicetos se incrementan principalmente con el uso de aditamentos orgánicos y compiten por la raíz (Sun y Huang, 1985).

Antibiosis.

Se considera como antagonismo mediado por metabolitos específicos y no específicos de origen microbiano, por agentes líticos, enzimas, compuestos volátiles u otras sustancias tóxicas (Fravel, 1988); puede considerarse como la relación en la cual una especie A produce una sustancia enemiga a la especie B, sin que la especie A derive cualquier beneficio directo. La palabra antagonismo fue introducida a la microbiología por primera vez en 1874 por Roberts al demostrar una acción antagónica entre *Penicillium graucum* y una bacteria (Baker, 1987).

En un trabajo realizado por Tschen y Kuo (1985) para determinar el efecto antagónico *in vitro* de *Bacillus subtilis* sobre *Rhizoctonia solani*, observaron claramente las zonas de inhibición además de observar en los puntos de las hifas un crecimiento anormal cuatro días después de la exposición al antibiótico producido por *B. subtilis*. Además determinaron que la bacteria produce sustancias antibióticas que pertenecen a un complejo formado por bacilycin y fergymycin.

Weller (1988) reporta que la raza A13 de *Bacillus subtilis* es inhibidora de varios patógenos de plantas tanto *in vitro* como en campo. El tratamiento a semilla con esta bacteria como es el caso de zanahoria, aumentó su rendimiento en un 48 por ciento, en trigo en un 33 por ciento y en cacahuate

arriba de un 37 por ciento, siendo desde 1983 *B. subtilis* A13 un tratamiento comercial para cacahuete.

Un aislamiento de *B. subtilis* inhibió *in vitro* al agente causal de la muerte de la vid *Eutypa lata*. En PDA, *B. subtilis* causó el 91 por ciento de inhibición del crecimiento micelial y un 100 por ciento de inhibición en la germinación de ascosporas (Ferreira *et al.*, 1991).

López y Virgen (1994) reportaron el antagonismo de la bacteria *B. subtilis* a *Fusarium oxysporum*, *Alternaria sp* y *Botrytis sp*, y observaron un desarrollo anormal de hifas y conidias.

Explotación.

Ocurre en nemátodos, como lo menciona Stirling y Wachtel (1980) en donde una preparación de *B. penetrans* incorporada al suelo a una cantidad de 100 mg/kg, en 24 h el 99 por ciento de juveniles de *Meloidogyne* fueron parasitadas. También se han encontrado parásitos de hongos como *Coniothyrium minitans*, un micoparásito especializado que se ha usado sucesivamente en pruebas de campo contra *Sclerotinia spp.*, *Trichoderma spp.* y *S. rolsfii*; *B. subtilis* se ha usado contra *Sclerotium cepivorum* (Baker, 1987).

Resistencia inducida.

Esta se basa en la utilización de razas avirulentas o incompatibles para inducción de resistencia al momento que haya infección por un patógeno. De esta forma se encontró que el grupo de bacterias Pseudomonales fluorescentes y aislamientos no patogénicos de *F. oxysporum* indujeron supresividad al marchitamiento de pepino causado por

Fusarium; esto cuando se adicionaron al suelo conjuntamente, a pH de 6.7 y fueron inefectivos cuando se aplicaron separadamente (Park *et al.*, 1988).

Características de los Actinomicetos.

Los Actinomicetos son microorganismos que producen filamentos delgados y ramificados que se desarrollan en un micelio en todos los géneros del suelo excepto en el género *Actinomyces*. Las hifas o filamentos individuales se asemejan morfológicamente a los filamentos fúngicos pero son mucho más delgados (Alexander, 1980).

Los actinomicetos están ampliamente distribuidos y como regla general son saprofitos, aunque algunas especies pueden provocar enfermedades a plantas, animales domésticos e incluso al hombre. Los actinomicetos crecen mucho más lentamente que la mayoría de los hongos y de las bacterias. Estos llegan a predominar cuando los nutrientes comienzan a ser limitados. El reconocimiento de las colonias es relativamente sencilla, siempre y cuando el período de incubación sea lo suficientemente largo. Las colonias bacterianas comunes consisten en una gran población de individuos derivados de una sólo célula por fisión binaria mientras que las de los actinomicetos antes de la esporulación constan de un organismo, una estructura filamentosa derivada de una sola unidad de propagación. Algunas colonias en medios de cultivo pueden tener una consistencia firme y se adhieren fuertemente al sustrato pareciendo la superficie en algunos casos pulverulenta en los organismos que tienen un micelio sencillo, la colonia

tiene una consistencia más harinosa y frecuentemente se desintegran al ser tocados (Alexander 1980).

A pesar de estar colocados junto con las bacterias, la relación de los actinomicetos con los hongos se manifiesta en tres propiedades: a) el filamento de los actinomicetos superiores tiene las extensas ramificaciones características de los hongos; b) muchos de los actinomicetos forman un "micelio" aéreo y c) el crecimiento de los actinomicetos en cultivo líquido raramente produce la turbidez asociada con las bacterias unicelulares, sino que produce la formación de filamentos, grumos o esferas; sin embargo otros detalles para su ubicación taxonómica con las bacterias es que no poseen núcleo, y en algunos géneros la presencia de los flagelos semejantes a las bacterias verdaderas, similitudes en la composición de la pared celular y la sensibilidad a inhibidores antibacterianos y no a inhibidores antifúngicos (Alexander, 1980).

Control Biológico con Actinomicetos.

Dentro de los actinomicetos se considera que la familia Streptomycetae es la forma más común en el suelo (Burges, 1965). De los actinomicetos el orden actinomicetales despiertan gran interés, ya que tres cuartas partes de los actinomicetos producen agentes antimicrobianos conocidos como antibióticos, (Alexander, 1980). *Streptomyces griseus* inhibe a *Fusarium* (Virgen, 1990).

Tarabily *et al.*, 1997 evaluaron 45 actinomycetes aislados de la rizósfera de la zanahoria por su antagonismo *in vitro* e *in vivo* a *Pythium*

coloratum, agente causal de la mancha hueca de la zanahoria. De estos, siete redujeron o previnieron la formación de lesiones, dichas cepas fueron identificadas como *Streptomyces janthinus*, *S. cinerochromogenes*, *Streptoverticillium netropsis*, *Actinomadura rubra*, *Actinoplanes philippinensis*, *Micromonospora carbonacea* y *Streptosporangium albidum*. Todas las especies de actinomicetos excepto *A. rubra* y *M. carbonacea* incrementaron significativamente ($P=0.05$) el peso fresco de la raíz comparado con el testigo. En este sentido Abyad *et al.*, (1996) evaluaron 37 cepas de actinomicetos aislados de suelos cultivados contra patógenos de tomate. En medio agar nitrato almidón, 14 cepas fueron activas contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *licopersici*, 18 contra *Verticillium albo-atrum* y 18 contra *Alternaria solani*. En Medio líquido, 14 aislados fueron antagónicos a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Las cepas más activas contra los patógenos evaluados fueron *Streptomyces pulcher*, *S. canescens*, y *S. citreofluorescens*.

Cuando *Pythium ultimum* o *R. solani* fueron sembrados en medio líquido con *Streptomyces lydicus* WYEC108, se observó una inhibición del crecimiento micelial. Cuando se usaron esporas de *S. lydicus* para cubrir la semilla de chicharo, las semillas fueron protegidas de la invasión de *P. ultimum* en un suelo enriquecido con osporas. Casi el 100 por ciento de la semilla que no fue cubierta, fue infectada por *P. ultimum* dentro de las 48 h posteriores a la siembra, menos del 40 por ciento de las semillas cubiertas fueron infectadas, cuando las semillas cubiertas fueron plantadas en suelo 24 h antes de la inoculación del patógeno, 96 h después, menos del 30 por

ciento de las semillas germinadas fueron infectadas (Yuan y Crawford, 1995).

Romeiro *et al.*, (1997), aislaron 190 cepas de actinomicetos de la rizósfera y rizoplano de diversas especies de plantas, las que evaluaron contra *Ralstonia solanacearum*, 22 cepas previnieron el ataque de la enfermedad cuando las semillas se cubrieron con los actinomicetos y se colocaron en suelos infestados naturalmente con *R. solanacearum*; en condiciones de campo algunos de estos actinomicetos mostraron un control de la enfermedad mayor al 80 por ciento. Así mismo demostraron por el desarrollo de semillas inoculadas con actinomicetos en suelo libre del patógeno la actividad promotora del crecimiento de algunas aislados, el cual se manifestó en el peso seco y fresco, tiempo para la germinación de las semillas, tamaño y número de hojas por planta. En este sentido Kulik, (1998) evaluó *in vitro* 115 cepas de actinomicetos aislados de la rizósfera de plántulas de alfalfa con historial de ataque de *Rhizoctonia solani*, observó que 48 cepas inhibieron el desarrollo del hongo.

**Efectividad *In Vitro* de Actinomicetos Aislados de Rizósfera de Papa
sobre *Rhizoctonia solani* Kühn**

Epifanio Castillo-Fabela, Gabriel Gallegos-Morales, Francisco Daniel Hernández-Castillo, Melchor Cepeda-Siller y Víctor Manuel Zamora-Villa, Depto. de Parasitología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila México CP 25315. Correspondencia: ggalmor@narro.uaaan.mx

Resumen. Se realizó una evaluación *in vitro* de 90 cepas de actinomicetos aisladas de rizósfera de papa, de la región de Coahuila y Nuevo León, México. Se utilizó el método de cultivos duales en medio Czapek Dox Agar, sembrando cuatro explantes de cada cepa en cuatro puntos equidistantes, posteriormente se colocó al centro de la caja Petri el explante de micelio de *Rhizoctonia solani*. Se evaluó el crecimiento a partir del tercer día, se calculó el porcentaje de inhibición comparando el crecimiento diametral del hongo contra las cepas, con el crecimiento del testigo, donde sólo se colocó el explante de micelio de *R. solani* al centro de la placa. De 90 cepas de actinomicetos, 24 fueron seleccionadas por mostrar un mayor efecto inhibitorio para una segunda evaluación. La cepa AC77 fue mejor estadísticamente (Tukey = 0.05) con 87.05% de inhibición, seguida de la cepa AC12 con 73.90% y las cepas AC68, AC70, AC66, AC81, AC71 y AC33 con porcentajes de inhibición que oscilaron de 72.45 a 68.80%. Algunas cepas mostraron inhibición de hasta 35%. Los actinomicetos de rizósfera de papa pueden ser una fuente para el control biológico de *R. solani*.

Palabras clave adicionales: Antagonismo, Antibiosis, Inhibición, *Streptomyces*.

Abstract. An *in vitro* evaluation of 90 strains of actinomycetes isolated from potato rizosphere grown in the potato area of Coahuila and Nuevo Leon, Mexico was carried out. The dual culture method was used in Czpek Dox agar medium, where four transplant discs of actinomycetes strains were placed at four equidistant points. Mycelium of *R. solani* was placed at the center of the Petri plate. Growth was evaluated on the third day and a percentage of inhibition was assessed comparing the fungal diameter growth against the actinomycetes strains and the control, where only the disc transplant of *R. solani* mycelium was planted. From the 90 strains of actinomycetes, 24 were selected as they showed the best inhibitory effect for a second evaluation. The strain AC77 was statistically the best (Tukey = 0.05) with a 87.05 percentage of inhibition followed by the strain AC12 with 73.9% and AC68, AC70, AC66, AC81, AC71 and AC33 with an inhibition percentage rate of 72.45 – 68.8%. Other strains showed an inhibition percentage up to 35 %. The actinomycetes from the rizosphere of potatoes could be a microflora source for biological control of *Rhizoctonia solani*.

Additional keywords: Antagonism, Antibiosis, Inhibition, *Streptomyces*.

INTRODUCCIÓN

La papa presenta un gran número de problemas fitosanitarios destacando las enfermedades causadas por hongos como: *Phytophthora infestans*, *Fusarium* spp., *Alternaria solani*, y *Rhizoctonia solani* (Randall, 1993). Esta

última tiene una distribución mundial, ocasiona pérdidas en plantas anuales, hortalizas, ornamentales y plantas perennes. En México ha ocasionado pérdidas que van de un 20-50% en la producción de papa (Valadez, 1993). El método más común para disminuir el daño ocasionado por *R. solani* es el químico; con la desventaja de su alta residualidad en el suelo, la que además afecta la microflora benéfica pudiéndose acumular en algunos casos en las partes comestibles de las plantas (Ristaino y Papavizas, 1985). Los resultados de la aplicación de fungicidas en algunos cultivos han sido variables, debido a diferentes niveles de susceptibilidad a los fungicidas que presentan los diversos grupos de anastomosis de *R. solani*. Tal es el caso del fungicida pencycuron que resulta inefectivo contra los grupos AG-2-1, AG-4, AG-5, AG-7 y AG-8; pero que resulta efectivo para los grupos AG-2-2, AG-3, AG-6 y AG-9. Además, algunos grupos de anastomosis comienzan a mostrar resistencia hacia algunos grupos químicos, por lo que se cuestiona su uso (Olaya *et al.*, 1994). El control biológico se considera como una alternativa seria, tanto hongos como bacterias se han estudiado por su capacidad para controlar enfermedades en un gran número de cultivos (Baker 1987; Dupler y Baker, 1984; Yuen *et al.*, 1992). Una herramienta para el manejo de *R. solani*, es el control con actinomicetos, ya que es más barato que otros métodos de control, más duradero y no causa contaminación ni disturbios ecológicos (Kluepfel, 1993). De los 10,000 compuestos que tienen actividad como antibióticos conocidos hasta los 80's, 67% son producidos por microorganismos; de este 100%, el 67% los producen actinomicetos, 9% otras bacterias, 15% hongos y 9% otros microorganismos (Crueger y Annelise, 1985). Rosales (1995) encontró 35

cepas de actinobacterias antagónicas a *Phytophthora capsici*, con un porcentaje de inhibición *in vitro* por arriba del 80%. Sutherland y Lockwood (1984) encontraron que la semilla de soya tratada con *Actinoplanes missouriensis* producía plantas con pudriciones radicales reducidas en suelos infectados por *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*, incrementando los rendimientos hasta cuatro veces comparado con el testigo en dos de tres pruebas de invernadero. Estos mismos autores también encontraron que los actinomicetos *Actinoplanes utahensis*, *Amorphosporangium auranticolor* y *Micromonospora* sp. parasitan oosporas de *P. megasperma glycinea*. Filonow y Lockwood (1985) reportaron que en suelos con baja densidad de oosporas de *P. m. glycinea*, los rendimientos medios de soya con semilla cubierta con *A. missouriensis*, *A. utahensis*, o *Micromonospora* sp. se incrementaron significativamente ($P = 0.05$) sobre los rendimientos del tratamiento donde la semilla no se cubrió con estos microorganismos. Dos cepas de *Streptomyces* identificadas como *S. diastatochromogenes* PonSSII, y *S. scabies* PonR, se seleccionaron por su capacidad para controlar la roña de la papa causada por *Streptomyces scabies* (Liu et al., 1995). En pruebas de antibiosis *in vitro* tres cepas de *Streptomyces* aisladas de lenticelas de tubérculos libres de sarna produjeron antibióticos letales a cepas patogénicas de *S. scabies*. Actualmente existe en el mercado la cepa de *Streptomyces griseoviridis* (Mycostop) para el control de enfermedades producidas por *Fusarium* sp. en clavel; *Gliocladium virens* (Glioguard) para el control de *Phytium* y *Rhizoctonia* en cultivos de invernadero y una cepa de *Pseudomonas cepacia* (Blue Circle) para el control de nemátodos y enfermedades causadas por *Fusarium* en maíz (Lumsden y Locke, 1989).

En esta investigación se planteo aislar actinomicetos de rizósfera de papa de la región papera de Coahuila y Nuevo León, y evaluar su efecto *in vitro* sobre *R. solani*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del área de trabajo. Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, ubicada en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México durante el periodo de marzo del 2000 a julio del 2001.

Muestreo de suelo. Se llevó a cabo en lotes comerciales de papa de Huachichil y Emiliano Zapata, Arteaga, Coahuila, y Navidad, Galeana, Nuevo León, prefiriendo aquellos que mostraron un manejo deficiente y con menor aplicación de agroquímicos. El muestreo se realizó al azar, el suelo se obtuvo de la rizósfera y se colocó en bolsas de polietileno previamente etiquetadas y se trasladaron en hieleras al laboratorio, donde se colocaron en refrigeración a una temperatura de 4°C para su posterior procesamiento.

Aislamiento de actinomicetos. De cada una de las muestras de suelo obtenidas, se colocaron 10 g en un frasco de dilución con 90 ml de agua destilada fenolizada con 631 µg de fenol. Esta suspensión se agitó por 10 min, y se realizaron diluciones seriadas de 10^{-2} a 10^{-4} ; de cada una de las diluciones se tomó con una micropipeta 1 ml de la suspensión, el cual se colocó en una caja Petri y se le añadió el medio Agar Caseína Almidón suplementado con Glicerol (ACA-G) y se agitó lentamente, para distribuir homogéneamente la suspensión en el medio. Una vez solidificado el medio, las cajas Petri se incubaron a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 5 días. El procedimiento

anterior se realizó con asepsia en una cámara de flujo laminar. Las colonias con morfología típica polvosa de actinomicetos, con olor a tierra mojada y que mostraban un halo de inhibición fueron purificados en Czapek Dox Agar (Difco). La conservación se llevó a cabo por resiembras periódicas en cajas Petri con el mismo medio, manteniéndolas en refrigeración a 4°C para su posterior evaluación.

Aislamiento de *R. solani*. El aislamiento se realizó a partir de siembras de tejido dañado por el hongo, en tallos y tubérculos de papa. Estos se lavaron con agua corriente, se cortaron pequeños trozos y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3% por 3 min, se lavaron 3 veces con agua destilada estéril para eliminar el exceso de cloro y se secaron con papel estroza estéril. Los trozos se colocaron en cajas Petri con medio Papa Dextrosa y Agar (PDA), las cajas se incubaron a una temperatura de 25°C por 4-5 días, para posteriormente con el apoyo de las claves de Sneh *et al.* (1991), lograr su identificación. La conservación de *R. solani* fue en medio de cultivo PDA.

Prueba de antibiosis *in vitro*. Para seleccionar los actinomicetos antagónicos a *R. solani*, cada una de las cepas aisladas de la rizósfera de la papa fueron sembradas en Czapek Dox Agar, colocando 4 explantes de 4 mm de diámetro en los 4 puntos cardinales de la caja Petri. Las placas con los explantes de los actinomicetos se incubaron a 25°C por 72 h. Una vez transcurrido ese tiempo, se procedió a colocar un disco de micelio del hongo del mismo diámetro que los actinomicetos en el centro de la caja, el testigo consistió en colocar un explante de 4 mm de diámetro de *R. solani* en el centro de dos cajas Petri con medio Czapek. Las placas se incubaron a 25°C por 5 días. La evaluación de la antibiosis se realizó midiendo con un

Bernier digital (Plastic Caliper Modelo 700-103B) el crecimiento diametral de *R. solani* a 5 días contra las cepas de actinomicetos en comparación con el crecimiento del hongo en el testigo. El diseño estadístico que se utilizó fue completamente al azar con dos repeticiones, donde los tratamientos se representaron por las cepas de actinomicetos. La unidad experimental consistió en una caja Petri, para determinar las mejores cepas, se realizó un Análisis de Varianza (ANVA) y la prueba de Tukey $P = 0.05$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de actinomicetos. El medio agar caseína almidón suplementado con glicerol permitió el aislamiento de 90 cepas de actinomicetos con efecto antagónico hacia otras bacterias y hongos presentes en el medio. Lo anterior coincide con Richter *et al.* (1994) quienes aislaron *Streptomyces* de la rizósfera del pino rojo en medio agar caseína almidón con antagonismo o comensalismo hacia los hongos micorrizicos *Laccaria bicolor* y *L. biccata*; y con Nesmith *et al.* (1985) y Liu *et al.* (1994), quienes utilizando el medio ACA suplementado con quitina lograron aislar una gran cantidad de cepas de *Streptomyces*.

Prueba de antibiosis *in vitro*. Se evaluaron 90 cepas de actinomicetos, de las cuales, 24 mostraron una inhibición promedio de 57%, dichas cepas fueron seleccionadas para realizar una segunda evaluación. La comparación de medias indica que el mejor tratamiento fue la cepa AC77 con 87.05% de inhibición, siendo estadísticamente superior al resto de las cepas evaluadas. Este tratamiento fue seguido de la cepa AC12 con 73.90% y posteriormente las cepas AC68, AC70, AC66, AC81, AC71 y AC33 con porcentajes de

inhibición que van de 72.45 a 68.8%, los que son estadísticamente similares entre sí (Cuadro 1). Sin embargo, también se presentaron cepas con porcentajes de inhibición de hasta un 53% (cepa AC8, Cuadro 1).

CUADRO 1. Comparación de medias de los porcentajes de inhibición *in vitro* de diferentes cepas de actinomicetos en cultivos duales sobre *R.solani*.

CLAVE DE LA CEPAS	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN
AC 77	87.05 A
AC 12	73.90 B
AC 68	72.45 BC
AC 70	71.10 BCD
AC 66	70.20 BCDE
AC 81	68.85 BCDE
AC 71	68.80 BCDE
AC 33	68.80 BCDE
AC 40	67.40 CDEF
AC 57	65.15 DEFG
AC 50	64.50 EFG
AC 28	62.30 FG
AC 38	59.45 GH
AC 48	54.30 HI
AC 8	53.85 HI

C.V. 2.6781. Tukey (P=0.05).

Se puede observar que existe una diferencia altamente significativa entre las cepas (P = 0.05). Estos resultados coinciden con Pisano *et al.* (1992),

quienes encontraron que de 116 actinomicetes capaces de degradar quitina, 85 (73%) fueron bioactivos, la actividad fue primeramente contra bacterias Gram positivas (68%) y sólo 11% fueron activos contra bacterias Gram negativas. Además encontraron que el 47% de los actinomicetos mostraron actividad contra hongos. De igual forma, Tomiya *et al.* (1990), encontraron actividad en *Streptomyces nigrescens* contra *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* y *Alternaria kikuchiana* y Tanaka y Omura (1993) obtuvieron cepas de *Micromonospora* de suelo con alto potencial hacia *Rhizoctonia solani*, tal y como se encontró en este trabajo. Otro parámetro evaluado fue el crecimiento diario de *R. solani* durante cinco días, tiempo que tardó el testigo en llenar la caja Petri, midiendo el diámetro del crecimiento y comparándolo entre cepas y el testigo (Fig. 1).

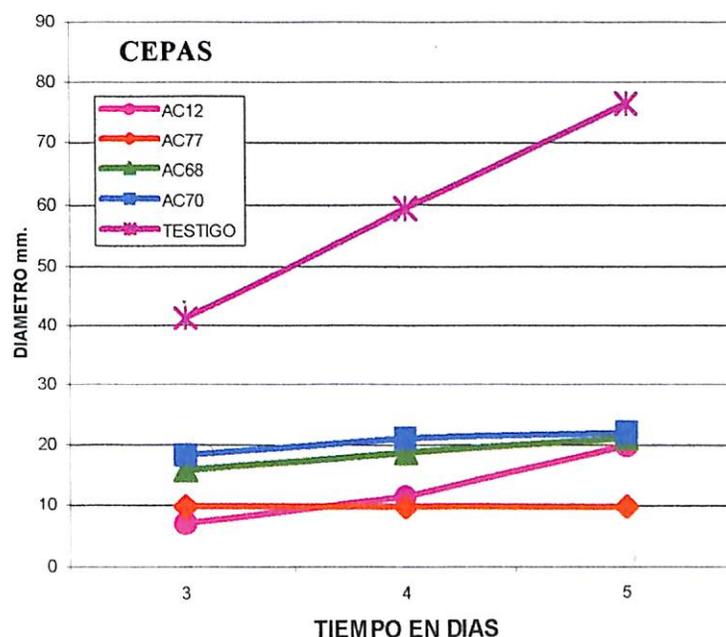


FIGURA 1. Crecimiento diametral de *Rhizoctonia solani* en cultivos duales con la presencia de diferentes cepas de actinomicetos.

Las cinco cepas con mejor efecto sobre *R. solani* disminuyeron su crecimiento. El crecimiento diametral a 5 días de *R. solani* en el testigo fue de 76.4 mm, mientras que con la cepa AC77 sólo midió 10 mm. *R. solani* en presencia de las cepas AC12, AC68 y AC70 creció 19.9, 21 y 22 mm respectivamente. En este caso también se pudo apreciar que en el transcurso de los días el crecimiento fue muy lento e insignificante en comparación al testigo (Cuadro 2).

Cuadro 2. Comparación de medias del crecimiento diametral de *R. solani*^Y.

Cepas	Día 3	Día 4	Día 5
AC 12	7.000 c	11.550 c	19.900 b
AC77	9.800 c	9.8500 c	9.900 c
AC68	15.700 b	18.700 b	21.000 b
AC70	18.200 b	21.000 b	22.050 b
TESTIGO	41.200 a	59.400 a	76.400 a

CV = 4.7180.

Y Crecimiento en mm.

a,b,c,...Columnas con la misma letra no tienen diferencia estadística significativa por Tukey (P=0.05).

Los porcentajes de inhibición que se obtuvieron en las cinco mejores cepas de actinomicetos, se pueden observar en la Figura 2; donde tenemos que la mayor inhibición fue de la cepa AC77 con 87.05% de inhibición a los 5 días, seguido de las cepas AC12, AC68, AC70 y AC66 con porcentajes de inhibición que van de 70.20-73.90.

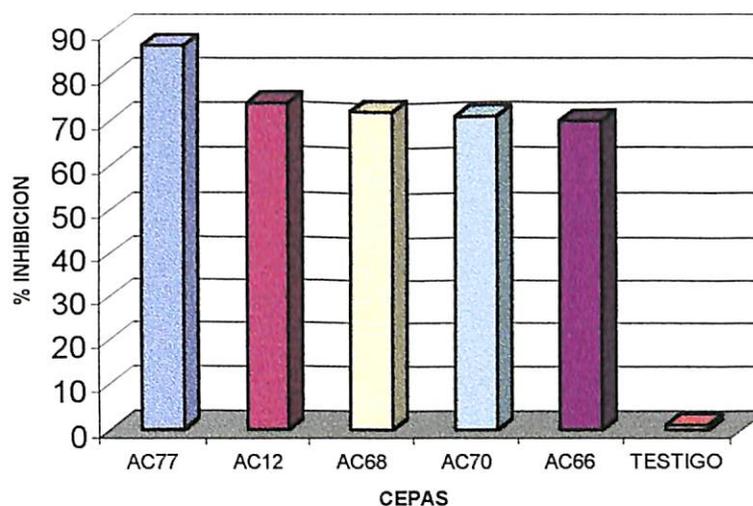


FIGURA 2. Porcentaje de inhibición *in vitro* de diferentes cepas de actinomicetos sobre *Rhizoctonia solani*.

En ese sentido, Broadbent *et al.* (1971), evaluaron 3,500 microorganismos por antibiosis *in vitro*. El 40% inhibió a uno o más de los nueve patógenos en agar, y alrededor de 4% fueron agentes efectivos de control biológico en suelo. Dichos autores notaron que algunos microorganismos que inhibieron en agar, también inhibieron en suelo y algunos que no inhibieron en agar tampoco lo hicieron en suelo. Igualmente, Austin *et al.* (1977), encontraron que *in vitro* e *in vivo* el antagonismo a *Drechslera dictyoides* por bacterias aisladas del rizoplano fue relacionado con la producción *in vitro* de metabolitos inhibitorios hacia esta bacteria. Bajo las condiciones experimentales en las que se desarrolló este trabajo, se puede concluir que existen en la rizósfera de la papa, actinomicetos que manifiestan altos porcentajes de inhibición y/o efecto antagónico *in vitro* hacia *R. solani* (Figura 3), los cuales se pueden aislar en medio agar caseína almidón suplementado con glicerol (ACA+G).

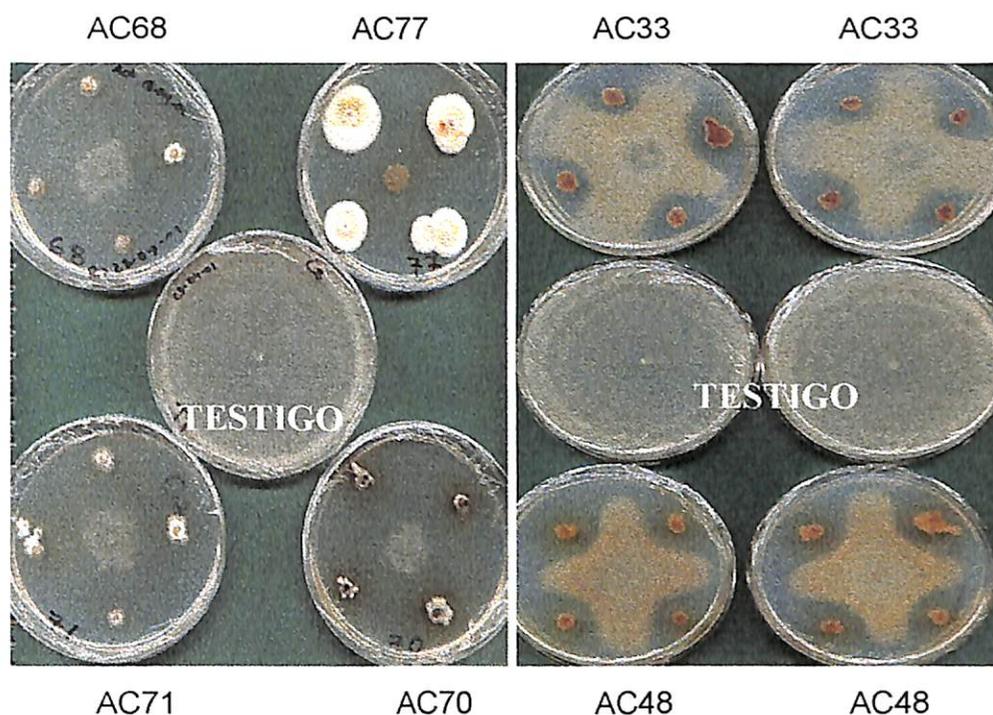


FIGURA 3. Inhibición *in vitro* de *R. solani* por el efecto de diferentes cepas de actinomicetos.

LITERATURA CITADA

- Austin, B., Dickinson, C.H., Goodfellow, M. 1977. Antagonistic interactions of phylloplane bacteria with *Drechslera dytyoides* (Drechler) Shuemaker. *Canadian Journal of Microbiology* 23:710-715.
- Baker, K.F. 1987. Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 25:67-85.
- Broadbent, P., Baker, K.F., and Waterworth, Y. 1971. Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australian soils. *Australian Journal of Biological Science* 24:925-944.
- Crueger, W., and Annelise C. 1985. *Biotechnology: A textbook of industrial microbiology*. Second Edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA 01375. pp. 6-8.

- Dupler, M., and Baker, R. 1984. Survival of *Pseudomonas putida* a biological control agent, in soil. *Phytopathology* 74:412-417.
- Filonow, A.B., and Lockwood, J.L. 1985. Evaluation of several actinomycetes and the fungus *Hyphochytrium catenoides* as biocontrol agents for *Phytophthora* root rot of soybean. *Plant Disease* 69:1033-1036.
- Kluepfel, A.D. 1993. The behavior and tracking of bacteria in the rizosphere. *Annual Review of Phytopathology* 31:441-472.
- Liu, D., Paulsrud, B.E., Kinkel, L.L., and Anderson, N.A. 1994. Evaluation of isolation procedures and soil sources in selecting pathogen-suppressive *Streptomyces* strains. *Phytopathology* 84:1204. (Abstract).
- Liu, D., Anderson, N.A., and Kinkel, L.L. 1995. Biological control of potato scab in the field with antagonistic *Streptomyces scabies*. *Phytopathology* 85:827-831.
- Lumsden, R.D., and Locke, J.C. 1989. Biological control of damping-off of cucumber. *Phytopathology* 79:361-366.
- Nesmith, W.C., and Jenkins, S.F.Jr. 1985. Influence of antagonists and controlled matric potential on the survival of *Pseudomonas solanacearum* in four North Carolina soils. *Phytopathology* 75:1182-1187.
- Olaya, G., Abawi, G.S., and Barnard, J. 1994. Response of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* to five fungicides and control of pocket rot of table beets with foliar sprays. *Plant Disease* 78:1033-1037.

- Pisano, M.A., Sommer, M.J., and Loretta, T. 1992. Bioactivity of chitinolytic actinomycetes of marine origin. *Applied Microbiology Biotechnology* 36:553-555.
- Randall, C. R. 1993. Potato health management. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. 193 p.
- Richter, D.L., Zuelling, T.R., Bagley, S.T., and Bruhn, J.N. 1994. Effects of red pine mycorrhizosphere streptomycetes on *in vitro* growth of ectomycorrhizal fungi. *Phytopathology* 84:1760. (Abstract).
- Ristaino, J. E., and Papavizas, G.C. 1985 Biological control of *Rhizoctonia* stem canker and black scurf of potato. *Phytopathology* 75:560-564.
- Rosales R.G. 1995. Actinobacterias antagónicas a *Phytophthora capsici* Leonian aisladas del rizoplano de chile serrano (*Capsicum annum* L.) en Ramos Arizpe, Coahuila. Tesis Maestría. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 46 p.
- Sneh, B., Burpee, L., and Ogoshi, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* Species. American Phytopatological Society, St. Paul, MN, USA. 133 p.
- Sutherland, E.D., and Lockwood, J.L. 1984. Hyperparasitism of oospores of some Peronosporales by *Actinoplanes missouriensis* and *Humicola fuscoatra* and other actinomycetes and fungi. *Canadian Journal of Plant Pathology* 6:139-145.
- Tanaka, Y., and Omura, S. 1993. Agroactive compounds of microbial origin *Annual Review of Microbiology* 45:57-87.
- Tomiya, T., Uramoto, M., and Isono, K. 1990. Isolation and structure of phosphazomycin. *Canadian Journal of Antibiotics* 43:118-121.

Valadez L.A. 1993. Producción de hortalizas. Editorial UTEHA México, D.F.

287 p.

Yuen, G.Y., and M.C. 1992. Reduction in brown patch severity by binucleate

Rhizoctonia antagonist. Plant Disease 78:118-12.

CONCLUSIONES GENERALES

El medio de cultivo agar caseína almidón suplementado con glicerol (ACA+G) mostró ser un medio apropiado para el aislamiento de actinomicetos de la rizósfera de papa.

En la rizósfera de la papa de la región de Huachichil y Emiliano Zapata, Arteaga, Coahuila y Navidad, Galeana, Nuevo León, existen actinomicetos con altos porcentajes de inhibición y/o antagonismo *in vitro* hacia *Rhizoctonia solani*.

La cepa AC77 mostró el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento de *R. solani* (87.05%).

La evaluación *in vitro* es útil para la selección de actinomicetos con potencial activo para el control de *Rhizoctonia solani*.

LITERATURA CITADA

- Abyad, M.S., Sayed, M.A., Shanshoury A.R. y Sabbagh, S.M. 1996. Antimicrobial activities of *Streptomyces pulcher*, *S. canescens* and *S. citroflourescens* against fungal and bacterial pathogens of tomato *in vitro*. *Folia Microbiológica*. 41: 4, 321-328.
- Adams, C.G. and Butler, E.E. 1979. Serological relationships among anastomosis groups of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 69: 629-633.
- Agrios, N.G. 1985. *Fitopatología*. Ed. LIMUSA. México, D.F. 756 p.
- Alexander, M. 1980. *Introducción a la microbiología del suelo*. Ed. AGT Editor, México. 491 p.
- Alexopoulos, C.J. y Mims, C.W. 1979. *Introducción a la micología*. Editorial Omega. Barcelona. 638 p.
- Alonso, C.Z. 1992. Evaluación de fungicidas para el control de la costra negra *Rhizoctonia solani* Kühn en papa *Solanum tuberosum* L., en Galeana, Nuevo León. Tesis Licenciatura. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila.
- Andrews, J.H. 1992. Biological control in the phyllosphere. *Ann. Rev. Phytopatol.* 30:603-635.
- Atkinson, D. y Watson, C.A. 2000. The beneficial rhizosphere: a dynamic entity. *Applied Soil Ecology*. 15: 99-104.
- Austin, B., Dickinson, C. H., and Goodfellow, M. 1977. Antagonistic interactions of phylloplane bacteria with *Drechslera dytyoides* (Drechler) Shuemaker. *Canadian. J. Microbiol.* 23:710-715.
- Baker, K. F. 1987. Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25:67-85.
- Banville, C.J. 1989. Yield losses damage to potato plant caused by *Rhizoctonia solani* Kühn. *American Potato Journal*. 66: 821-834.

- Brenchley, H.G. and Wilcox, H.J. 1979. Potato diseases. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. London: Her Majesty's Stationery Office. London, England.
- Brennan, R.F. 1991. Effect of nitrogen and residual copper on the occurrence of *Rhizoctonia* bare patch in wheat grown near Esperance, western, Australia. *Australian Journal Exp. Agric.* 31(2): 259-262.
- Broadbent, P., Baker, K. F. and Waterworth, Y. 1971. Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australian soils. *Australian Journal of Biological Science.* 24:925-944.
- Burges, A. 1965. The soil microflora-its nature and biology In: Baker, F.K. and Snyder, W.C. (Eds). *Ecology of soil-borne of plant pathogens.* Univ. CA. Press, USA. p. 21-32.
- Campos, A.J. 1987. Enfermedades del frijol. Ed. Trillas. México, D.F. 132 p.
- Carling, D.E., Leiner, R.H., and Westphale, P.C. 1989. Symptoms, signs and yield reduction associated with rhizoctonia disease of potato induced by tuberborne inoculum of *Rhizoctonia solani* AG-3. *American Potato Journal* 66: 693-701.
- Carling, D.E. and Leiner, R.H. 1986. Isolation and characterization of *Rhizoctonia solani* and *Rhizoctonia* like fungi from aerial stems and subterranean organs of potato plants. *Phytopathology* 76 (7): 725-729.
- Carling, D.E. and Leiner R.H. 1990. Effect of temperature on virulence of *Rhizoctonia solani* and other *Rhizoctonia* on potato. *Phytopathology* 80 (10): 930-933.
- Cepeda, S.M. y Hernández, F.D. 1987. Enfermedades asociadas al cultivo del frijol. Boletín No 37. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila. 28 p.
- CONPAPA (Confederación Nacional de Productores de Papa de la Republica Mexicana), 1999. Producción de papa en México, en Puras papas, Febrero 1999. 23 p.
- Crueger, W. and Annelise C. 1985. *Biotechnology: A textbook of industrial microbiology.* Second Edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA 01375. 6-8 p.
- Davies, K.W., Wicks, T.J., and Hall, B.H. 1996. Control of *Rhizoctonia* on potatoes. *Australian Journal of Exp. Agric.* 36: 339-345.
- Dupler, M. and Baker, R. 1984. Survival of *Pseudomonas putida* a biological control agent, in soil. *Phytopathology* 74: 412-417.

- Elad, Y., Chet, I., and Baker, R. 1987. Increased growth response of plants induced by rhizobacteria antagonistic to soil-borne pathogenic fungi. *Plant and soil*. 98: 325-330.
- Escamilla, J.C. 1996. Contro químico de la costra negra (*Rhizoctonia solani* Kühn) en el cultivo de la papa en invernadero. Tesis Licenciatura. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila. 93 p.
- Ferreira, J.H.S., Matthee, F.N., and Thomas, A.C. 1991. Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*. 81: 283-287.
- Filippi, C., Bagnoli, G., Treggi, G., and Picci, G. 1984. Antagonistic effects of soil bacteria on *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* Snyd and Hans. I. *In vitro* experiments and preliminary assays on carnation (*Dianthus cariophyllus* L.) *Plant and soil*. 80: 119-125.
- Filippi, C., Bagnoli, G., Volterrani, M., and Picci, G. 1987. Antagonistic effects of soil soil bacteria on *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* Snyd and Hans. III. Relation between protection against fusarium wilt in carnation and bacterial antagonistic colonization on roots. *Plant and soil*. 98:161-167.
- Filonow, A. B. and Lockwood, J. L. 1985. Evaluation of several actinomycetes and the fungus *Hyphochytrium catenoides* as biocontrol agents for *Phytophthora* root rot of soybean. *Plant Disease* 69:1033-1036.
- Frank, J.A. and Leach, S.S. 1980. Comparison of tuberborne and soilborne inoculum in the *Rhizoctonia* disease of potato. *Phytopathology*. 70: 51-53.
- Fravel, R.T. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Ann. Rev. Phytopatol.* 26: 75-91. USA.
- Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41:109-117.
- Gutierrez, A.A. y Romero, C.S. 1993. Etiología y control de la marchitez de la lechuga (*Lactuca sativa* L.) en Xochimilco, D.F. *Agrociencia* 14: 163-169.
- Harley, J.L. 1965. Mycorrhiza. In: Baker, F.K. and Snyder, W.C. (Eds). *Ecology of soil-borne plant pathogens* p 218-230. Univ. CA. Press. USA.
- Hill, C.B. and Anderson, N.A. 1989. An evaluation of potato disease caused by isolates of *Rhizoctonia solani* AG-3 *American Potato Journal* 66: 709-721.

- Hooker, J.W. 1990. Compendium of potato diseases. 4ta Edición. American Phytopathological Society, St. Paul Minnesota, USA. 125 p.
- INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias), 1999. Produce para el campo. Agosto, 1999. 12 p.
- Jeger, M.J., Hide, G.A., Van Den Boogert, P.H.J.F., Termorshuizen, A.J., and Van Baarlen, P. 1996. Pathology and control of soil-borne fungal pathogens of potato. *Potato Research* 39: 437-469.
- Kluepfel, A. D. 1993. The behavior and tracking of bacteria in the rhizosphere. *Ann. Rev. Phytopathol.* 31:441-472.
- Kulik; M.M. 1995. *In vitro* evaluation of actinomycetes for suppression of *Rhizoctonia solani* the iniciant of damping-off of alfalfa (*Medicago sativa*) USA. Agricultural Research Service (Abstract).
- Liu, D., Paulsrud, B. E., Kinkel, L.L., and Anderson, N. A. 1994. Evaluation of isolation procedures and soil sources in selecting pathogen-suppressive *Streptomyces* strains. (Abstract) *Phytopathology* 84: 1204.
- Liu, D., Anderson, N. A., and Kinkel, L. L. 1995. Biological control of potato scab in the field with antagonistic *Streptomyces scabies*. *Phytopathology* 85:827-831.
- Liu, S. and Baker, R. 1980. Mechanism of biological control in soil suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70 (5): 404-411.
- López, E.R. 1989. Manejo de *Rhizoctonia solani* Kühn con rotación de crucíferas en el cultivo de papa. Tesis Maestría. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila. 58 p.
- López, N. J. y Virgen, C.G. 1994. Antagonismo *in vitro* de *Bacillus subtilis* a *Fusarium oxysporum*, *Alternaria* sp. y *Botrytis* sp. XXI Congreso Nacional de Fitopatología. Sociedad Mexicana de Fitopatología.
- Lumsden, R. D. and Locke, J. C. 1989. Biological control of damping-off of cucumber. *Phytopathology* 79:361-366.
- Martinson, A.C. and Rehiyani, S.M. 1991. Suppression of *Rhizoctonia solani* in soil with animal manures. *Phytopathology* 81(10): 1241 (Abstrac).
- Mendoza, Z.C. y Pinto, B. 1983. Principios de fitopatología y enfermedades causadas por hongos. UACH. Chapingo, México. 311 p.

- Mew, W.T. and Rosales, A.M. 1986. Bacterization of rice plant for control sheat bligth caused by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 76:1260-1264.
- Nesmith, W. C. and Jenkins, S. F.Jr. 1985. Influence of antagonists and controlled matric potential on the survival of *Pseudomonas solanacearum* in four North Carolina soils. *Phytopathology* 75:1182-1187.
- Olaya, G., Abawi, G. S., and Barnard, J. 1994. Response of *Rhizoctonia solani* and binuclate *Rhizoctonia* to five fungicides and control of pocket rot of table beets with foliar sprays. *Plant Disease*. 78:1033-1037.
- Ossanna, N., and Mischke, S. 1990. Transformation of the biocontrol fungus *Glyocladium virens* to benomyl resistance. *Appl. Envir. Microbiol.* 56: 3052-3056.
- Paredes, T.A. 1989. Producción de papa en el Cofre de Perote. *Síntesis Hortícola*. 3 (7); 26-33.
- Park, CH-S., Paulitz, T.C. and Baker, R. 1988. Biocontrol of fusarium wilt of cucumber resulting from interactions between *Pseudomonas putida* and nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 78: 190-194.
- Parmeter, J.R., Sherwood, Jr. R.T., and Platt, W.D. 1969. Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology* 59: 1270-1278.
- Phillips, A.J.L. 1992. Acomparison of dust and acetone infusion aplications of Tolclofos-metil to bean seeds for the control of *Rhizoctonia solani*. *Plant Pathology* 41: 35-40.
- Pisano, M. A., Sommer, M. J. and Loretta, T. 1992. Bioactivity of chitinolytic actinomycetes of marine origin. *Applied Microbiology Biotechnology*. 36:553-555.
- Powelson, M.L., Johnson, K.B. and Rowe, R.C. 1993. Management of diseases caused by soil-borne plant pathogens. In: *Potato health management*. R.C. Rowe. Ed. APS Press. . Pp. 149-158.
- Randall C. R. 1993. *Potato health management*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. pp.; 149 -159.
- Richter, D. L., Zuelling, T. R., Bagley, S. T., and Bruhn, J. N. 1994. Effects of red pine mycorrhizosphere streptomycetes on *in vitro* growt of ectomycorrhizal fungi. (Abstract) *Phytopathology* 84: 1760.

- Ristaino, J. E. and Papavizas, G. C. 1985 Biological control of *Rhizoctonia* stem canker and black scurf of potato. *Phytopathology* 75:560-564.
- Robert, A.D. y Boothroyd, C.W. 1978. Fundamentos de patología vegetal. Acibia. Zaragoza, España. 392 p.
- Romero, C.S. 1988. Hongos fitopatógenos. UACH. Chapingo, México. 347 p.
- Romeiro, R.S., Moura, A.B., Matsuoka, K., and Fernandes, M.C. 1997. Actinomycetes selected for biocontrol of tomato wilt (*Ralstonia solanacearum*) and growth promotion after seed microbialization. *Phytopathology*. 87: 83. (Abstract).
- Rosales R. G. 1995. Actinobacterias antagónicas a *Phytophthora capsici* Leonian aisladas del rizoplano de chile serrano (*Capsicum annum* L.) en Ramos Arizpe, Coah. Tesis Maestría. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila. 46 p.
- Savamani, E. and Gnanamanickam, S.S. 1988. Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* in banana by inoculation with *Pseudomonas fluorescens*. *Plant and soil* 107: 3-9.
- Schrot, M.N. and Hancock, J.G. 1982. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science* 216: 1376-1381.
- Sidhu, J. and Young, R.J. 1991. Biological control of *Rhizoctonia* stem canker and black scurf of potato with a basidiomycetes fungus. *Phytopathology*. 81 (5): 704 (Abstract).
- Sneh, B., Burpee, L., and Ogoshi, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* Species. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. USA. p. 133.
- Sobero y Rojo, M.P., Gasoni, L., and Cozzi, J. 2000. Growth promotion in strawberry crop. Proceedings on V International workshop on PGPR. October 28- November 03. Córdoba, Argentina.
- Stasz, T.E. 1990. Genetic improvement of fungi for biological control of plant pathogens. *Can. J. Plant Pathol.* 12: 328-331.
- Stirling, G.R. and Wachtel, M.F. 1980. Mass production of *Bacillus penetrans* for biological control of root knots nematodes. *Nematologica* 26: 308-312.
- Sun, S.K. and Huang, J.W. 1985. Formulated soil amendment for controlling fusarium wilt and others soilborne diseases. *Plant Disease* 69:917-920.

- Sutherland, E. D. and Lockwood, J. L. 1984. Hyperparasitism of oospores of some Peronosporales by *Actinoplanes missouriensis* and *Humicola fuscoatra* and other actinomycetes and fungi. *Canadian Journal Plant Pathology*. 6:139-145.
- Talavera, R. 1981. La papa: enfermedades principales en México y su control. *Milciades*. 1 (1):33-37.
- Tanaka, Y. and Omura, S. 1993. Agroactive compounds of microbial origin. *Annual Review of Microbiology*. 45:57-87.
- Tarabily, K.A., Hardy, G.E., Sivasithamparam, K., Hussein, A.M., and Kurtboke, D.I. 1997. School of Biological and Environmental Sciences, Murdoch University Murdoch, Australia. *New Phytologist* 137: 3, 495-507.
- Tschen, S.M. and Kuo, W.L. 1985. Antibiotic inhibition and control of *Rhizoctonia solani* by *Bacillus subtilis* *Plant Protection Bulletin* 27: 95-103. Taiwan.
- Tinker, P.B. 1984. The role of microorganisms in mediating and facilitating the uptake of plant nutrients from soil. *Plant and soil*. 76: 77-91.
- Tomiya, T., Uramoto, M. and Isono, K. 1990. Isolation and structure of phosphazomycin. *Canadian Journal of Antibiotics*. 43:118-121.
- Tschen, S.M. and Kuo, W.L. 1985. Antibiotic inhibition and control of *Rhizoctonia solani* by *Bacillus subtilis*. *Plant Protection Bulletin* 27: 95-103. Taiwan.
- Tu, C.C. and Kimbrough, J.W. 1978. Systematics phylogeny of *Rhizoctonia* complex. *Bot. Gaz.* 139 (4): 454-466.
- Ugalde, A.G, 1993. Evaluación del funguicida Dyrene 50 PH. (Anilazina) para el control de la costra negra *Rhizoctonia solani* Kühn de la papa (*Solanum tuberosum* L.) en Galeana, N.L. Tesis Licenciatura. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila. 79 p.
- Valadez L. A. 1993. Producción de hortalizas. Editorial UTHEA México, D.F. 287p.
- VanLenteren, J.C. 2000. A greenhouse without pesticides fact or fantasy?. *Crop. Protection*. 19:375-384.
- Virgen, C.G. 1990. Control biológico de *Fusarium oxysporum* f sp. *niveum* (E.F. Smith) Snyder & Hans con *Bacillus subtilis* en sandia bajo condiciones de campo. Tesis Maestría. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila.

- Virgen, C.G. 1995. Sensibilidad *in vitro* de 5 grupos de anastomosis (AG's) de *Rhizoctonia solani* Kühn aislados de papa a 3 fungicidas. Memorias Congreso Nacional de Fitopatología. 41 p.
- Virgen, C.G. 2001. Enfermedades del cultivo de la papa. En: Curso sobre manejo integrado de plagas y enfermedades en tomate, chile y papa. INCAPA. Memorias. Guadalajara, Jalisco. Pp. 83-107.
- Walker, J.C. 1975. Patología Vegetal. 3ª. Ed. Omega. Barcelona, España. 818 p.
- Webster, J.P.G., Bowles, R.G., and Williams, N.T. 1999. Estimating the economics benefits of alternative pesticide usage scenarios: Wheat production in the United Kingdom. Crop. Protection. 18:83-89.
- Weller, D.M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Ann. Rev. Phytopathol. 26: 379-407.
- Yuan, W.M. and Crawford, D.L. 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seeds rots. Applied and Environmental Microbiology. 61: 8, 3119-3128. USA.
- Yuen, G. Y., Craig, M. L., and Giesler, L. J. 1994. Biological control of *Rhizoctonia solani* on tall fescue using fungus antagonists. Plant Disease 78:118-123.