

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Efectividad Biológica de Bioformulados Endófitos en el Control de *Rhizoctonia solani*
y su Efecto en el Cultivo de Frijol

Por:

ANDREA ROMERO ALDAMA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Saltillo, Coahuila, México.

Diciembre 2015.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Efectividad Biológica de Bioformulados Endófitos en el Control de *Rhizoctonia solani*
y su Efecto en el Cultivo de Frijol

Por:

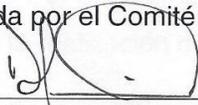
ANDREA ROMERO ALDAMA

TESIS

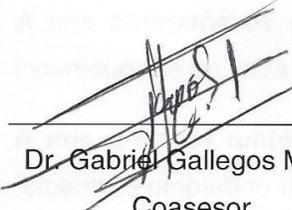
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

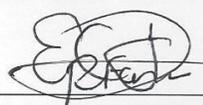
Aprobada por el Comité de Asesoría



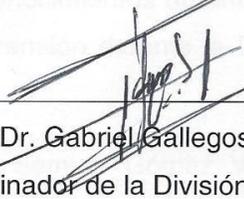
Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo
Asesor Principal



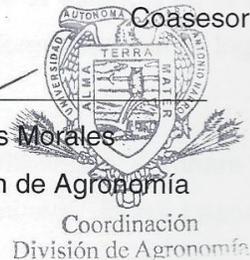
Dr. Gabriel Gallegos Morales
Coasesor



M.C. Epifanio Castro Del Ángel
Coasesor



Dr. Gabriel Gallegos Morales
Coordinador de la División de Agronomía



Saltillo, Coahuila, México.

Diciembre 2015.

AGRADECIMIENTOS

Con gran amor y respeto a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Por haberme recibido y ser la base de mi formación y darme las alas para volar en el campo profesional. Gracias mi ALMA TERRA MATER.

A mis profesores: por haberme brindado parte de su sabiduría y experiencia que durante el paso de los años, con trabajo y esmero la han obtenido.

A mis asesores

Dr. Francisco Daniel Castillo Hernández: Por sus valiosas enseñanzas, colaboración, su amistad y su entrega incondicional de tiempo y dedicación los cuales fueron indispensables para la realización de este trabajo.

M.C. Epifanio Castro del Ángel: Por el enorme apoyo, el valioso tiempo, disposición y paciencia que me brindo para la realización del presente trabajo.

Dr. Gabriel Gallegos Morales: Por su valiosa aportación y tiempo en la revisión de este trabajo, así como sus valiosas sugerencias y apoyo desinteresado.

A mis compañeros de generación por compartir cada momento de alegría y de incertidumbre en cada salón y clases.

A Fernanda Cesatti Iturbide: Por ser mi acompañante en mis aventuras, por ser mi incondicional amiga, por estar conmigo en mis peores momentos y en mis éxitos. Le doy gracias a dios por ponerte a mi lado.

A Samuel Gómez Villalvazo: gracias por tu incondicional amistad por estar conmigo en mis días de felicidad y de tristezas. Te quiero

A mis grandes amigos por su valiosa amistad por ser más que mis amigos por haberme compartido sus conocimientos durante la estancia en la universidad, y por brindarme su apoyo, comprensión durante la formación como: Ingeniero Agrónomo Parasitólogo:

Fernanda Cesatti Iturbide, Samuel Gómez Villalvazo, Abraham Cordero García, Daniel Rodríguez Chávez, Dulce R. Lara Villanueva, Jehieli Leana Sánchez, Jorge Cruz Martínez y Carlos Sedeño Osorio.

A mis amigos zootecnistas Ing. Irene Noyoltzin Velázquez Trejo, Ing. Catarino Salas Nuncio, Kennedy Guillermo y Cristian Machorro, Gracias por brindarme su amistad, consejos, por haber compartido alegrías, preocupaciones y todas esas experiencias que vivimos en nuestra ALMA TERRA MATER.

A Sara Espinoza Vargas, gracias por tu amor incondicional en la distancia por tus ánimos, por tus consejos, por estar conmigo en mis días de felicidad y de tristeza, por impulsarme para ser mejor persona cada día, porque han sido los años y los momentos que nos han vuelto hermanas. Gracias Sarita te quiero mucho.

A mi amigo Miguel Villareal por estar en mis momentos y días más especiales y contragirarme de su alegría.

A mis amigos de Puebla, mis amigos de toda la vida, Lupita Espinoza Vargas, Carlos Eduardo, Beto Ramírez que aun en la distancia nuestros lazos de amistad cada día se van enriqueciendo más, por estar conmigo en mis mejor días de felicidad y de tristeza. Los quiero!

A mis amigos de preparatoria: Rosa Elena Lázaro, Fanny Palacios, Nadia Peña, Gaby Gallardo, Julio López y Jesús Marcial, por estar conmigo en mis mejores días de la preparatoria y que aunque pasen los años, seguimos conservando esa bonita amistad. Los quiero!

DEDICATORIAS

A:

Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A mis padres quienes por ellos soy lo que soy.

Juan Romero Pastelin y Norma Aldama Espindola, autores de mi vida, quienes supieron encaminar mis pasos en la dirección correcta. Por ser ustedes el motor, mi fortaleza y mi luz en los momentos de oscuridad. Por sus oraciones y desvelos; hoy puedo asegurar que su optimismo, esfuerzo y sacrificio empiezan a reflejarse en mi vida, una de sus obras maestras. Los amo!

A mis hermanos:

Angélica Romero Aldama, Yaneli Romero Aldama, Jacob Romero Aldama y Jesús Yamil Romero Aldama (†). Gracias por todo su amor, por sus sacrificios, apoyo incondicional y los ánimos brindados en los momentos más difíciles de mi carrera para así poder llegar a la meta. A ti hermano Jesús gracias por ser mi angelito y cuidarme desde el cielo. Los amo.. Lo logramos!!

A Julio Cesar Vergara Lagunas:

Gracias por estos 3 años de conocernos y en los cuales hemos compartir tantas cosas, hemos pasado tanto que ahora estás conmigo en este día tan importante para mí. Solo quiero darte las gracias por todo el apoyo que me has dado por continuar y seguir en mi camino, gracias por estar conmigo y recuerda que eres muy importante para mí.

A mis sobrinos:

Yuridia Medrano Romero, Grisel Medrano Romero, Jesús Medrano romero, Dalila Medrano romero, por ser el alma de toda la familia y por contagiarnos de sus alegrías. Los amor!

RESUMEN

Para la realización de este trabajo se usaron 2 bioconsorcios a base de bacterias endófitas para lo cual se estableció el experimento bajo un diseño de bloques al azar con un total de siete repeticiones por tratamiento; cada repetición contó con dos plantas de frijol por maceta. La inoculación de las macetas se realizó depositando 20 ml de una suspensión con propágulos de *R. solani* (1×10^6 ufc). La primera aplicación de los bioconsorcios se realizó directamente al suelo al momento de la siembra, mientras la segunda aspersion se realizó después de la emergencia, cuando las plantas alcanzaron alrededor de 10 cm de altura lo que ocurrió a los 15 días después de la siembra y la tercera aplicación se realizó a intervalo de 15 días posteriores a la segunda aplicación.

Los resultados indican que los prototipos experimentales, denominados Bioformulados de endófitos 1 y 2 no disminuyen la incidencia y severidad de *Rhizoctonia solani* en las plantas de frijol, pero si promueve un mayor desarrollo de plantas de frijol que el desarrollo obtenido en los tratamientos inoculados con *Rhizoctonia solani*. El bioformulado 1 incrementa el 58% el diámetro de tallo y el contenido de clorofila; lo anterior sugiere que las bacterias endófitas mejoran el desarrollo de las plantas enfermas.

Palabras clave: Frijol, Bacterias endófitas, *R. solani*

Correo electrónico; Andrea Romero Aldama, andy_64n1@hotmail.com

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIAS	iii
RESUMEN	v
INTRODUCCIÓN	1
Justificación	3
Objetivos	3
Hipótesis	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Origen del Frijol	4
Clasificación Taxonómica	5
Descripción del Frijol.....	5
Especies del Frijol.....	6
Características Morfológicas.....	7
Raíz	7
Tallo.....	7
Hojas	8
Flores.....	8
Fruto o Legumbre	8
Enfermedades del Frijol	9
Antracnosis, <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	9
Roya, <i>Uromyces appendiculatus</i>	10
Tizón de Halo, <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	10
Tizón Común, <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	10
Pudriciones de raíz, <i>Fusarium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i> , <i>Thielaviopsis</i> , <i>Sclerotium</i> , <i>Aphanomyces</i> , <i>Phymatotrichopsis</i> y <i>Macrophomina</i>	11
<i>Rhizoctonia solani</i>	11

Ubicación Taxonómica.....	12
Síntomas.....	14
Control	14
Control Cultural.....	14
Control Químico.....	15
Control Biológico.	15
Bacterias Endófitas (BE).....	17
Origen y Evolución de las Bacterias Endófitas	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
Localización del Experimento	19
Aislamiento de <i>Rhizoctonia solani</i>	19
Identificación	19
Purificación	20
Obtención de los Microorganismos Endófitos.....	20
Preparación del Inoculo	20
Preparación e Inoculación de la Maceta.....	21
Aplicación de los Bioconsorcios.....	22
Primera Aplicación de los Bioconsorcios.....	22
Segunda y Tercera Aplicación de los Bioconsorcios	23
Diseño Experimental.....	23
RESULTADOS.....	25
Incidencia y Severidad de la Enfermedad a los 30 días Después de la Siembra. ..	25
Altura de Planta a los 30 días Después de la Siembra.	26
Diámetro de Tallo a los 30 días Después de la Siembra.	26
Contenido de Clorofila de Planta a los 30 días Después de la Siembra.	27
Incidencia y Severidad de la Enfermedad a los 60 días Después de la Siembra. ..	28
Altura de Planta a los 60 días Después de la Siembra.	29
Diámetro de Tallo de Planta a los 60 días Después de la Siembra.	30
Contenido de Clorofila de Planta a los 60 días Después de la Siembra.	30
Peso seco de Raíz a los 60 días Después de la Siembra.	31
DISCUSIÓN	33

CONCLUSIONES	35
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	36

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tratamientos establecidos para estudiar el efecto de Bioformulados endófitos para el control de <i>Rhizoctonia solani</i> en Frijol bajo condiciones de invernadero	24
Cuadro 2. Efecto de bioformulados endófitos en la incidencia y severidad de la enfermedad en plantas de frijol a los 30 días después de la siembra.....	25
Cuadro 3. Efecto de bioformulados endófitos en la altura de plantas de frijol a los 30 días después de la siembra.	26
Cuadro 4. Efecto de bioformulados endófitos en el diámetro de tallo de plantas de frijol a los 30 días después de la siembra.	27
Cuadro 5. Efecto de bioformulados endófitos en el contenido de clorofila de plantas de frijol a los 30 días después de la siembra.	28
Cuadro 6. Efecto de bioformulados endófitos en la incidencia y severidad de la enfermedad en plantas de frijol a los 60 días después de la siembra.....	29
Cuadro 7. Efecto de bioformulados endófitos en la altura de plantas de frijol a los 60 días después de la siembra.	29
Cuadro 8. Efecto de Bioformulados endófitos en el diámetro del tallo de plantas de frijol a los 60 días después de la siembra.	30
Cuadro 9. Efecto de bioformulados endófitos en el contenido de clorofila de plantas de frijol a los 60 días después de la siembra.	31
Cuadro 10. Efecto de Bioformulados endófitos en el peso seco de la raíz de plantas de frijol a los 60 días después de la siembra.	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cajas con crecimiento activo del patogeno.....	21
Figura 2. Obtención del inóculo de <i>R. solani</i>	21
Figura 3. Macetas con dos semillas de frijol.....	22
Figura 4. Inoculación de <i>R. solani</i> en macetas.....	22
Figura 5. Primera aplicación de los bioconsorcios	22
Figura 6. Segunda aplicación de los bioconsorcios en la base de la planta	23
Figura 7. Medición de la altura de las plantas	24
Figura 8. Medición de clorofila	24
Figura 9. Planta con tallos sanos (A) y enfermos con daño mínimo (B).....	34

INTRODUCCIÓN

El frijol es dentro de las leguminosas de grano la especie más importante para el consumo humano. Se cultiva en todo el mundo, en 129 países de los cinco continentes, según la (FAO, 2010). América latina es la zona de mayor producción y consumo, se estima que más del 45% de la producción mundial proviene de esta región, donde es considerado como uno de los productos básicos de la economía campesina.

De acuerdo a la producción acumulada de 2000-2010, los mayores países productores de frijol en el mundo son: Brasil con 16%, seguido de la India con 15.9%, Myanmar con 10.5%, China con 8.9% ocupando el quinto lugar México con 5.8% y en sexto lugar Estados Unidos con 5.6%.

El cultivo de frijol en México, es de gran importancia en la economía rural, es definido en la Ley de Desarrollo Rural Sustentable (LDRS, 2001) como un producto básico y estratégico para el desarrollo rural del país que se siembra en todas las regiones agrícolas; ocupa el segundo lugar en superficie a nivel nacional, con un promedio de 1.87 millones de hectáreas cosechadas, una producción de 1.3 millones de toneladas y con un valor de 7.5 mil millones de pesos (SIACON, SAGARPA). No obstante lo anterior, la principal limitante es su producción, la constituyen sin duda la escasa disponibilidad de agua, fenómeno que se agudiza en regiones con bajo régimen pluvial como Zacatecas, Durango y Chihuahua.

De los diversos microorganismos que atacan al cultivo del frijol, como pueden ser los virus, hongos, bacterias, nematodos, fitoplasmas y viroides, son los hongos el grupo que más enfermedades ocasionan. Algunas enfermedades más importantes en este cultivo son ocasionadas por *Rhizoctonia solani*.

La importancia de los hongos fitopatógenos del suelo que atacan la raíz, no se limita sólo al daño que ocasionan en las plantas hospedantes, si no también

debe considerarse el papel que juegan dentro de las cadenas tróficas y en las diversas relaciones que establecen con otros microorganismos del suelo.

La utilización extensiva de compuestos químicos para el control de enfermedades, la emergencia de patógenos resistentes a fungicidas, y el deterioro en la salud de productores y consumidores, han promovido la búsqueda de alternativas viables que garanticen un mayor sostenibilidad en la producción agrícola, minimizando el impacto sobre el medio ambiente.

Las bacterias endófitas son aquellas aisladas de tejidos de las plantas o de su interior, y no causan síntomas visibles de enfermedad en la planta (Pérez *et al.*, 2010). Sessitch (2002) indica que las bacterias endófitas ejercen control biológico sobre fitopatógenos, promueve el crecimiento en las plantas hospedadoras (Tsavkelova *et al.*, 2007), aumentan la resistencia a enfermedades, contribuyen a la fijación biológica de nitrógeno, solubilización de fosfato y brindan protección contra patógenos mediante la producción y síntesis de metabolitos secundarios.

Los microorganismos endófitos han sido reportados como agentes de control para fitopatógenos en diversos cultivos, se ha comprobado que los mecanismos de control biológico mediado por bacterias endófitas están basados en diferentes mecanismos los cuales incluyen antibiosis, la competencia por los nutrientes y nichos (CNN) y la resistencia sistemática incluida (ISR). Hasta ahora, solo el papel de la ISR en el control biológico mediado por endófitas ha sido confirmado en planta (Berg *et al.*, 2013).

Justificación

Se considera que el control biológico utilizando bacterias endófitas constituye hoy en día una alternativa que podría sustituir el control químico que además de su elevado costo, trae como consecuencia el desarrollo de resistencia en el hongo, y problemas de contaminación y toxicidad.

Objetivos

- a) Determinar la actividad antifúngica de las Bacterias Endófitas Bioformuladas en *R. solani* y su efecto en desarrollo y crecimiento del cultivo de frijol bajo condiciones de invernadero.

Hipótesis

- a) Se espera que al menos uno de los tratamientos reduzca la incidencia y severidad de *R. solani* en el cultivo de frijol y además mejore el crecimiento y desarrollo de la planta.

REVISIÓN DE LITERATURA

Origen del Frijol

Nuestro país es considerado como uno de los centros de origen de diversos tipos de frijol, siendo la especie más importante *Phaseolus vulgaris* (Delgado – Salinas, 2012). El frijol en México se considera un producto estratégico en el desarrollo rural y social del país, cumpliendo diversas funciones tanto de carácter alimentario como para el desarrollo socioeconómico. A lo largo de la historia, se ha convertido no solo en un alimento tradicional, sino también en un elemento de identificación cultural, comparable con todos productos como el maíz y el chile, que son básicos para explicar la dieta alimentaria de la población mexicana (Secretaría de Economía, 2012).

Casi todas las variedades cultivadas en Europa, Estados Unidos y en México son especies y variedades del género *Phaseolus* (Halfacre, 1992). La judía o frijol es el nombre común aplicado de forma amplia a diversas plantas de origen americano de la familia de las leguminosas. Las semillas y las vainas de estas plantas se usan como alimento y en la producción de forraje. Es un alimento muy apreciado por su elevado contenido proteínico (Sánchez, 2002)

Clasificación Taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Fabales

Familia: Fabácea

Género: *Phaseolus*

Especie: *vulgaris*

Descripción del Frijol

El frijol es una planta originaria de Mesoamérica (incluye México), que se cultiva desde hace alrededor de 8 mil años, desarrollándose durante ese tiempo una diversidad de tipos y calidades de frijoles (Parsons, 1981)

Por la preferencia del consumidor el frijol se clasifica en muy preferente: Azufrado, Mayo coba, Negro Jamapa, Peruano, Flor de Mayo y Flor de Junio; preferentes son las variedades Garbancillo, Manzano, Negro San Luis, Negro Querétaro y Pinto. Y por último los no preferentes que son: Alubia Blanca, Bayo Blanco, Negro Zacatecas, Ojo de Cabra y Bayo Berrendo (Meza, 1995).

En la zona norte de México se consume las variedades azufradas, que se cultivan principalmente en Sinaloa, mientras que una gran parte de frijol negro se cultiva en Nayarit y Zacatecas, con una demanda mayormente concentrada en las zonas centro y sur del país (FAO, 2010).

Por su gran importancia económica y social, el frijol es un producto estratégico dentro del desarrollo rural de México, ya que ocupa el segundo lugar en cuanto a superficie sembrada nacional y representa además la segunda actividad agrícola más importante en el país por el número de productores dedicados al cultivo. Es así, que como generador de empleo es relevante dentro de la economía del sector rural (FIRA, 2001).

Asimismo, es un alimento fundamental en la dieta de la población mexicana, sobre todo para las clases más desprotegidas del país, ya que constituye la fuente principal de proteínas para dicho sector, siendo un alimento que no puede sustituirse con el consumo de algún otro. Adicionalmente, la importancia ancestral de su cultivo en el campo mexicano radica también en que forma parte de la cultura gastronómica de México, de ahí la amplia aceptación del producto en la cocina mexicana, por lo que posee una gran demanda a nivel nacional (Montes, *et al.*, 1990).

Especies del Frijol

El frijol es una leguminosa que constituye una rica fuente de proteína e hidratos de carbono, además es abundante en vitaminas del complejo B, como niacina, riboflavina, ácido fólico y tiamina; también proporciona hierro, cobre, zinc, fósforo, potasio, magnesio y calcio, y presenta un alto contenido de fibra. Existen múltiples variedades de frijol que se caracterizan por su tamaño, forma, color y tipo de crecimiento (Halfacre, 1992).

En México se cultivan cerca de 70 que, de acuerdo con la norma, se divide en: negro, amarillos, rosados, bayos, pintos y más.

Características Morfológicas

La planta es anual, herbácea, arbustiva y bastante abundante en hojas; de estación cálida, con ramas que proceden del tallo principal, las que dependen de las condiciones ambientales, siendo de gran importancia la densidad poblacional, pues también incide en la altura y dureza del tallo; tiene hojas, tallos y vainas pubescentes.

Raíz

El sistema radical está formado por la raíz primaria o principal que se desarrolla a partir de la radícula del embrión. Sobre esta y en disposición de corona se forman la secundaria, terciarias y otras subdivisiones; Los pelos absorbentes, órganos epidérmicos especializados en la absorción de agua y nutrimentos, se localizan en las partes jóvenes de las raíces laterales donde viven en simbiosis con la planta bacterias del género *Rhizobium* fijadoras del nitrógeno atmosférico. Aunque el sistema radical presenta variación se considera fibroso (Soria, 2000).

Tallo

El tallo joven es herbáceo y semileñoso al final del ciclo; es una sucesión de nudos y entrenudos donde se insertan las hojas y los diversos complejos axilares, el tallo o eje principal es de mayor diámetro que las ramas laterales, de color verde rosa o morado, glabro o pubescente, determinado si termina en inflorescencia o indeterminado si su yema apical es vegetativa. Se indica en la inserción de las raíces y el primer nudo corresponde al de los cotiledones, esta primera parte del tallo se denomina hipocótilo, en el segundo nudo se presenta el primer par de hojas verdaderas, las cuales son simples y opuestas y reciben el nombre de epicótilo, en el

tercer nudo emerge la primer hoja compuesta las cuales son trifoliadas y alternas (Soria, 2000).

Hojas

Son de dos tipos: simples y compuestas. Los cotiledones constituyen el primer par de hojas, proveen de sustancias de reserva a la planta durante la germinación y emergencia y elaboran los primeros carbohidratos a través de la fotosíntesis en sus cloroplastos, son de poca duración, el segundo par y primeras hojas verdaderas, se desarrollan en el segundo nudo, son simples, opuestas y cortadas. A partir del tercer nudo se desarrollan las hojas compuestas, las cuales son alternas, de tres folíolos, un peciolo y un raquis. Presentan variación en cuanto a tamaño, color y pilosidad, esta variación está relacionada, con la variedad y con las condiciones ambientales de luz y humedad (Soria, 2000).

Flores

Las flores de frijol desarrollan en una inflorescencia de racimo, la cual puede ser terminal como sucede en las variedades de hábito determinado o lateral en las indeterminadas. La inflorescencia consta de pedúnculo raquis, brácteas y botones florales. Los botones florales se desarrollan en las axilas de las brácteas. Pueden ser blancas, rosada o de color púrpura (Camargo, 1999).

Fruto o Legumbre

El fruto es el ovario desarrollado en forma de vaina con dos suturas que unen las dos valvas; las semillas se unen a las valvas en forma alterna sobre la sutura plavental. Las divergencias laterales están constituidas por los cotiledones y las dos

hojas primarias verdaderas; los cotiledones forman la parte voluminosa de la semilla, son hojas modificadas para el almacén de carbohidratos y proteínas y constituyen la parte aprovechable de la semilla (Montes, 1990).

Enfermedades del Frijol

Tomando en consideración el variado número de ambientes en el país donde se cultiva el frijol, no resulta extraño encontrar reportes de daños económicos ocasionados por ataques de hongos, bacterias y virus (Danilo, 2011). Las enfermedades comunes que se presentan son: roya, pudriciones de raíz, cenicilla y antracnosis causadas por hongos y tizón común y tizón de halo causada por bacterias (Martínez *et al.*, 2008). Ocasionalmente otras enfermedades como moho blanco o el virus del mosaico común llegan a provocar epidemias severas (Mena *et al.*, 2010).

Antracnosis, Colletotrichum lindemuthianum

La enfermedad puede dañar todas las partes aéreas de la planta aún los cotiledones pueden presentar pequeñas lesiones de color café oscuro a negro. Sin embargo es más común que las primeras lesiones se puedan descubrir en el envés de las hojas o en peciolos como lesiones angulares o lineales de color oscuro o rojo ladrillo o bien como pequeños canceres hundidos en las venas de las hojas. La enfermedad es más notoria en las vainas; las primeras lesiones aparecen como lesiones de color naranja que se transforman en canceres hundidos limitados por un anillo negro ligeramente elevado que a su vez se rodea por una franja de color café rojizo. En el centro de esas lesiones puede observarse el crecimiento del hongo de color café claro a rosa durante periodos muy húmedos (Mena y Velázquez, 2010).

Roya, *Uromyces appendiculatus*

El signo que caracteriza a la roya es la aparición en todas las partes aéreas de la planta pero principalmente en hojas y vainas verdes, de lesiones circulares de color café rojizo aunque inicialmente aparecen pequeñas manchas blancas ligeramente levantadas que se transforman en las lesiones café rojizas mencionadas. Estas lesiones toman una coloración negra debido a la producción de teliosporas especiales para sobrevivir al invierno (Mena y Velázquez, 2010).

Tizón de Halo, *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola*

La bacteria puede afectar hojas, tallo, vainas y la semilla. Los primeros síntomas de la enfermedad aparecen como pequeñas manchas aguanosas en las hojas. En el clima seco estas manchas toman una coloración bronceada y mueren. Alrededor de esas manchas se desarrolla un halo ancho de color verde amarillo y aspecto grasoso. Los síntomas en las vainas consisten en manchas de color rojo o café o franjas del mismo color en la sutura de la vaina que pueden tener un aspecto aguanoso. El grano en formación en esas vainas puede podrirse o “chuparse” y decolorarse (Mena y Velázquez, 2010).

Tizón Común, *Xanthomonas campestris pv. phaseoli*.

Los primeros síntomas de la enfermedad aparecen como manchas aguanosas que luego de agrandarse se marchitan o secan y finalmente toman una coloración negra. Estas lesiones, frecuentemente son rodeadas por una angosta zona de color verde amarillo, pueden ser encontradas en el borde de las hojas o en tejido entre las

venas. Una vez que estas lesiones crecen y se unen a las plantas afectadas toman un aspecto atizonado o quemado. En las vainas enfermas se desarrollan manchas circulares, ligeramente hundidas y de aspecto aguanoso (Mena y Velázquez, 2010).

Pudriciones de raíz, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Thielaviopsis*, *Sclerotium*, *Aphanomyces*, *Phymatotrichopsis* y *Macrophomina*

Existen varios tipos de pudriciones de la raíz en diversas áreas productoras de frijol en el mundo. Algunos factores como el cultivo continuo de frijol, rotaciones de cultivo inadecuadas y compactación del suelo han contribuido a hacer más grave la prevalencia y severidad de estas enfermedades. En general, la enfermedad inducida por un complejo de hongos en el suelo, que ocasionan pudrición en preemergencia o después de emergencia en las plántulas, los síntomas son una pudrición café, rojiza o negra a la altura del cuello o nivel del suelo con marchitez y secado de las plantas (Padilla, 2009). Inicialmente muestran un marchitamiento y amarillamiento de las hojas inferiores; al transcurso del tiempo estos síntomas se generalizan en toda la planta y finalmente el follaje se seca y las plantas adquieren una apariencia de “quemadas”. Cuando el ataque ocurre en plantas adultas, las vainas se marchitan y en muchas ocasiones no alcanzan a formar semillas (Martínez *et al.*, 2008).

Rhizoctonia solani

Es uno de los hongos más importantes y mayor reconocido como patógeno de plantas. Por lo general causa enfermedades en una amplia gama de hospederos, afectado tanto partes aéreas como subterráneas. Usualmente se le conoce como hongo de micelio estéril, debido a que durante muchos años se pensó que era

incapaz de producir algún tipo de espora, ya fuera sexual o asexual. Actualmente se sabe que *Rhizoctonia solani* produce basidiosporas en su etapa sexual, lo que hacen que esta especie sea un basidiomiceto al que se le denominó *Thanatephorus cucumeris* (Agrios, 2004).

La infección de *R. solani* en las leguminosas causa reducción en la densidad poblacional y afecta en forma negativa los rendimientos.

Ubicación Taxonómica

Reino: Fungí

Phylum: Basidiomycota

Clase: Basidiomycetes

Orden: Ceratobasidiales

Familia: *Ceratobasidiaceae*

Género: *Thanatephorus*

Especie: *cucumeris*

Anamorfico: *Rhizoctonia solani*

El género *Rhizoctonia*, fue definida por De Candolle 1815, sobre la base de la producción de esclerocios de textura uniforme con hilos hifales emanantes de estos, y la asociación del micelio con raíces de plantas vivas. (Senh *et al.*, 1991). La especie más conocida dentro del género *Rhizoctonia* es *R. solani* la que fue originalmente descrita en 1858 por Julis Kuhn (Senh, *et al.*, 1991).

Dentro de las características que permiten clasificar taxonómicamente aislamientos de *R. solani* son: tendencias de pigmentación hifal café, ramificación aproxima al septo distal de células en hifas vegetativas jóvenes, estrechamiento de hifa y formación de septos a una distancia corta del punto de origen a la ramificación hifal, septo dolípora y células multinucleadas en hifa vegetativa joven (Parmeter y Whitney, 1970).

El anamorfo es denominado *Rhizoctonia solani* y su teleomorfo *Thanatephorus cucumeris*, es un basidiomiceto no productor de esporas asexuales (conidios) y productor ocasional de basidiosporas (esporas sexuales). En la naturaleza se producen asexualmente y se encuentra en forma de micelio vegetativo y/o esclerocios (Agrios, 2004). Macroscópicamente las colonias jóvenes de *R. solani* se caracterizan por ser incoloras y algodonosas, aunque dependiendo de la especie, puede llegar a tornarse cremosas o amarillentas. Al llegar a la maduración, la colonia toma una coloración marrón (Ceresini *et al.*, 1999).

Este hongo, parasíticamente no especializado forma esclerocios en el suelo sobrevive por largos periodos de tiempo en ausencia de hospederos, mediante estas estructuras o por medio de hifas de pared gruesa sobre residuos de plantas. Es un buen competidor saprofítico, puede colonizar muchos sustratos y puede tolerar cambios amplios de ambiente; esta condición le favorece tanto para su supervivencia como para su acción patogénica sobre tejidos juveniles o en estrés fisiológico inadecuado (González *et al.*, 1989; Contreras *et al.*, 1996).

La especie fitopatógena *Rhizoctonia solani* ocasiona pérdidas importantes, en la mayoría de plantas perennes y anuales, incluyendo casi todos los cultivos hortícolas que se desarrollan dentro o sobre el suelo. Entre las enfermedades más comunes causadas por este fitopatógeno ésta el llamado “damping-off” o caída de las plántulas, como consecuencia del estrangulamiento y necrosis del tallo a nivel de cuello en plántulas recién emergidas. Produce una reducción significativa del vigor de las plantas (Cedeño, 2001).

Síntomas

En condiciones favorables ataca plántulas antes o poco después de la emergencia, las lesiones son hundidas de tamaño variable, con coloraciones de café canela a café rojizo. Las áreas oscuras y necróticas son más evidentes cuando el tejido es atacado, puede llegar a cubrir toda la base del tallo y destruir raíces debilitando la planta o causándole un acentuado amarillamiento. En plantas de más de 15 cm de altura ocasiona marchitez. Los síntomas en la parte aérea son más notorios después de la floración como marchitamiento y muerte de la planta (Álvarez y Delgadillo, 2004).

Control

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 estiércol proveniente de ganado no certificado.

Martinson y Rehiyani (1991) determinaron que el uso de estiércol animal (pollo y cerdo) agregado a suelo infestado con *R. solani* puede reducir el potencial de la enfermedad, ambos autores determinaron que este 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 del control de este patógeno.

Por su parte Schulte *et al.* (2008) mencionan que la aplicación de composta en suelos infestados con *R. solani* aumenta la población microbiana benéfica reduciendo la incidencia de este patógeno.

Ruiz *et al.* (2001) menciona que el encalado de suelo disminuye la incidencia de esta patógeno por el aumento que genera la cal en el pH del suelo, así mismo reportan que la solarización de suelo húmedo aumenta la actividad biológica de antagonistas y disminuye la acción de los fitopatógenos.

Álvarez y Delgadillo (2004) recomiendan evitar exceso de humedad, desinfectar el sustrato y las charolas germinadoras.

Control Químico

El principal control de estos fitopatógenos se realiza con la aplicación de agroquímicos entre ellos etridiazol, fosetil de aluminio, metalaxil, azoxystrobin, y tiabendazol (Pérez *et al.*, 2004).

López *et al.* (2009) señalan que *R. solani* ha adquirido resistencia a fungicidas orgánicos así como a fungicidas sistémicos como Carboxil y Benomil. Aunado a esto Álvarez y Delgadillo (2004) mencionan que es recomendable tratar la semilla con Captan o PCNB.

Control Biológico.

En un sentido amplio y según la definición de Cook y Baker (1983) el control biológico involucraría todas aquellas prácticas tendientes a disminuir la incidencia de enfermedades excluyendo el control químico.

En la naturaleza existe una interacción continua entre los potenciales patógenos y sus antagonistas de forma tal que estos últimos contribuyen a que no

haya enfermedad en la mayoría de los casos; es decir, el control biológico funciona naturalmente. (Cook y Baker 1983) En condiciones naturales los microorganismos están en un equilibrio dinámico en la superficie de las plantas. La disminución de la flora de competencia por prácticas agrícolas como lavado de frutos, aplicación de fungicidas, y desinfección de suelos entre otras, favorecen el desarrollo de los patógenos (Rollan *et al.*, 1998).

Demirci *et al.* (2009) mencionan que *Verticillium biguttatum* crece alrededor de las hifas de *R. solani* estrangulando y penetrando las paredes de la célula del huésped y creciendo dentro de ellas.

Hernández *et al.* (2013) señalan que diversas especies del genero *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* *inhiben* el desarrollo de *R. solani* hasta en un 54% de su crecimiento micelial. Igualmente mencionan que la aplicación de estas especies de *Bacillus* en una presentación microencapsulada reduce la incidencia y severidad en plantas de tomate superando al control químico, además de mejorar la producción del cultivo.

Mojica *et al.* (2009) estudiaron 64 cepas de *Bacillus thuringiensis* de la cuales 16 de ellas tuvieron efectos antagonistas en el crecimiento micelial de *R. solani*. Las cepas GM-64 (66,66%) y HD-203 (65,99%) produjeron la mayor inhibición de crecimiento micelial.

Bacterias Endófitas (BE)

Origen y Evolución de las Bacterias Endófitas

Las primeras evidencias de asociación entre microorganismos endófitos y plantas, se originaron de observaciones en tejidos y hojas fosilizadas, lo que soporta la inferencia de que la asociación planta-endófito pudo haber ocurrido junto con la aparición de las primeras plantas en la tierra (Strobel, 2003; Huawei *et al.*, 2006). Como resultado de esa larga asociación es posible que algunos de estos microorganismos endófitos hayan adquirido un sistema genético para transferir información desde la planta hospedera a ellos, o viceversa. Este, posiblemente sería un mecanismo rápido y seguro de adaptación a diferentes ambientes y a la planta hospedera, a ejemplo de rutas bioquímicas que resultan en la producción de compuestos químicos y metabolitos secundarios en las plantas asociadas a los endófitos (Germaine *et al.*, 2004; Tsavkelova *et al.*, 2007).

El concepto de que los endófitos son microorganismos establecidos en los tejidos internos de la epidermis (Kloepper *et al.*, 1992) es actualmente conocido como la asociación biológica en que los microorganismos colonizan tejidos internos vivos de las plantas, sin causar ningún efecto negativo inmediato o daño aparente a la planta (Bacon y White, 2000).

Las bacterias endófitas son reconocidas como las aisladas de tejidos de plantas desinfectadas superficialmente o, de su interior, y que no causan síntomas visibles de enfermedad en la planta (Hallmann *et al.*, 1997; Sakiyama *et al.*, 2001). Estas bacterias son encontradas principalmente en los espacios intercelulares de los tejidos y, con menor frecuencia, intracelularmente y en tejidos vasculares, sin causar síntomas de enfermedad (Hureket *et al.*, 1994; Bell *et al.*, 1995). Las bacterias endófitas se pueden tornar patógenas sobre ciertas condiciones, e inclusive en función del genotipo de la planta hospedera (Misaghi y Donndelinger, 1990). Diversos estudios también señalan que las bacterias endófitas interactúan con patógenos (Huang, 1991; Bacon y Hilton, 1997; Sessitch *et al.*, 2002), promueven el crecimiento

en las plantas (tsavkelova *et al.*, 2007), aumentan la resistencia a enfermedades (Chanway, 1998), contribuyen a la fijación biológica de nitrógeno (Jiménez-Salgado *et al.* 1997; Estrada *et al.*, 2002) y brindan protección contra patógenos mediante la producción y síntesis de metabolitos secundarios (Brooks *et al.*, 1995; Berg *et al.*, 2005; Tan y Zou, 2001; Long *et al.*, 2003; Shiomi *et al.*, 2006) y son utilizadas en labiorremediación (Newman y Reynolds, 2005).

Las discusiones sobre el origen de las bacterias endófitas y la forma de penetración, además de los mecanismos de colonización, consideran la hipótesis de que se originaron de semillas, de la rizosfera, de filoplano o de material utilizado para la propagación vegetativa (Reinhold-Hurek Yhurek, 1998). La penetración en la planta puede ocurrir por los estomas, heridas, áreas de emergencia de raíces laterales, siendo que éstas endófitas pueden producir enzimas hidrolíticas capaces de degradar la pared celular de los vegetales (McCully, 2002). Esta hipótesis fue derivada del análisis de datos que demuestran la presencia de enzimas celulíticas y pectinolíticas producidas por bacterias endofíticas, a ejemplo de *Azoarcus* sp. (Hureket *et al.*, 1994), *Azospirillum irakense* (Khammas y Káiser, 1991) y *Pseudomonas* (Quadt-Hallmann *et al.*, 1997). La colonización y la distribución de bacterias endófitas en la planta pueden ser influenciadas por la interacción con otros organismos asociados a la planta, a ejemplo de nematodos parásitos, o por características propias de su hospedero (Hirano y Hupper, 2002).

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del Experimento

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de fitopatología e invernadero del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, ubicada en Buenavista, Saltillo, Coahuila.

Aislamiento de *Rhizoctonia solani*

Se recolectaron plantas de frijol, con signos y/o síntomas de marchitez por *Rhizoctonia solani* y se trasladaron al Departamento de Parasitología. Los aislamientos se realizaron bajo condiciones de asepsia, en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA), para la desinfección se sumergieron áreas de tejido enfermo en hipoclorito de sodio al 3 % por 1 min y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril para remover los residuos del desinfectante, posteriormente se colocaron en papel de estraza para su secado, enseguida se depositaron en cajas petri con el medio de cultivo, se sellaron con cinta parafilm y se incubaron a 26 ± 2 °C por una semana.

Identificación

En un microscopio estereoscópico se observó el crecimiento micelial en las placas de petri colonizadas por el hongo. Para su identificación se prepararon laminillas por lo que con una aguja de disección se tomó una pequeña porción del micelio y se colocó en un portaobjetos con lactofenol azul de algodón se cubrió con el cubre objeto y se observó en el microscopio compuesto en aumento de 40 X para observar las características típicas de *Rhizoctonia solani* de acuerdo a lo señalado por Sneh *et al.* (1991).

Purificación

Para la purificación de *R. solani* se empleó el método por punta de hifa, se tomó un fragmento de la punta de la hifa del hongo y se colocó en medio PDA, las siembras se incubaron a 26 ± 2 °C por una semana.

Obtención de los Microorganismos Endófitos

Los microorganismos endófitos fueron aislados y formulados por la empresa Biofertilizantes Mexicanos, S. A. De C. V. en convenio con la Universidad bajo el proyecto 30 32400 7374 coordinado con el Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo. Los bioformulados contienen una mezcla de especies de *Bacillus*; la diferencia entre los bioformulados consiste en diferentes acondicionadores en cada una de estas lo que influye en la estabilidad y viabilidad biológica de los productos.

Preparación del Inoculo

El inoculo de *R. solani* se obtuvo al licuar el contenido de 10 cajas petri con el medio de cultivo y el crecimiento del micelio y esclerocios de 14 días de edad del hongo en 1L de agua destilada estéril (Fig. 1 y 2). De este macerado se preparó una suspensión de propágulos a una concentración de 1×10^6 ufc/ml, siendo esta la suspensión para inocular las macetas.



Figura 1. Cajas con crecimiento activo del patógeno



Figura 2. Obtención del inóculo de *R. solani*

Preparación e Inoculación de la Maceta

Se utilizó tierra orgánica del campo de la Universidad, la cual fue cribada, mezclada y esterilizada, para uniformizar el suelo y asegurar que no existiera algún microorganismo viable que pudiera alterar los resultados de la evaluación.

La inoculación de las macetas se realizó depositando 20 ml de la suspensión de *R. solani* (1×10^6 ufc/ml) (Fig. 3 y 4) en el área de siembra de la maceta contaminando el suelo estéril con la semilla de frijol previamente desinfectada en una solución de cloralex al 2% durante 3 min y enjuagada por dos ocasiones en agua destilada estéril y secada en papel estroza al ambiente bajo condiciones de laboratorio.



Figura 3. Macetas con dos semillas de frijol



Figura 4. Inoculación de *R. solani* en macetas

Aplicación de los Bioconsorcios

Primera Aplicación de los Bioconsorcios

La aplicación de los bioconsorcios se realizó directamente al suelo preparado con la semilla e inóculo para cada uno de los tratamientos (fig. 5). Después de aplicar los tratamientos las macetas se colocaron bajo condiciones de invernadero.



Figura 5. Primera aplicación de los bioconsorcios

Segunda y Tercera Aplicación de los Bioconsorcios

Posterior a la emergencia de las plantas se realizaron dos aplicaciones más; la segunda aspersión se realizó después de la emergencia, cuando las plantas alcanzaron alrededor de 10 cm de altura lo que ocurrió a los 15 días después de la siembra y la tercera aplicación se realizó a intervalo de 15 días posteriores a la segunda aplicación. La solución se aplicó con un aspersor manual, en la base de la planta (Fig. 6).



Figura 6. Segunda aplicación de los bioconsorcios en la base de la planta

Diseño Experimental

El experimento se estableció en un diseño de bloques al azar con un total de siete repeticiones por cada tratamiento, cada repetición contó con dos plantas de frijol. Los tratamientos realizados se muestran en la Tabla 1. Los resultados se

procesaron por un análisis de varianza y la prueba de Tukey para la separación de medias a un 0.05% de significancia.

Cuadro 1. Tratamientos establecidos para estudiar el efecto de Bioformulados endófitos para el control de *Rhizoctonia solani* en Frijol bajo condiciones de invernadero

TRATAMIENTO	DOSIS EN 10 LTS. DE AGUA
T1. Rhizoctonia + Bioconsorcio 1	1×10^6
T2. Rhizoctonia + Bioconsorcio 2	1×10^7
T3. Bioconsorcio 1	1×10^6
T4. Bioconsorcio 2	1×10^7
T5. Rhizoctonia solani	1×10^6
T6. Sin inocular (agua)	--

La incidencia se determinó considerando el porcentaje de plantas enfermas y la severidad de acuerdo a la escala de Muyolo *et al.* (1993) para *R. solani*. También se midieron algunos parámetros agronómicos como altura de planta, diámetro de tallo y contenido de clorofila en las hojas medidas como unidades Spad (Fig. 7 y 8).



Figura 7. Medición de la altura de las plantas



Figura 8. Medición de clorofila

RESULTADOS

De acuerdo al estudio de la efectividad biológica de los bioformulados endófitos para el control de la marchites de plantas de frijol causada por *Rhizoctonia solani* bajo condiciones de invernadero y su efecto en el desarrollo de la planta, los resultados fueron los siguientes:

Incidencia y Severidad de la Enfermedad a los 30 días Después de la Siembra.

La incidencia de la enfermedad vario de 0% en los tratamientos 3, 4 y 6 a 78.57% en el tratamiento 1 (Tabla 2). La prueba de medias indica que la diferencia estadística observada en la incidencia de la enfermedad se presenta entre los tratamientos 1 y 2 y el tratamiento 5, contra los tratamientos a los que no se le inoculo este patógeno.

La severidad de la enfermedad en los tratamientos con síntomas fue de 4.29 en los tratamientos 1, 2 y 5 (Tabla 2).La diferencia estadística observada se aprecia entre los tratamientos 5 contra los tratamientos 3, 4 y 6. De acuerdo a los resultados obtenidos podemos indicar que los bioformulados no ejercen un control de la enfermedad.

Cuadro 2. Efecto de bioformulados endófitos en la incidencia y severidad de la enfermedad en plantas de frijol a los 30 días después de la siembra.

Tratamiento	Incidencia en %	Severidad
1. Bioformulado 1 + <i>Rhizoctonia solani</i>	78.57 A	4.29 A
2. Bioformulado 2 + <i>Rhizoctonia solani</i>	71.43 A	4.29 A
3. Bioformulado 1	0.00 B	0.00 B
4. Bioformulado 2	0.00 B	0.00 B
5. <i>Rhizoctonia solani</i>	71.43 A	4.29 A
6. Testigo Absoluto	0.00 B	0.00 B

Altura de Planta a los 30 días Después de la Siembra.

La altura de las plantas varió de 6.36 cm en el Tratamiento 1 a 59.21 cm en el Tratamiento 3 (Tabla 3). El análisis de varianza detectó diferencias entre los tratamientos. La prueba de medias indica que los tratamientos 3 y 6 muestran una altura de planta estadísticamente superior a los tratamientos con la inoculación de *Rhizoctonia solani*, afectando este hongo el crecimiento de la planta. Así mismo se puede indicar que los bioformulados no estimulan la altura de planta al ser similares estadísticamente al Testigo Absoluto.

Cuadro 3. Efecto de bioformulados endófitos en la altura de plantas de frijol a los 30 días después de la siembra.

Tratamiento	Altura de planta en cm
1. Bioformulado 1 + <i>Rhizoctonia solani</i>	6.36 B
2. Bioformulado 2 + <i>Rhizoctonia solani</i>	10.64 B
3. Bioformulado 1	59.21 A
4. Bioformulado 2	39.43 AB
5. <i>Rhizoctonia solani</i>	6.79 B
6. Testigo Absoluto	53.46 A

Diámetro de Tallo a los 30 días Después de la Siembra.

El diámetro de los tallos varió de 0.45 cm en el tratamiento 5 a 3.10 cm en el Tratamiento 4 (Tabla 4). Las diferencias estadísticas observadas indican que el diámetro del tallo de las plantas de los tratamientos 3 y 4 es estadísticamente superior a los Tratamientos que fueron inoculados con *Rhizoctonia solani*. Lo anterior implica que *Rhizoctonia solani* disminuye el diámetro del tallo de las plantas que

afecta y que ninguno de los Bioformulados 1 y 2 promueve un mayor diámetro de tallo en plantas de frijol.

Cuadro 4. Efecto de bioformulados endófitos en el diámetro de tallo de plantas de frijol a los 30 días después de la siembra.

Tratamiento	Diámetro de tallo en cm
1. Bioformulado 1 + <i>R. solani</i>	0.64B
2. Bioformulado 2 + <i>R. solani</i>	0.96 B
3. Bioformulado 1	2.98 A
4. Bioformulado 2	3.10 A
5. <i>Rhizoctonia</i>	0.45 B
6. Testigo Absoluto	2.54 A

Contenido de Clorofila de Planta a los 30 días Después de la Siembra.

El contenido de clorofila varió de 4.71 unidades en el tratamiento 5 a 29.34 unidades en el tratamiento 4 (Tabla 5). Las diferencias estadísticas observadas indican que el contenido de clorofila de las plantas de los tratamientos 3, 4 y 6 son estadísticamente superiores a los Tratamientos que llevan la inoculación de *Rhizoctonia*. Lo anterior implica que *Rhizoctonia* disminuye el contenido de clorofila de las plantas que afecta y que ninguno de los Bioformulados 1 y 2 promueve un mayor contenido de clorofila de la planta.

Cuadro 5. Efecto de bioformulados endófitos en el contenido de clorofila de plantas de frijol a los 30 días después de la siembra.

Tratamiento	Unidades SPAD
1. Bioformulado 1 + <i>Rhizoctonia solani</i>	6.67 B
2. Bioformulado 2 + <i>Rhizoctonia solani</i>	8.01 B
3. Bioformulado 1	29.14 A
4. Bioformulado 2	29.34 A
5. <i>Rhizoctonia</i>	4.71 B
6. Testigo Absoluto	26.89 A

Incidencia y Severidad de la Enfermedad a los 60 días Después de la Siembra.

La incidencia de la enfermedad varió de 0% en los tratamientos 3, 4 y 6 a 100% en los tratamientos 1, 2 y 5 (Tabla 6). La prueba de medias indica que la diferencia estadística observada en la incidencia de la enfermedad se presenta entre los tratamientos con el bioformulado 1 y 2 más *Rhizoctonia solani* y el testigo inoculado con este hongo, contra los tratamientos a los que no se le inoculo este patógeno.

La severidad de la enfermedad en los tratamientos con síntomas fue de 4.43, 4.14 y 4.71 en los tratamientos 1, 2 y 5 (Tabla 6). La diferencia estadística observada se aprecia entre los tratamientos con la inoculación de *Rhizoctonia solani* contra los tratamientos que no lleva el hongo. De acuerdo a los resultados obtenidos podemos indicar que los Bioformulados no ejercen un control de la enfermedad.

Cuadro 6. Efecto de bioformulados endófitos en la incidencia y severidad de la enfermedad en plantas de frijol a los 60 días después de la siembra.

Tratamiento	Incidencia en %	Severidad
1. Bioformulado 1 + <i>Rhizoctonia solani</i>	100 A	4.43 A
2. Bioformulado 2 + <i>Rhizoctonia solani</i>	100 A	4.14 A
3. Bioformulado 1	0.0 B	0.00 B
4. Bioformulado 2	0.0 B	0.00 B
5. <i>Rhizoctonia solani</i>	100 A	4.71 A
6. Testigo Absoluto	0.0 B	0.00 B

Altura de Planta a los 60 días Después de la Siembra.

La altura de las plantas varió de 0.0 cm en el Tratamiento 1 a 87.14cm en el Tratamiento 3 (Tabla 7). El análisis de varianza detectó diferencias entre los tratamientos. La prueba de medias indica que los tratamientos 3, 4 y 6 muestran una altura de planta estadísticamente superior a los tratamientos con la inoculación de *Rhizoctonia solani*, afectando este hongo el crecimiento de la planta. Así mismo se puede indicar que los Bioformulados 1 y 2 no estimulan la promoción de la altura de planta al ser similares estadísticamente al Testigo Absoluto.

Cuadro 7. Efecto de bioformulados endófitos en la altura de plantas de frijol a los 60 días después de la siembra.

Tratamiento	Altura de planta en cm
1. Bioformulado 1 + <i>Rhizoctonia solani</i>	0.00 B
2. Bioformulado 2 + <i>Rhizoctonia solani</i>	11.43 B
3. Bioformulado 1	87.14 A
4. Bioformulado 2	65.50 A
5. <i>Rhizoctonia solani</i>	10.86 B
6. Testigo Absoluto	74.71 A

Diámetro de Tallo de Planta a los 60 días Después de la Siembra.

El diámetro de los tallos osciló de 0.43 cm en el tratamiento 5 a 2.85 cm en el tratamiento 3 (Tabla 8). Las diferencias estadísticas observadas indican que el diámetro del tallo de las plantas de los tratamientos 3, 4 y 6 son estadísticamente superiores a los Tratamientos que llevan la inoculación de *Rhizoctonia solani*. Lo anterior implica que *Rhizoctonia solani* disminuye el diámetro de tallo de las plantas que afecta y que ninguno de los Bioformulados 1 y 2 tiene efecto en promover un mayor diámetro del tallo de la planta.

Cuadro 8. Efecto de Bioformulados endófitos en el diámetro del tallo de plantas de frijol a los 60 días después de la siembra.

Tratamiento	Diámetro de tallo en cm
1. Bioformulado 1 + <i>Rhizoctonia solani</i>	0.68 B
2. Bioformulado 2 + <i>Rhizoctonia solani</i>	0.93 B
3. Bioformulado 1	2.85 A
4. Bioformulado 2	2.83 A
5. <i>Rhizoctonia solani</i>	0.43 B
6. Testigo Absoluto	2.53 A

Contenido de Clorofila de Planta a los 60 días Después de la Siembra.

El contenido de la clorofila varió de 3.66 unidades en el tratamiento 5 a 28.99 unidades en el tratamiento 3 (Tabla 9). Las diferencias estadísticas observadas indican que el contenido de clorofila de las plantas de los tratamientos 3, 4 y 6 son estadísticamente superiores a los Tratamientos que llevan la inoculación de *Rhizoctonia solani*. Lo anterior implica que *Rhizoctonia solani* disminuye el contenido

de clorofila de las plantas que afecta y que ninguno de los Bioformulados 1 y 2 promueve un mayor contenido de clorofila de la planta.

Cuadro 9. Efecto de bioformulados endófitos en el contenido de clorofila de plantas de frijol a los 60 días después de la siembra.

Tratamiento	Unidades SPAD
1. Bioformulado 1 + <i>Rhizoctonia solani</i>	5.79 B
2. Bioformulado 2 + <i>Rhizoctonia solani</i>	7.69 B
3. Bioformulado 1	28.99 A
4. Bioformulado 2	25.04 A
5. <i>Rhizoctonia</i>	3.66 B
6. Testigo Absoluto	24.10 A

Peso seco de Raíz a los 60 días Después de la Siembra.

El peso seco de la raíz varió de 0.027g en el tratamiento 5 a 0.226g en el tratamiento 6 (Tabla 10). El análisis de varianza detectó diferencias significativas. El mayor peso de raíz obtenido, se presenta entre los tratamientos que no fueron inoculados con *Rhizoctonia solani* contra los que si se inocularon con este hongo. También observamos que no hay diferencia estadística entre los bioformulados y el Testigo Absoluto, por lo que podemos indicar que los bioformulados no tienen efecto en promover el desarrollo de las raíces.

Cuadro 10. Efecto de Bioformulados endófitos en el peso seco de la raíz de plantas de frijol a los 60 días después de la siembra.

Tratamiento	Peso seco en g
1. Bioformulado 1 + <i>Rhizoctonia solani</i>	0.037B
2. Bioformulado 2 + <i>Rhizoctonia solani</i>	0.055B
3. Bioformulado 1	0.212A
4. Bioformulado 2	0.193A
5. <i>Rhizoctonia solani</i>	0.027B
6. Testigo Absoluto	0.226 A

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos con la aplicación de los bioconsorcios a base de bacterias endófitas sobre el control de *Rhizoctonia solani* no fueron totalmente los esperados. En general, los bioconsorcios no tuvieron un 100 % de control sobre *R. solani*, pero si redujeron los síntomas de la enfermedad (Fig. 9). Dentro de los factores que pudieron haber influido en los resultados son: las condiciones ambientales no adecuadas para la interacción de estas bacterias en el cultivo de frijol, la especificidad del huésped, la dinámica poblacional, el patrón de colonización, la capacidad de moverse dentro de los tejidos del huésped, y la capacidad de inducir resistencia sistémica (Barka *et al.*, 2002). En nuestro trabajo los bioconsorcios a base de bacterias endófitas no causaron daños o síntomas visibles de enfermedad al cultivo del Frijol. En ese sentido, se señala que las bacterias endófitas actúan como asociaciones biológicas en los que los organismos colonizan tejidos internos vivos de las plantas, sin causar ningún efecto negativo inmediato o daño aparente a la planta (Bacon y White, 2000). Considerando los datos obtenidos a los 60 días después de la siembra el prototipo experimental bioformulado 1 incrementa en un 17.6, 12.6 y 20% la altura de planta, diámetro de tallo y clorofila de la planta respectivamente promoviendo un mejor desarrollo de plantas de frijol que el desarrollo obtenido en el testigo absoluto. Analizando los resultados de los tratamientos inoculados con *Rhizoctonia solani* el prototipo experimental bioformulado 1 incrementa en 58% el diámetro de tallo y el contenido de clorofila; lo anterior sugiere que las bacterias endófitas mejoran el vigor y desarrollo de las plantas enfermas. De manera general, las bacterias endófitas cumplen con varias funciones dentro de la planta, éstas incluyen la interacción con patógenos e incremento de la resistencia a enfermedades (Pérez *et al.*, 2009). Varios estudios también han sugerido que muchas asociaciones de endófitos no son neutrales en absoluto, sino que son beneficiosos para las plantas (Barka *et al.*, 2002; Bailey *et al.*, 2006). También se señala que las bacterias endófitas promueven el crecimiento de las plantas y contribuyen a la fijación biológica de nitrógeno como ha sido citado por diversos autores (Jiménez *et al.*, 1997). Estas bacterias poseen diferentes mecanismos para la promoción de crecimiento,

dentro de estos se incluyen: la actividad solubilizadora de fosfato, la producción de fitohormonas (fijación biológica de nitrógeno biosíntesis de sideróforos) y el suministro de nutrientes esenciales, entre otros (Puente et al., 2009).

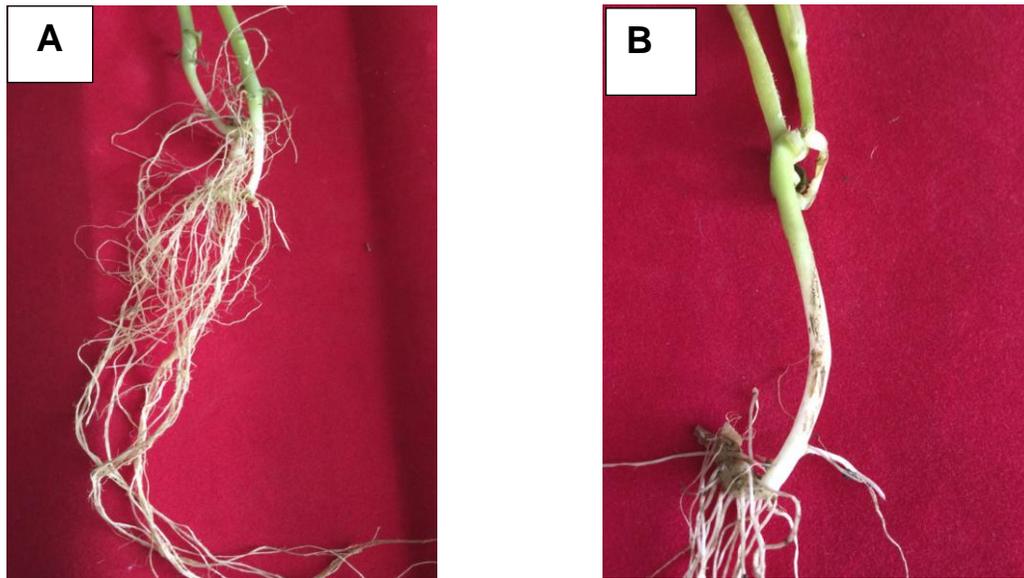


Figura 9. Planta con tallos sanos (A) y enfermos con daño mínimo (B).

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones experimentales en las que se desarrolló la presente investigación podemos concluir que: la altura de plantas, el diámetro de tallo, el contenido de clorofila y el peso seco de raíz, los prototipos experimentales, denominados Bioformulados de endófitos 1 y 2 si promueven un mayor desarrollo de plantas de frijol que el desarrollo obtenido en los tratamientos inoculados con *Rhizoctonia solani*.

Los prototipos experimentales, denominados Bioformulados de endófitos 1 y 2 no disminuyen la incidencia y severidad de *Rhizoctonia solani* en las plantas de frijol.

No fue posible medir el rendimiento debido a que al momento de la última evaluación aún no se formaban las vainas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- Agrios, G. 2004. Fitopatología. Editorial Limusa. Noriega Editores 838 pp.
- Álvarez, Z. R. y Delgadillo, S. F. 2004. Enfermedades el Tomate y chile Bell. Memorias del IV Simposio Nacional de Horticultura. Invernaderos: Diseño, Manejo y Producción. Torreón, Coahuila. 99 p.
- Bacon C.W., White J.F (2000). Microbial Endophytes. New York; Marcel Dekker Inc.; pag 243.
- Bacon, W.C., Hinton, D. M. 1997. Isolation and culture of endophytic bacteria and fungi. In: HURST, C. et al. (Eds.). Manual of environmental microbiology. P. 413-421.
- Barnett, H. Hunter, B. 1982. Illustrated genera of imperfect fungi. Third edition. Burgess publishing. Minneapolis, Minnesota. USA 241 pp.
- Berg G., Krechel A., Ditz M, Sikora A., Ulrich A., Hallmann J. 2005. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi, FEMS Microbiology Ecology 5:1215–229.
- Camargo, M. E. 1999. Efecto nematostático de un producto orgánico líquido en frijol (*Phaseolus vulgaris*) bajo condiciones de invernadero. Tesis licenciatura, UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Cardona, C 1989. Insects and other invertebrate bean pests in Latin America. In: Schwartz, H. F. and Pastor-Corrales, M. A. (eds). Bean production problems in the tropics 2 nd. Edition. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 505-507.
- Ceresini, P. 1999. *Rhizoctonia* spp pathogen Profile. Soilborne plant pathogens offered on spring *R. solani* on page 456-567
- Chanway C. 1998. Bacterial endophytes: ecological and practical implications. Sydowia. 50:149–170

- Danilo, E. N. 2011 El cultivo del frijol. Dirección de Ciencia y Tecnología Agropecuaria, Tegucigalpa, M.C.D. honduras, C. A. pag. 36.
- Demirci, E., Eken, C. y Dane, E. 2009. Biological control of *Rhizoctoniasolanion* potato by *Verticilliumbiguttatu*, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Atatürk University TR-25240, Erzurum, Turkey. pp. African Journal of Biotechnology: 8 (11) 2503-2507.
- Estrada P.Mavingui P.Cournoyer B. Fontaine F.Balandreau, J. Caballeromellado, J. 2002. A N₂-fixing endophyticBurkholderiasp. Associated with maize plants cultivated in Mexico. Canadian Journal of Microbiology.48: 285–294.
- FAO, 2010. Organización de las Naciones Unidas Para la Agricultura y la alimentación de granos
http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro09/Cap2_2.htm
- FIRA. 2001. Boletín informativo. El frijol en México competitividad y oportunidades de desarrollo. Núm. 316 Volumen XXXIII, 9a. Época Año XXX.
- Germaine k., keogh e., garcia-cabellos g., borremans b., van der lelie d., barac t., oeyen l., vangronsveld j., porteous moore f., moore e. r.b. , campbelcolin d. l , ryan d., owling d.n. 2004. colonisation of poplar trees by gfp expressing bacterial endophytes. fems microbiology ecology. v 48, 109–118.
- Gonzales, I. 1989. Introducción a la Fitopatología, servicio editorial UCA, San Jose de Costa Rica. Pag. 86-91
- Halfacre, R. G. And Barden J. A. 1992. Horticultura. AGT Editor, S.A México.Pag 134-137
- Hall H. 1991 compendium of Bean Diseases. Ed. APS Press. The AmericanPhytopathological Society: 4-32
- Hallmannj, Q. H. A.,Mahaffee, W.,Kloepper J. 1997.Bacterial endophytes in agricultural crops.Canadian Journal Microbiology. 43:895-914.

- Hernández, C. F. D., Lira, S. R. H., Cruz, C. L., Gallegos, M. G., Galindo, C. M. E., Padrón, C. E. y Hernández, S. M. 2008 a. Antifungal potential of *Bacillus* spp. strains and *Larreatridentata* extract against *Rhizoctonia solani* potato (*Solanum tuberosum* L.) crop. International Journal of experimental botany *Phyton* 77:241-252.
- Herandez, C. F. D. (2013) Weed and Pest Control conventional and New Challenges: First Published Process Manager.
- Hua W. Z., Youg, C.H.S. Ren, X.T. 2006. Biology and chemistry of endophytes. Natural Product Reports. 23, 753-771.
- Hirano S.; Hupper S. 2000. Bacteria in the leaf Ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* a pathogen, Ice nucleus and Epiphytes. Microbiology and Molecular Biology Review 64:624-653.
- Hurek, T., Reinhold-Hurek, B., Van M., Kellenberger, E. 1994. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. Strain BH72 in grasses. Journal of Bacteriology 176:1913-1923.
- Huang, J. 1991. Ultrastructure of bacterial penetration in plants Annual Review of Phytopathology 24:141-157
- Jiménez-Salgado, T., Fuentes-Ramírez L., Tapia-Hernández A., Mascarua-Esparza, M., Martínez-Romero E., Caballero-Mellado, J. 1997. Coffee arabica, a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. Applied Environmental Microbiology: 3676-3683. <http://aem.asm.org/content/63/9/3676.abstract>.
- Khammas K.; Kaiser P. 1991. Characterization of a pectinolytic activity in *Azospirillum irakense*. Plant Soil. 137:75-79. <http://www.springerlink.com/content/g9462u14p81t56n8/>.
- Kloepper J.; Schippers B.; Bakker P. 1992. Proposed limitation of the term endorhizosphere. Phytopathology. 82:726-727.

http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1992Articles/phyto82n07_726.pdf.

- Long H., Furuya N., Kurose D., Takeshita M., Takanami, Y. 2003. Isolation of endophytic bacteria from *Solanum* sp. And their antibacterial activity against plant pathogenic bacteria. *Journal of the Faculty of Agriculture*. 48: 21–28.
- López, Y., Pineda, J., Hernández, A. y Dilcia, U. 2009. Efecto diferencial de seis aislamientos de *Trichoderma* sobre la severidad de *Rhizoctonia solani*, desarrollo radical y crecimiento de plantas de maíz. *Universidad Centro Occidental de Venezuela. Bioagro*. 22: 37-42.
- Reinhold-Hoker B, Hurek T. 1998. Interactions of Grameneous plant with *Azoarcus* spp., and other diazotrophic, identification, localization and perspective to study their function. *C Rev Plant Sci*;17:29-54
- Rollán, M., Mónaco, C. Lampugnani, G. y Arteta, N. 1998. Variación de la población de hongos antagonistas de *Sclerotinia sclerotiorum* en el suelo por la aplicación de agroquímicos, p 27 en Primer congreso argentino de control biológico de enfermedades de plantas. Acta de resúmenes. Universidad de Buenos Aires, Secretaría de Agricultura, Ganadería y pesca. Buenos Aires, Argentina
- Macculley M. 2002. Niches for bacterium endophytes in crop plants: A plant Biologists view. *Australian Journal of plant Physiology*. 28:983-990. <http://www.publish.csiro.au/paper/PP01101.htm>.
- Martínez, G., M. A., E. S. Osuna C., J. S. Padilla R., J. A. Acosta G. y C. Ioredó O., 2008. Tecnología para la producción de frijol en el Norte centro de México. Libro Técnico No. 4. Campo Experimental San Luis CIRNE-INIFAP: 206.
- Martinson, A. C. and Rehiyani, S.M. 1991. Suppression of *Rhizoctonia solani* in soil with animal manures. *Phytopathology* 81(10):1241.

- Meza, M. A. 1995. Evaluación de los ácidos húmicos (Humiplex plus) a diferentes dosis en el cultivo del frijol ejotero (*Phaseolus vulgaris*L.), en Buenavista, Saltillo. Tesis. Licenciatura. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Mena, C. J. y R. V. Velázquez. 2010. Manejo integrado de plagas y enfermedades de frijol en Zacatecas. Folleto Técnico No.24. Campo Experimental Zacatecas. CIRONOC-INIFAP: 83.
- Mojica, M. V., Luna, O. H. A., Sandoval, C. C. F., Pereyra, A. B., Morales, R. L. H., González, A. N. A., Hernández, L. C .E. and Alvarado, G. O. G .2009. Biological control of chili pepper root rot (*Capsicum annum*L.) by *Bacillus thuringiensis*. International journal of Botany Experimental YTON. 78: 105-110.
- Montes-Belmont, R., Domingo P. M. y Cruz C. V. 1990. Control de la roya del frijol mediante extractos vegetales, bajo condiciones de campo en Santa Cruz Xoxocotlan, Oaxaca. Sociedad Mexicana de Fitopatología "Memorias del XII Congreso Nacional de Fitopatología". Culiacan, Sinaloa, México.
- Newman L.; Reynolds, C. 2005. Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants. Trends in Biotechnology.23 (1): 6-8.<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779904003270>.
- Padilla V. I., N. Castillo T., J. A. Ramírez A., I. Armenta C., F. Cabrera C., M. Madrid C., J. E. Ortiz E. 2009. Manual para la producción de frijol en el sur de Sonora. Folleto Técnico No. 69. Campo Experimental Valle del Yaqui. CIRNI-INIFAP: 122.
- Paredes, T. A. 1989. Producción de papa en el cofre de perote. Síntesis hortícola. 3(7): 26-33.
- Parsons, D. B. 1981. Manual de educación agropecuaria, frijol y chícharo. Primera Edición. Editorial SEP-Trillas, México.
- Pérez, M., Duran, O. L. J., Ramírez, M. R., Sánchez, P. J. R. y Olalde, P. V. 2004. Sensibilidad *in vitro* de Aislados del Hongo *Phytophthora capsicia* fungicidas. Memorias Convención mundial del chile. León, Guanajuato. Resumen. pp 144-150.

- Quadt-Hallmanna.; Benhamou N.; Kloepper J. 1997. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. *Canadian Journal of Microbiology*.43:577-582.<http://www.bashanfoundation.org/kloepper/kloepperentering.pdf>.
- Ruiz, C. M., Calleros, G. V., Estrella, H. A., y Portugal, O. V. 2001, Introducción de agentes de control biológico de *Rhizoctoniasolanien* suelos solarizados o encalados en condiciones de invernadero. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*. 59: 10 - 14.
- Sánchez V. I., Acosta G. J. A., Ibarra P. F. J., Rosales S. R., Singh S. P. Registration of pinto Saltillo common vean. *Crop Sci.* 2004; 44: 1865-1866.
- Sakiyama C., Paula E., Pereira P., BorgesA.,Silva D. 2001. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries.*Letter in Applied Microbiology*.333. p. 117- 121.<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1472-765x.2001.00961.x/pdf>.
- Seaman A., M. Kirkwyland y E. Thomas. 2012. Production guide for organic snap beans for processing. New York State Departament of Agriculture and Markets. NYS IPM Publication No. 132: 50.
- Secretaria de Economía (SE). Análisis de la cadena de valor del frijol. Dirección General de Industrias Básicas. 2012.
- SESSITSCH. A.,Reiter B.,Pfeifer U., Wilhelm E. 2002. Cultivationindependent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology*. 39:23-32. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00903.x/pdf>.
- Soria, R. M. 2000. Efecto nematostatico de un producto orgánico liquido en el cultivo del frijol (*Phaseolusvulgaris*) bajo condiciones de campo. Tesis. Licenciatura. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila. México.
- Schulte, G. E., Schüler, C., Hensel, O., Jürgen, H., Finckh, M. R. and Christian, B. C. 2008. Control of *Rhizoctoniasolanian* in potatoes with a new application technique of suppressive composts in organic potato production, Compost and digestate:

sustainability, benefits, impacts for the environment and for plant production International. Congress, CH-Solothurn 27th – 29th February. Pp 116-122.

Shiomi H.,Alves s.,Soares, I., Vieira, F., Wagner, B.2006.BioprospectingEndophytic Bacteria for Biological Control of Coffee leaf rust.Sci. Agric. 63(1): 32. 39.<http://www.scielo.br/pdf/sa/v63n1/27900.pdf>.

Sneh, B. Burpee, L., and Ogoshi, A. 1991. Identificaciones of Rhizoctonia species APS press. USA

Strobel, G., Daisy, B. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. Microbiology and Molecular Biology Reviews 67(4):491– 502

Tan R.,Zou X. 2001.Endophytes: A Rich source functional de metabolites. Nature Products.18:448 -459.

Tsavkelova E.,Cherdyntseva T.,Botina S.,Netrusov A., 2007. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. Microbiological Research. 162: 69-76.