



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MEXICO**  
**CENTRO UNIVERSITARIO UAEM ZUMPANGO**  
**INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN**



---

---

**“BIOCONTROL *in vitro* DE *Rhizoctonia* spp. CON *Trichoderma* spp. Y  
BACTERIAS DE POTENCIAL ANTAGÓNICO, PARA UN POSTERIOR USO EN  
LECHUGA (*Lactuca sativa* L.)”**

**TESIS**

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO

DE:

**INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN**

**P R E S E N T A:**

**MARCOS JULIAN VELÁZQUEZ OROPEZA**

ASESOR

**DRA. ELIZABETH URBINA SÁNCHEZ.**

Zumpango, Estado de México, Agosto de 2013.

## **AGRADECIMIENTOS**

**A la Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario UAEM Zumpango**, por haberme ofrecido todas las facilidades para poder alcanzar una de mis mayores metas.

**Colegio de Postgraduados Campus Montecillo**, por permitirme el uso de sus instalaciones para la realización de la presente tesis.

**Dra. Elizabeth Urbina Sánchez** (Asesor interno), por el tiempo dedicado a este trabajo, sus consejos y darme la oportunidad de trabajar con usted.

**M. en C. María Encarnación Lara Hernández** (Asesor externo), por su gran apoyo en la realización de este trabajo en las observaciones, recomendaciones y conocimientos compartidos.

**Ing. Hermilo De la O Ávila** (revisor), por sus valiosas aportaciones en la revisión de esta tesis, además de sus enseñanzas y por brindarme su amistad.

**Profesores de Licenciatura Ing. Agrónomo en Producción**, por todos sus conocimientos adquiridos durante mi formación profesional además de su amistad.

**Compañeros y amigos**, en especial a la **M. en C. Susana Martínez Martínez** y a la **Ing. Isela Torres**, al **Dr. Ronald, Alejandro, Juan José y Julián**, amigos **Petrita, Yair, Eliseo, Cristina, Vivian, Brigsania, Deisy, Mariela y Miguel** a los **Srs. Mundo, Fernando, Lorenzo y Manuel**, que me ayudaron en la realización de este proyecto, por brindarme su amistad, compañía y compartir parte de su tiempo conmigo.

**Generación 2007-2012.** Compartimos 5 años de nuestras vidas, en los que pasamos dificultades, tristezas; pero también alegrías y porque más que compañeros fuimos cómplices de nuestro camino.

## DEDICATORIA

A **Dios**, por llenar mi vida de dicha y bendiciones; El verdadero amigo no tiene precio. Puedes confiar en él. Se le conoce en los momentos difíciles de la prueba: está contigo en las buenas y en las malas. Un amigo verdadero es un tesoro, un refugio, medicina en los dolores de la vida. Pero la nuestra es frágil. Sólo Jesús no falla: siempre está dispuesto a dar la vida por nosotros.

A mis padres: **Carmela Oropeza Rendón y Francisco Velázquez Montaña** a quien agradezco su apoyo, amor, cariño, comprensión y porque son un ejemplo de superación constante.

A mis hermanos: **Maricela, Juan Francisco, Carlos Enrique, José Antonio, Esperanza Janet y Dolores Aidé**. Porque hemos compartido el dolor, la tristeza pero también la dicha, alegría y felicidad, gracias a Dios por formar parte de mi vida.

A mis familiares; **Abuelos, tíos y primos** así mismo a mis cuñados **Guadalupe, Rebeca, Hugo y Alberto**, además de los pequeños que llenan nuestra vida de alegría mis sobrinos; **Lisandro Aldair, Dilan, Valeria Betsabé, Carmen Arantza y Luis Francisco** por compartir su existir con mi persona además de sus palabras para seguir adelante.

## INDICE

|   |     |
|---|-----|
| <b>INDICE DE CUADROS</b> .....  | v   |
| <b>INDICE DE FIGURAS</b> .....  | vii |
| <b>RESUMEN</b> .....  | ix  |
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....  | 1   |
| <b>II. OBJETIVOS</b> .....  | 3   |
| 2.1 Objetivo general.....   | 3   |
| 2.2 Objetivos específicos.....  | 3   |
| <b>III. HIPOTESIS</b> .....   | 4   |
| <b>IV. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....                                     | 5   |
| 4.1 Lechuga ( <i>Lactuca sativa</i> L).....                                 | 5   |
| 4.1.1 Origen.....   | 5   |
| 4.1.2 Taxonomía.....  | 5   |
| 4.1.3 Importancia del cultivo.....  | 6   |
| 4.1.3.1 Producción.....   | 6   |
| 4.1.3.2 Importancia socioeconómica.....                                     | 7   |
| 4.1.3.3 Problemas fitosanitarios.....                                       | 8   |
| 4.2. <i>Rhizoctonia</i> spp.....  | 9   |
| 4.2.1 Taxonomía.....  | 10  |
| 4.2.2 Morfología.....   | 10  |
| 4.2.3 Síntoma.....  | 11  |
| 4.2.4 Ciclo de vida y epidemiología.....                                    | 12  |
| 4.3 Control biológico.....  | 13  |
| 4.3.1 Agentes microbianos empleados en el biocontrol.....                   | 14  |
| 4.3.2 Bacterias como agentes de biocontrol.....                             | 14  |
| 4.3.3 Hongos como agentes de biocontrol.....                                | 15  |
| 4.3.3.1 <i>Trichoderma</i> spp.....   | 16  |
| 4.3.3.2 Taxonomía.....  | 17  |
| 4.3.3.3 Morfología.....   | 17  |
| 4.4 Mecanismos de acción.....   | 18  |
| 4.4.1 Micoparasitismo.....  | 18  |
| 4.4.2 Secreción de enzimas.....   | 19  |
| 4.4.3 Competencia.....  | 19  |
| 4.4.4 Antibiosis.....   | 20  |
| 4.4.5. Resistencia inducida en plantas.....                                 | 20  |
| 4.5 Uso de microorganismos en el control de enfermedades.....               | 21  |
| 4.5.1 Control biológico <i>in vitro</i> .....                               | 21  |
| 4.5.2 Aplicación comercial del control biológico.....                       | 24  |
| <b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....  | 32  |
| 5.1 Localización.....   | 32  |
| 5.2 Cepas patógenas y antagónicas involucradas en el control biológico..... | 32  |
| 5.2.1 Activación de las cepas involucradas en el biocontrol.....            | 32  |
| 5.2.2 Preservación de las cepas utilizadas en el control biológico.....     | 33  |

|  |           |
|--|-----------|
| 5.3 Caracterización macro y microscópica de los agentes involucrados en el control biológico.....  | 33        |
| 5.3.1 Características macroscópicas de las cepas involucradas en el biocontrol.....  | 33        |
| 5.3.2. Características microscópicas de las cepas involucradas en el biocontrol.....   | 34        |
| 5.4 Descripción de experimentos.....   | 35        |
| 5.4.1 Experimento 1. Confrontación <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> spp. vs <i>Rhizoctonia</i> spp. cepa (R2).....  | 36        |
| 5.4.2 Experimento 2. Confrontación <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> spp. vs <i>Rhizoctonia</i> spp., cepa (R5).....                                       | 37        |
| 5.4.3 Experimento 3. Enfrentamiento <i>in vitro</i> de seis cepas bacterias con potencial antagonico vs <i>Rhizoctonia</i> spp., cepas (R2 y R5).....          | 38        |
| 5.4.4 Experimento 4. Enfrentamiento <i>in vitro</i> de tres cepas bacterias antagonicas vs <i>Rhizoctonia</i> spp. cepas (R3, R4 y R6).....                    | 39        |
| 5.4.5 Experimento 5. Enfrentamiento <i>in vitro</i> de <i>Rhizoctonia</i> spp. vs cepas bacterianas antagonicas, dispuestas una semana antes del patógeno..... | 40        |
| 5.4.6 Experimento 6. Enfrentamiento <i>in vitro</i> de <i>Rhizoctonia</i> spp. vs cepas bacterianas antagonicas, dispuestas a un mes antes del patógeno.....   | 41        |
| <b>VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>   | <b>42</b> |
| 6.1 Caracterización de las cepas involucradas en el biocontrol.....  | 42        |
| 6.1.1 Caracterización macroscópica de las cepas involucradas en el biocontrol.....   | 42        |
| 6.1.2 Caracterización microscópica de las cepas involucradas en el biocontrol.....   | 47        |
| 6.2. Control <i>in vitro</i> de <i>Rhizoctonia</i> spp.....  | 51        |
| 6.2.1 Experimento 1. Confrontación <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> spp. vs <i>Rhizoctonia</i> spp. cepa (R2) .....                                       | 51        |
| 6.2.2 Experimento 2. Confrontación <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> spp. vs <i>Rhizoctonia</i> spp., cepa (R5) .....                                      | 57        |
| 6.2.3 Experimento 3. Enfrentamiento <i>in vitro</i> de ocho cepas bacterias con potencial antagonico vs <i>Rhizoctonia</i> spp., cepas (R2 y R5).....          | 63        |
| 6.2.4 Experimento 4. Enfrentamiento <i>in vitro</i> de tres cepas bacterianas antagonicas vs <i>Rhizoctonia</i> spp., cepas (R3, R4 y R6).....                 | 67        |
| 6.2.5 Experimento 5. Enfrentamiento <i>in vitro</i> de <i>Rhizoctonia</i> spp. vs cepas bacterianas antagonicas, dispuestas una semana antes del patógeno..... | 71        |
| 6.2.6 Experimento 6. Enfrentamiento <i>in vitro</i> de <i>Rhizoctonia</i> spp. vs cepas bacterianas antagonicas, dispuestas a un mes antes del patógeno.....   | 76        |
| <b>VII. CONCLUSIONES.....</b>  | <b>80</b> |
| <b>VIII. RECOMENDACIONES.....</b>  | <b>82</b> |
| <b>IX. REFERENCIAS.....</b>  | <b>83</b> |

|                                |           |
|--------------------------------|-----------|
| 9.1 Bibliográficas.....        | 83        |
| 9.2 Electrónicas.....          | 92        |
| <b>X. ANEXO.....</b>           | <b>93</b> |
| 10.1 Análisis de varianza..... | 94        |
| 10.1.1 Experimento 1.....      | 94        |
| 10.1.2 Experimento 2.....      | 95        |
| 10.1.3 Experimento 3.....      | 96        |
| 10.1.4 Experimento 4.....      | 97        |
| 10.1.5 Experimento 5.....      | 97        |
| 10.1.6 Experimento 6.....      | 98        |

## ÍNDICE DE CUADROS

|   | Pág. |
|---|------|
| <b>Cuadro 1.</b> Principales estados productores del cultivo de lechuga ciclo agrícola 2011.....  | 7    |
| <b>Cuadro 2</b> Características macroscópicas de <i>Rhizoctonia</i> spp., 9 días después de su siembra descritas bajo la metodología de Ramírez <i>et al.</i> (1998).....   | 43   |
| <b>Cuadro 3.</b> Características macroscópicas de cinco cepas de <i>Trichoderma</i> spp., 2 días después de su siembra bajo la metodología de Ramírez <i>et al.</i> (1998).....   | 44   |
| <b>Cuadro 4.</b> Características macroscópicas de las cepas bacterianas con potencial antagónico empleadas en el estudio de biocontrol, 5 días después de su siembra bajo la metodología de Ramírez <i>et al.</i> , (1998)..... | 46   |
| <b>Cuadro 5.</b> Caracterización microscópica del conjunto de cepas bacterianas con potencial antagónico.....   | 50   |
| <b>Cuadro 6.</b> Efecto antagónico de <i>Trichoderma</i> spp. sobre el crecimiento micelial de <i>Rhizoctonia</i> spp., en cultivos duales.....   | 53   |
| <b>Cuadro 7.</b> Crecimiento radial de <i>Rhizoctonia</i> spp. en cultivos duales en presencia de diferentes cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....   | 54   |
| <b>Cuadro 8.</b> Efecto antagónico de <i>Trichoderma</i> spp., sobre el crecimiento micelial de <i>Rhizoctonia</i> spp. a través de bioensayos.....   | 59   |
| <b>Cuadro 9.</b> Crecimiento radial de <i>Rhizoctonia</i> spp. en cultivos duales en presencia de diferentes cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....   | 60   |
| <b>Cuadro 10.</b> Inhibición del crecimiento micelial de <i>Rhizoctonia</i> spp. por cepas bacterianas en cultivos duales.....  | 64   |
| <b>Cuadro 11.</b> Crecimiento radial de <i>Rhizoctonia</i> spp. en presencia de diferentes cepas bacterianas a través de bioensayos.....  | 65   |
| <b>Cuadro 12.</b> Efecto de inhibición de las cepas bacterianas sobre el crecimiento micelial de <i>Rhizoctonia</i> spp.....  | 68   |
| <b>Cuadro 13.</b> Crecimiento radial de <i>Rhizoctonia</i> spp. en cultivos duales en presencia de diferentes cepas bacterianas.....  | 69   |



|  |    |
|--|----|
| <b>Cuadro 14.</b> Efecto de inhibición de las cepas bacterianas en el crecimiento micelial de <i>Rhizoctonia</i> spp.....                | 72 |
| <b>Cuadro 15.</b> Crecimiento radial de <i>Rhizoctonia</i> spp. a través de bioensayos en presencia de diferentes cepas bacterianas..... | 74 |
| <b>Cuadro 16.</b> Capacidad de inhibición de las cepas bacterianas en el crecimiento micelial de <i>Rhizoctonia</i> spp.....             | 77 |
| <b>Cuadro 17.</b> Crecimiento radial de <i>Rhizoctonia</i> spp. en cultivos duales en presencia de diferentes cepas bacterianas.....     | 78 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   | Pág. |
|---|------|
| <b>Figura 1</b> Morfología de <i>Rhizoctonia</i> spp., durante la etapa juvenil presenta tonalidades claras cepa R2, (izquierda), a través del tiempo contrasta a pigmentación oscura cepa R3 (derecha).....  | 43   |
| <b>Figura 2</b> Morfología de <i>Trichoderma</i> spp., cepa 39 mostrando su característica coloración verde en la zona de madurez y blanco en el área de crecimiento, además de su típico crecimiento concéntrico.....  | 45   |
| <b>Figura 3.</b> Morfología de cepa bacteriana con potencial antagónico (P61), mostrando su típica pigmentación café-amarillo, bajo la técnica de estriado para su siembra.....   | 46   |
| <b>Figura 4.</b> Características microscópicas de <i>Rhizoctonia</i> spp. observadas al microscopio óptico y estereoscópico. Micelio septado y ramificación en ángulo recto, estructura típica del patógeno (izquierda) a 10 X; micelio maduro con pigmentación oscura, además de formación de estructura de resistencia (esclerocio) observada al Microscopio estereoscópico (derecha).....                                | 48   |
| <b>Figura 5.</b> Características microscópicas de <i>Trichoderma</i> spp. A la izquierda, se observa un conidióforo sosteniendo a las fialides, además de las conidias (esporas). A la derecha, la aguja señala una clamidospora intercalar observada a 10 X.....   | 49   |
| <b>Figura 6.</b> Bioensayos de antagonismos <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>Rhizoctonia</i> spp. Se puede observar que el antagonista ejerció actividad de biocontrol por encima del testigo, sobrecreciendo en su área de acción al inhibir el avance de crecimiento de la colonia del patógeno debido a la secreción de sustancias (antibióticos y enzimas) para dar lugar al micoparasitismo..... | 56   |
| <b>Figura 7.</b> Capacidad antagónica de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Rhizoctonia</i> spp. al inhibir el crecimiento del patógeno en comparación con el testigo, atribuido a la secreción de sustancias antifúngicas (enzimas y antibióticos) permitiendo sobrecrecer y esporular en su campo de acción seguido de la actividad del micoparasitismo.....  | 62   |
| <b>Figura 8.</b> Enfrentamiento <i>in vitro</i> de cepas bacterianas sobre <i>Rhizoctonia</i> spp., al inhibir el crecimiento miceliar, debido a la producción de sustancias tóxicas (antibiosis), que al difundirse a través del medio de cultivo, frenaron el crecimiento del patógeno en comparación con el testigo.....   | 66   |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 9.</b> Bioensayos <i>in vitro</i> de cepas bacterianas sobre <i>Rhizoctonia</i> spp., al inhibir el crecimiento miceliar, debido a la acción de antibiosis (producción de metabolitos), que al difundirse sobre el medio de cultivo, frenaron el desarrollo del patógeno en comparación con el testigo..... | 70 |
| <b>Figura 10.</b> Fenómeno de biocontrol <i>in vitro</i> de cepas bacterianas sobre <i>Rhizoctonia</i> spp., ejercido por la producción de sustancias antifúngicas (antibiosis), al inhibir el desarrollo del patógeno en comparación con el testigo.....   | 75 |
| <b>Figura 11.</b> Confrontación de <i>Rhizoctonia</i> spp con cepas bacterianas a través de bioensayos <i>in vitro</i> , al inhibir el crecimiento del patógeno, debido a la producción de sustancias antifúngicas (antibiosis), en comparación con el testigo.....   | 79 |

## RESUMEN

*Rhizoctonia* spp es un hongo fitopatógeno del suelo con amplia distribución geográfica, afecta a la mayoría de cultivos en cualquier etapa de crecimiento, el daño más evidente se presenta en pre y post emergencia precursor de la enfermedad conocida como “Dampig off” (ahogamiento), bajo condiciones de invernadero y campo. Como alternativa al control de este fitopatógeno se probó la eficiencia bajo condiciones *in vitro* de cinco cepas de *Trichoderma* spp., además de seis cepas bacterianas con potencial antagónico, se utilizaron los medios de cultivo Papa-Dextrosa-Agar para el desarrollo de hongos y para las bacterias Agar Nutritivo, para su posterior caracterización macro y microscópicas.

El objetivo fue evaluar a nivel *in vitro* el efecto de biocontrol de *Trichoderma* spp. y bacterias antagónicas sobre *Rhizoctonia* spp. Se contemplaron seis bioensayos completamente al azar bajo la técnica de cultivos duales, los dos primeros involucraron a los agentes fúngicos; cepas (R39, R40, R41, R44 y GT5) de *Trichoderma* spp. sobre cepas (R2 y R5) de *Rhizoctonia* spp., todas las cepas mostraron efecto de biocontrol frente al patógeno, al inhibir el crecimiento micelial atribuido a la elaboración de sustancias (antibióticos y enzimas) antecedidas al micoparasitismo, al sobrecrecer y esporular en su campo de acción del patógeno, quedando reducido su desarrollo micelial al momento del contacto físico con el antagonista.

En una primera confrontación se emplearon las cepas bacterianas; A46, P14, P23, P61, R11, R44, BSP1.1 y OLS-SF3, establecidas tres días antes que el patógeno (R2 y R5), de las cuales A46, P61 y OLS-SF3 mostraron efecto de biocontrol,

tiempo después fueron enfrentadas con las cepas (R3, R4 y R6) de *Rhizoctonia* spp., al corroborar su potencial antagónico. Posteriormente se realizaron dos enfrentamientos de las cepas antagonistas frente R2 y R5 del patógeno probando tiempos diferentes 7 y 30 días de ventaja de las bacterias sobre el patógeno. El fenómeno de biocontrol se debió al tiempo de pre-establecimiento del agente antagónico atribuido a la producción de sustancias tóxicas (antibióticos) que al difundirse a través del medio de cultivo inhibieron el crecimiento micelial del patógeno.

## I. INTRODUCCIÓN

*Rhizoctonia spp.*, (teleomorfo: *Thanatephorus spp.*), es un fitopatógeno cosmopolita (Ohkura *et al.*, 2009), con una amplia gama de hospedantes. Daña a plantas en todas las etapas de crecimiento (Garibaldi *et al.*, 1997) tanto en invernadero como en campo. Origina pudrición durante la germinación (Tomaso-Peterson y Trevathan, 2007), en pre y post-emergencia (precursor de damping-off) y en plántulas recién transplantadas (Keinath y Farnham, 1997; Khangura *et al.*, 1999; Dorrance *et al.*, 2003).

El principal método de control es el químico, que además de su elevado costo el uso continuo de estos productos provoca el decremento de la sensibilidad del fitopatógeno y genera resistencia (Smith *et al.*, 1991; Jacome y Schuh 1992; Chitrampalam *et al.*, 2008; Pusey *et al.*, 2008; López *et al.*, 2010), además de los efectos negativos sobre el ambiente y problemas en la salud humana (Heungens y Parke, 2001; Khan *et al.*, 2001; García-Velasco *et al.*, 2005; Bautista, 2006; Torres *et al.*, 2008; Sánchez y Rebolledo, 2010).

Una alternativa al uso de productos químicos para el control de enfermedades de plantas es el control biológico (Milus, y Rothrock, 1997; Elad y Capat, 1999; Castillo-Fabela *et al.*, 2001; Tian *et al.*, 2002), que se basa en la utilización de microorganismos benéficos para atenuar el daño de patógenos; estos promueven un equilibrio entre las poblaciones sin causar daño al medio ambiente u organismos superiores (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2007). Suprimen a los patógenos por medio de diversos mecanismos de acción: antibiosis, competencia,

resistencia inducida, producción de enzimas y parasitismo (Howel, 2003 y 2005).

Los principales microorganismos con potencial antagónico a *Rhizoctonia* spp. son:

*Fusarium* spp, *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp, *Pseudomonas fluorescens*,

*Burkholderia cepacia* (Larkin y Fravel, 1998) y *Rhizoctonia binucleadas* (BNR por

su siglas en ingles) (Burns y Benson, 2000; Hwang y Benson, 2002).

## II. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general:

- Evaluar a nivel *in vitro* el efecto de biocontrol de *Trichoderma* spp. y bacterias antagónicas sobre *Rhizoctonia* spp.

### 2.2 Objetivos específicos:

- Identificar características macro y microscópicas de los organismos involucrados en el biocontrol (*Rhizoctonia* spp., *Trichoderma* spp. y bacterias antagónicas).
- Evaluación *in vitro* de *Trichoderma* spp. y bacterias antagónicas sobre *Rhizoctonia* spp.



### III. HIPOTESIS

- Bajo condiciones *in vitro* las cepas de *Trichoderma* spp. y bacterianas mostraran potencial antagónico, al inhibir el crecimiento micelial del patógeno *Rhizoctonia* spp.

## IV. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1 Lechuga (*Lactuca sativa* L.)

La lechuga es un vegetal fundamental en la dieta humana ya que puede ser utilizada en todo tipo de comida. Su demanda en el mercado obedece a sus características nutritivas y equilibrio orgánico, además de ser un buen abastecedor de vitaminas, minerales y sales indispensables para el organismo (Maroto, 2002).

#### 4.1.1 Origen

El origen de la lechuga había que situarlo en el Cercano Oriente, hoy en día los botánicos no se ponen de acuerdo al respecto, por existir un seguro antecesor *Lactuca scariola* L., que puede encontrarse en estado silvestre en la mayor parte de las áreas templadas (Maroto, 1989, 2002).

#### 4.1.2 Taxonomía (Maroto, 2002)

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Compositae

Género: *Lactuca*

Especie: *sativa* L.

### 4.1.3 Importancia del cultivo

#### 4.1.3.1 Producción

Con base a las cifras de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (2012), México ocupa el décimo lugar como productor de lechuga, precedido por China, Estados Unidos, India, Italia, España, Japón, Irán, Francia y Turquía.

La producción agrícola nacional correspondiente a los ciclos otoño- invierno y primavera-verano del año 2011, bajo la modalidad de riego y temporal los estados con mayor producción son: Guanajuato, Zacatecas, Puebla, Aguascalientes, Baja California y Querétaro (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Principales estados productores del cultivo de lechuga ciclo agrícola 2011.

| <b>Estado</b>    | <b>Sup. Sembrada (T)</b> | <b>Rendimiento (Ton/Ha)</b> | <b>Producción (Ton.)</b> |
|------------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| Guanajuato       | 4,828.51                 | 15.78                       | 75,835.85                |
| Zacatecas        | 3,629.00                 | 20.88                       | 75,789.00                |
| Puebla           | 2,961.26                 | 18.28                       | 51,546.28                |
| Aguas Calientes  | 1,151.00                 | 33.44                       | 38,495.00                |
| Baja California  | 2,098.55                 | 18.1                        | 37,593.91                |
| Querétaro        | 740.00                   | 32.38                       | 23,960.00                |
| Michoacán        | 623.00                   | 24.72                       | 15,398.13                |
| Sonora           | 520.30                   | 24.8                        | 12,855.20                |
| San Luis Potosí  | 354.00                   | 31.64                       | 11,202.46                |
| Edo. de México   | 768.90                   | 12.89                       | 7,654.81                 |
| Jalisco          | 334.50                   | 20.64                       | 6,903.30                 |
| Tlaxcala         | 244.00                   | 23.94                       | 5,841.30                 |
| Hidalgo          | 252.00                   | 16.24                       | 4,092.00                 |
| Distrito Federal | 90.00                    | 12.05                       | 1,034.20                 |
| Durango          | 70.50                    | 14.8                        | 910.37                   |
| Veracruz         | 40.00                    | 10.5                        | 420.00                   |

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2012).

#### 4.1.3.2 Importancia socioeconómica

La lechuga se encuentra en cualquier época del año. La conciencia que existe por mantener la salud a través del mayor consumo de vegetales y frutas, ha provocado un mayor consumo de éstas, como es el caso de la lechuga, que por lo que toca a México, ha crecido constantemente en el campo de las exportaciones de este producto, principalmente a Estados Unidos (SIAP, 2012).

#### 4.1.3.3 Problemas fitosanitarios

El cultivo de lechuga enfrenta una serie de limitantes a lo largo de su desarrollo, de las cuales las plagas y enfermedades son unas de las principales, ocasionando pérdidas en rendimiento y calidad (Maroto, 1989 y 2002)

Entre las plagas más relevantes destacan las larvas de lepidópteros comedoras de hojas (*Plusia gamma* L., *Laphygma exigua* Hb y *Spodoptera littoralis* Boisduval., gusanos grises (*Agrotis* sp.), mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum* Westw), pulgones diversos (*Myzus persicae* Sulz, *Macrosiphum solani* Kittel, *Nasonovia ribisnigri* (Mosley), gusanos de alambre (*Agriotes* spp.), minadores de hojas (*Liriomyza trifolii* Burg, *Liriomyza huidobresis* Blanchard), tisanópteros (*Frankliniella occidentalis* Pergande), caracoles y babosas (Maroto, 1989 y 2002). En lo referente a enfermedades causantes de pérdidas en la lechuga se encuentran los nematodos, bacterias, virus y hongos.

*Meloidogyne* spp., *Longidorus africanus*, *Pratylenchus penetrans* y *Rotylenchus robustus* son algunos ejemplos de nematodos patógenos de la lechuga (Maroto, 1989 y 2002). Entre las bacterias más comunes se encuentran *Xanthomonas campestris* pv *vitians* (Brown), *Pseudomonas* spp., *Rhizomonas suberifaciens* van Bruggen, Jochimsen y Brown y *Erwinia carotovora* subsp *carotovora* (Jones) (Maroto, 1989 y 2002). Los virus más importantes de la lechuga lo constituyen el Virus del mosaico de la lechuga (LMV), Virosis del mosaico del pepino (CMV), Virus de las nervaduras gruesas de la lechuga (Big Vein), Virosis del bronceado del tomate (TSWV), Virus del falso amarilleo de la remolacha (BSYV, Beet

Pseudoyellow Virus), Virus del amarillamiento occidental de la remolacha (BWYV) y Virus del amarillamiento necrótico de la lechuga (Maroto, 1989 y 2002). Los hongos que impactan a la lechuga son principalmente el mildiu de la lechuga (*Bremia lactucae* Regel), *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) De By., *Pythium ultimum* Trow, *Botrytis cinerea* Pers., oidio (*Erysiphe cichoracearum* D.C.) Y *Rhizoctonia* spp. (Maroto, 1989 y 2002).

Sin embargo a lo que confiere al patógeno *Rhizoctonia* spp. ha cobrado importancia en los últimos años, debido a los reportes sobre su presencia en cultivos de hortalizas (lechuga y ajo), en las regiones del Estado de Guanajuato ocasionando pérdidas en rendimiento y calidad. (Lara 2012 comunicación personal) M. en C. María Encarnación Lara Hernández, Investigadora Adjunta, del Área de Microbiología, Edafología. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

#### 4.2. *Rhizoctonia* spp.

*Rhizoctonia* spp. es un hongo común del suelo con capacidades saprofitas, de parasitismo facultativo y afecta a una amplia gama de especies de plantas. Se sabe de innumerables estudios, que existen distintas razas clasificadas en grupos de anastomosis, debido a lo cual puede atacar a distintos cultivos. Este patógeno es capaz de producir pérdidas en plantas anuales y en casi todas las hortalizas (Carling *et al.*, 1999; Schneider *et al.*, 1999; Tomaso-Peterson y Trevathan, 2007). Es uno de los precursores de la enfermedad conocida como “damping off” o caída

de plántulas producto del estrangulamiento y necrosis del tallo en cuello en plantas recién germinadas (Khangura *et al.*, 1999; Guédez *et al.*, 2009). Esta enfermedad, posee una amplia distribución geográfica y sus organismos causales se encuentran presentes en la mayoría de suelos agrícolas tanto en cultivos al aire libre como en invernadero (Green *et al.*, 1999; Ohkura *et al.*, 2009). Las pérdidas que ocasiona esta especie van desde 20 a 50% de plantas muertas, en siembra directa; a esta pérdida debe agregarse los gastos de replante, diferencias en maduración y reducciones en rendimiento. (Dorrance *et al.*, 2003)

#### 4. 2.1 Taxonomía (Kirk *et al.*, 2001)

Dominio: Eucariota

Reino: Eumycota

Phylum: Basidiomycota

Clase: Basidiomycetes

Orden: Ceratobasidiales

Familia: Ceratobasidiaceae

Género: *Rhizoctonia* (anamorfo)

#### 4.2.2 Morfología

Macroscópicamente las colonias de este microorganismo se caracterizan por ser blancas, algodonosas, planas y dependiendo de la especie pueden presentarse tonalidades que van de claras hasta amarillentas. Por el reverso de la caja se observa una pigmentación amarillenta oscura (Carling *et al.*, 1999; González *et al.*, 2006)

Microscópicamente, las hifas cuando jóvenes son hialinas y de 6 a 12 micras de diámetro; al envejecer, adquieren color castaño o castaño rojizo. Una de sus principales características es que ramifican en ángulo recto, con una apariencia de tabique transversal justo después de la ramificación. Carecen de estructuras fructíferas sexuales y esporas, produce esclerocios en forma de masa micelial de color blanco, que a través del tiempo se oscurece adquiriendo diferentes tonos de castaño; son irregulares, de 1 a 8 mm y su consistencia es dura (Gutiérrez *et al.*, 2006).

#### 4.2.3 Síntomas

Los síntomas más comunes en la mayoría de las plantas son el ahogamiento de las plántulas y la pudrición de raíz, así como la pudrición y la cancrrosis del tallo de las plantas adultas y en proceso de crecimiento. El ahogamiento o “Damping of” es quizá el síntoma más común que ocasiona *Rhizoctonia* spp., en las plantas afectadas (Conway *et al.*, 1997; Keinath y Farnham, 1997). Las plantas muy jóvenes pueden morir antes o poco después de haber emergido del suelo. Antes de que la planta emerja el ahogamiento ataca y mata el ápice de crecimiento ocasionando su muerte en poco tiempo, una vez que la planta ha emergido el hongo ataca su tallo y lo reblandece, haciéndolo incapaz de sostener a la plántula, la cual se desploma y muere (Khangura *et al.*, 1999; Paulitz y Schroeder, 2005; Tomaso-Peterson y Trevathan, 2007). Las plántulas maduras también son atacadas por el hongo, sobre sus tejidos corticales externos, donde se producen



lesiones grandes, de color canela a café rojizo. La longitud y anchura de dichas lesiones aumenta, hasta que finalmente rodea el tallo y la planta puede morir o, como ocurre con frecuencia en las crucíferas, antes de que la planta muera, el tallo se ennegrece, se dobla o retuerce pero no se rompe, dándole a la enfermedad el nombre de tallo de alambre (Agrios, 1991; Taheri *et al.*, 2007).

#### 4.2.4 Ciclo de vida y epidemiología

Este hongo se conserva en el suelo en forma de esclerocio o de micelio viviendo de la materia orgánica, y por su alto potencial saprofito puede sobrevivir en forma de micelio durante tres años (Guédez *et al.*, 2009), asociado a numerosas especies cultivadas, algunas malezas y en semilla infestada. Este patógeno se encuentra en la mayoría de los suelos (Agrios, 1991; Ulasio *et al.*, 2002). Las condiciones para que se desarrolle este hongo son suelos húmedos, textura pesada, drenaje deficiente, temperaturas desfavorables para la planta hospedera y días nublados, así como la excesiva densidad de plantas por unidad de superficie y exceso de nitrógeno en el suelo (Elmer, 1997; Taheri *et al.*, 2007). *Rhizoctonia* spp. Prefiere temperaturas de 25 a 30°C, con humedad en el suelo del 20 % (Kiewnick *et al.*, 2001; Priyatmojo *et al.*, 2001; Dorrance *et al.*, 2003; Kirk *et al.*, 2008). Las basidiosporas pueden ser diseminadas a través del viento y agua siendo capaces de viajar largas distancias (Ohkura *et al.*, 2009). La germinación de esclerocios se presenta cuando las condiciones de humedad y temperatura son favorables, dando origen al crecimiento micelial alcanzando un diámetro de

crecimiento de 7-10 cm, capaz de llegar a una fuente de alimentación. El patógeno puede infectar a través de tejidos sanos, heridos, o por los estomas, la colonización puede ser extracelular e intracelular (Gutiérrez *et al.*, 1997).

#### 4.3 Control biológico

El biocontrol tuvo sus inicios alrededor de 1920, ha cobrado vital importancia en los últimos años. El suelo es una fuente importante de microorganismos que han sido ampliamente estudiados para procesos biotecnológicos, contándose entre estos el control biológico de enfermedades en plantas (Hernández *et al.*, 2004; Guigón-López *et al.*, 2010). El control biológico se define “como el uso de microorganismos antagónicos para el control de fitopatógenos, al desplazar a estos de manera natural mediante los mecanismos de acción que poseen” (Torres *et al.*, 2008). Siendo una estrategia que está dando buen resultado contra agentes infecciosos, constituyen hoy en día una alternativa que podría sustituir el control sintético. (Sánchez y Rebolledo, 2010). Los organismos que intervienen en la sanidad de las plantas se denominan agentes de biocontrol, biocontroladores, antagonistas o antagónicos y al evento, como control biológico o biocontrol (Lara y Ferrera-Cerrato, 2007). Empleando como agentes de biocontrol a bacterias y hongos, cuyas interacciones evitan el establecimiento de los organismos considerados como patógenos (Mao *et al.*, 1998).

#### 4.3.1 Agentes microbianos empleados en el biocontrol

Tanto hongos como bacterias se han estudiado por su capacidad para controlar patógenos de enfermedades en un gran número de cultivos (Castillo-Fabela *et al.*, 2001) Debido a que algunas especies poseen un amplio espectro sobre agentes infecciosos, bajo condiciones de invernadero y campo (Larkin y Fravel, 1998; Mao *et al.*, 1998; Steddom y Menge, 2001; Khan *et al.*, 2004). Como mecanismos implicados en el antagonismo microbiano están la antibiosis, competencia, resistencia sistémica, el parasitismo o hiperparasitismo y la secreción de enzimas (Howel, 2003 y 2005) la capacidad antagónica de un agente de biocontrol, depende no sólo de su establecimiento y permanencia, sino también de las condiciones ambientales, todo ello influenciado por factores bióticos y abióticos (Quiroz-Sarmiento *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2011). Con respecto a la capacidad antagónica esta dependerá de la cepa, y por ello existen aislamientos más eficientes para el control de un patógeno que para otro (Torres *et al.*, 2008)

#### 4.3.2 Bacterias como agentes de biocontrol

Las bacterias juegan un papel importante en el control biológico de fitopatógenos de cultivos agrícolas, encontrándose de manera natural en la rizosfera (Milus, y Rothrock, 1997; Lagunas-Lagunas *et al.*, 2001). Para ejercer este control se ha documentado la participación de distintos mecanismos de acción contra los patógenos; competencia por nutrientes y espacio, antibiosis, producción de enzimas y resistencia inducida en plantas siendo capaces de inhibir el crecimiento

de los fitopatógenos (Rodríguez y Pfender, 1997; Hernández *et al.*, 2004). El género de las *Pseudomonas* spp., siendo el más empleado debido a su amplio espectro de hospedantes a su ataque (Alina *et al.*, 2005), sin embargo existen otros géneros con importancia en el control de patógenos siendo el caso de algunas especies de *Bacillus* spp. (Adiyaman *et al.*, 2011) *Burkholderia cepacia* (Heungens, y Parke, 2001; González *et al.*, 2007), *Xanthomonas* spp. (Robledo *et al.*, 2010), *Pantoea agglomerans* (Stockwell *et al.*, 2002; Pusey *et al.*, 2011).

#### 4.3.3 Hongos como agentes de biocontrol

Una alternativa dentro del control biológico es el empleo de hongos antagonistas, cuyo conocimiento de su efectividad y de sus mecanismos de acción es esencial para el desarrollo de una estrategia en la implementación de una agricultura sostenible (Torres *et al.*, 2008). Entre los microorganismos nativos del suelo, *Trichoderma* spp. ha sido ampliamente estudiado y se ha propuesto como agente de control biológico, especialmente contra fitopatógenos nativos del suelo (Howell, 2003). Debido a su amplia distribución en los suelos del mundo y por su amplio rango de hospedantes (Aquino-Martínez *et al.*, 2008). Los factores clave que contribuyen al efecto antagónico de estos organismos son su rápido crecimiento, producción de metabolitos antimicrobianos, propiedades bioquímicas, genéticas y características fisiológicas (Guigón-López *et al.*, 2010) Sin embargo, existen otras especies fúngicas que potencialmente pueden inhibir o limitar el crecimiento de los patógenos (Guédez *et al.*, 2009) siendo el caso de algunas especies de *Arpergillus*

spp. (Ulasio *et al.*, 2002; Quiroz-Sarmiento *et al.*, 2008), *Gliocladium* spp. (Chaves y Wang, 2004; Aquino-Martínez *et al.*, 2008) *Penicillium* spp., (Ulasio *et al.*, 2002; Larena y Melgarejo, 2009), *Cladosporium* sp. (García-Velasco *et al.*, 2005), especies no patogénicas de *Pythium* (Benhamou *et al.*, 1999; Aquino-Martínez *et al.*, 2008), así como cepas binucleadas de *Rhizoctonia* spp. (Hwang y Benson 2002).

#### 4.3.3.1 *Trichoderma* spp.

Las especies del genero *Trichoderma* están ampliamente distribuidas en la naturaleza, incluye especies de vida libre que habitan en las primeras capas edáficas y en la zona rizosférica de las plantas, es considerado como oportunista y simbionte de plantas (Sánchez y Rebolledo, 2010). Tiene la habilidad de descomponer los residuos de cosecha (Alarcón *et al.*, 2005), posee la capacidad de adaptarse a varios ambientes (García *et al.*, 2006). Son los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades de las plantas producidas por hongos del suelo (Torres *et al.*, 2008), Principalmente de los géneros *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Fusarium* (Ezziyyani *et al.*, 2004), y *Sclerotium* (Metcalf *et al.*, 2004) entre otros, así como de enfermedades ocasionadas por mildiu y *Alternaria*, que afectan principalmente el área foliar de un amplio rango de cultivos (Alarcón *et al.*, 2005) y de postcosecha (Anderson *et al.*, 2001; Porras *et al.*, 2007; Lars y Bernhard 2008) debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aisladas y cultivadas, a su crecimiento rápido en gran número de sustratos ya que no atacan

a las plantas superiores (Nelson y Harman, 1997; Torres *et al.*, 2008). Por otra parte, los modos de acción más comúnmente reportados para *Trichoderma* spp. son: micoparasitismo, competencia por nutrientes y espacio, secreción de enzimas, producción de metabolitos (antibiosis), e inducción de los sistemas de defensa en la planta (Howell, 2003 y 2005; Rivas y Pavone, 2010). Además se ha comprobado que algunas especies promueven desarrollo de la planta (Howell, 2003). Estos mecanismos no son excluyentes sino que actúan sinérgicamente en el control de los patógenos. La importancia relativa de cada uno de ellos depende de la relación antagonista-patógeno y de las condiciones ambientales (Torres *et al.*, 2008).

#### 4.3.3.2 Taxonomía (Kirt *et al.*, 2001)

|                        |   |
|------------------------|---|
| Reino: Fungi           | Phylum: Ascomycota                                    |
| Clase: Sordariomycetes | Orden: Hypocreales                                    |
| Familia: Hypocreaceae  | Género: <i>Hypocrea</i> (anamorfo) <i>Trichoderma</i> |

#### 4.3.3.3 Morfología

Macroscópicamente las colonias se reconocen fácilmente, su crecimiento es rápido y la pigmentación es variada: blanco, verde y amarillo verdosa; las áreas con conidios se presentan con anillos concéntricos, el reverso de las colonias es usualmente coloreado de amarillo – ámbar o amarillo – verde (Sánchez y Rebolledo, 2010)

Microscópicamente, los conidióforos son erectos, hialinos, en su mayoría ramificados, solitarios o en grupo. Las fiálides tienen forma de botella única o en grupo, hinchadas en la región central y delgada hacia el ápice; son hialinas y en ángulo recto con respecto a los conidióforos. Los conidios son unicelulares subglobosos u oblongos, lisos o equilunados, hialinos o verdes y se encuentran en masas sobre las fiálides, muchas especies producen grandes cantidades de estructuras de resistencia (clamidosporas) de tipo intercalar o terminal (Michel-Aceves *et al.*, 2009).

#### 4.4 Mecanismos de acción

Los mecanismos de acción de los agentes de biocontrol y en interacción con la planta son: parasitismo, producción de enzimas, competencia (espacio y nutrientes), resistencia inducida y antibiosis (Howell, 2003 y 2005; Khan *et al.*, 2004; Porras *et al.*, 2007). Los modos de acción no son mutuamente excluyentes, por lo que mientras uno parece ser el principal, en realidad pueden actuar en conjunto (Burns y Benson, 2000; Bautista, 2006; Xu *et al.*, 2011).

##### 4.4.1 Micoparasitismo

El micoparasitismo es la relación donde el organismo antagonista se beneficia del hongo patógeno, manteniendo una relación con células activas durante largos periodos de tiempo (micoparasitismo biotrófico) o incluso causando su muerte (micoparasitismo necrotrofico o destructivo). En primer instancia *Trichoderma*

localiza al patógeno y crece hacia él por tropismo debido a la secreción de enzimas quitinasas por parte del patógeno, una vez que los hongos entran en contacto, *Trichoderma* envuelve a su presa y forma estructuras especializadas de tipo apresorio, con las que penetran al interior de las hifas del patógeno (Köhl *et al.*, 1997; Metcalf *et al.*, 2004; Howell, 2005; Fernández y Suarez, 2009; Hanhong *et al.*, 2010).

#### 4.4.2 Secreción de enzimas

El componente enzimático de los agentes de biocontrol, se expresa por la producción de enzimas líticas extracelulares difusibles tales como quitinasas,  $\beta$ 1-3 y  $\beta$ 1-4 glucanasas, proteinasas, celulasas (Aquino-Martínez *et al.*, 2008), proteasas (Guigón-López *et al.*, 2010), peptinasas y cutinasas (Fernández y Suarez, 2009), que degradan la pared celular, luego continúa la retracción de la membrana plasmática y finalmente la desorganización citoplasmática (Torres *et al.*, 2008)

#### 4.4.3 Competencia

La competencia se da principalmente por nutrientes y espacio (Mao *et al.*, 1998; Osorio *et al.*, 2005; Aquino-Martínez *et al.*, 2008). Debido a su rápido crecimiento de algunos antagonistas, colonizan la rizosfera, de esta manera impiden el desarrollo y el establecimiento del patógeno (Fernández y Suarez, 2009).



#### 4.4.4 Antibiosis

La antibiosis por parte de los agentes de biocontrol, esta atribuida a la síntesis de un amplio rango de sustancias antibióticas (Sánchez y Rebolledo, 2010), mediante la producción de metabolitos que inhiben el desarrollo de hongos patógenos (Howell, 2003; Aquino-Martínez *et al.*, 2008). Así mismo la actividad en el ámbito celular para el control de fitopatógenos del suelo, los metabolitos causan vacuolización, granulación, desintegración y lisis de la pared celular (Torres *et al.*, 2008)

#### 4.4.5 Resistencia inducida en plantas

Algunos agentes de biocontrol, también puede inducir resistencia sistémica, al colonizar endofíticamente la epidermis y corteza exterior de las radículas o de tallos y hojas (Guigón-López *et al.*, 2010), debido a su papel en la activación de los mecanismos de defensa, estimulando la secreción de compuestos fenolicos, terpenicos y producción de fitohormonas con actividad antimicrobiana que pueden conllevar a la protección contra el ataque de patógenos (Howell, 2002; Hanson y Howell, 2004; González-Vega *et al.*, 2007).

## 4.5 Uso de microorganismos en el control de enfermedades

### 4.5.1 Control biológico *in vitro*

Se ha demostrado que *Trichoderma* spp. es capaz de controlar significativamente bajo condiciones *in vitro* a hongos de diversos géneros, como *Armillaria* (Vahl), *Botrytis* (Persoon), *Chondrostereum* (Persoon), *Colletotrichum* (Sacc), *Diaporthe* (Wolf), *Endothia* (Murriss), *Fulvia* (Ciferreri), *Fusarium* (Link ex Gray), *Fusicladium* (Sacc), *Helminthosporium* (Link), *Pseudoperonospora* (Berk y Curt), *Pythium* (Pringsh), *Rhizoctonia* (Kuhn), *Rhizopus* (Corda), *Sclerotinia* (Sacc), *Venturia* (Sacc) y *Verticillium* (Nees) (Guarro *et al.* 1999), (Hermosa *et al.* 2000), (Santamarina *et al.* 2002), (Gielen *et al.* 2004), (Samuel, 2004) citados por (Torres *et al.* 2008).

Varios de los microorganismos utilizados como agentes de control biológico producen metabolitos secundarios que afectan el crecimiento o germinación mediante la producción de antibióticos y/o enzimas que degradan pared celular; *Cladosporium tenuissimum* produce el cladosporol 1, conocido como un inhibidor de la biosíntesis de glucana a concentraciones de 12.5 y 100 ppm inhibió la germinación y crecimiento micelial de varios hongos (Assante *et al.* 2002, 2004), citados por (García-Velasco *et al.* 2005). *Pseudomonas putida* (Trevisan) Migula y *Burkholderia cepacia* Palleroni y Holmes, producen 2,4-diacetilcloroglucinol y pirrolnitrina con efecto antibiótico y *Pseudomonas fluorescens* BL915 Migula, inhibe el desarrollo de *Rhizoctonia solani* Kühn mediante la producción de

pirrolnitrina (Hill *et al.* 1994; Rosales *et al.* 1995), citados por (García-Velasco *et al.* 2005)

(Sivan y Chet, 1989; Ghisalberti y Sivasithamparan 1991; Lorito *et al.* 1993; Quarles, 1993 y Stefanova *et al.* 2004) citados por Alarcón *et al.* (2005) han informado la eficacia de *Trichoderma harzianum* contra hongos fitopatógenos del suelo, y su actividad como antagonista se atribuye al micoparasitismo, producción de antibióticos y enzimas hidrolíticas.

(Dunne *et al.* 2000) citados por Valencia-Cantero *et al.* (2005) demostraron a través de bioensayos *in vitro* que *Stenotrophomonas maltophilia* cepa W81 es capaz de suprimir a *Pythium ultimum* mediante la producción de enzimas proteolíticas extracelulares difusivas.

Sánchez y Rebolledo (2010), evaluaron el potencial antagónico *in vitro* de la cepas V.S.L. 143 de *Trichoderma viridescens* y V.S.L.74 de *Trichoderma reseei* al inhibir el crecimiento del fitopatógeno *Thielaviopsis paradoxa* en un 87 y 80 %, respectivamente. Además evaluaron el efecto de antibiosis de la cepa de *Trichoderma longibrachiatum* al inhibir el crecimiento de *Thielaviopsis paradoxa*, indicando la eficacia de los metabolitos producidos por el antagonista.

(Rosales, 1995) citado por Castillo-Fabela *et al.* (2001) evaluó 35 cepas de actinobacterias antagónicas a *Phytophthora capsici*, con un porcentaje de inhibición *in vitro* por arriba del 80%.

A partir de sustratos orgánicos se aislaron géneros de bacterias con capacidad biocontroladora a *Rhizoctonia solani*. Destacando los siguientes géneros *Burkholderia.*, varias especies de *Pseudomonas* spp. reconocidas como agentes de biocontrol, *Xhantomonas* sp. y *Stenotrophomonas maltophilia*, con síntesis de diferentes moléculas con acción antifúngica, como la producción de antibióticos Jakobi *et al.* (1996) y quitinasas (Zhang y Yuen, 2000) citados por (Robledo *et al.* 2010)

El género *Bacillus* contiene especies antagonistas contra hongos fitopatógenos, que han mostrado actividad antifúngica *in vitro* sobresalen *Bacillus thuringiensis* contra *Rhizoctonia solani*, *Pyricularia grisea*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* (Knaak *et al.* 2007); *Bacillus amyloliquefaciens* contra *Colletotrichum* Kim y (Chung, 2004), citados por (Reyes *et al.* 2011). *Bacillus subtilis* contra un amplio rango de hongos anamorfos, donde destacan *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp. y *Macrophomina phaseolina* (Melentev *et al.* 2006; Singh *et al.* 2008; Sosa *et al.* 2011; Sun *et al.* 2011) y *Bacillus licheniformis* contra *Curvularia lunata* y *Pyricularia grisea* (Tendulkar *et al.* 2007) citados por (Reyes *et al.* 2011)

(Farías-Rodríguez *et al.* 1998) citados por Valencia-Cantero *et al.* (2005) aislaron la cepa ZUM80 de *Pseudomonas fluorescens* de la rizosfera de un cultivo de papa. Esta cepa mostro tener capacidad para producir sideróforos y de suprimir el crecimiento de *Erwinia carotovora* y *Pseudomonas solanacearum*, tanto *in vitro*, como *in vivo*.

Khan *et al.* (2001) evaluaron a través de bioensayos la eficacia de dos cepas de *Bacillus* spp. AS 43.3 y AS 43.4, además una cepa de levadura *Cryptococcus* spp. OH 182.9, al inhibir el crecimiento en un 77 a 93 y 56 % respectivamente contra *Gibberela zeae*.

(Oh *et al.*, 2002) citados por Sánchez y Rebolledo (2010) reportaron que la atroviridina y neatroviridina producidos por *Trichoderma atroviride* exhibieron fuerte actividad antifúngica contra *Curvularia inaequalis*, *Colletotrichum dematium* y *Fusarium oxysporum* y moderada actividad contra *Verticillium dahliae*, *Aspergillus niger* y *Cladosporum* sp.

#### 4.5.2 Aplicación comercial del control biológico

Laguna-Laguna *et al.* (2001) estudiaron el efecto de *Bacillus* sobre la germinación y desarrollo de jitomate cv Río grande. En semillas tratadas con *Bacillus* se incremento significativamente (P=0.05) la germinación en 60% con respecto al

testigo. La aplicación del medio sin bacteria no afectó la germinación. El volumen radical y el peso seco de la planta se incrementó en 87 y 84% respectivamente, con la aplicación de la bacteria en comparación con el testigo. La aplicación del medio de cultivo sin bacteria incrementó el volumen y el peso seco en un 34 y 32%, sin embargo tales incrementos no fueron significativos.

Hernández *et al.* (2004) evaluaron que las cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia* producen metabolitos del tipo Acido Indol Acético (AIA), sideróforos y ácido salicílico. Las cepas de *Burkholderia cepacia* MBp1, MBp2, MBf22, MBp3, MBf20, MBf15 y *Pseudomonas fluorescens* MPp4 destacaron de forma integral por las mayores producciones de los metabolitos de interés, demostrándose que las mismas son eficientes en la promoción de crecimiento vegetal en cultivos de importancia económica, por lo que constituyen fuentes de reserva para la producción de inoculantes microbianos factibles desde el punto de vista ecológico.

El empleo de *Trichoderma harzianum* como biocontrol de hongos del suelo ha sido señalado como efectivo en diversos cultivos. Los estudios relativos a su uso como biopreparado foliar son relativamente nuevos. En Cuba (Pérez y Echemendía, 1994) citados por Alarcón *et al.* (2005) informaron 20% de disminución del patógeno con la aplicación de *Trichoderma harzianum* en plantas de cebolla, en condiciones de campo, bajo infección natural de *Alternaria porri*.

(Bernal *et al.*, 2000; González *et al.*, 2005) citados por Fernández y Suárez (2009), utilizaron *Trichoderma* spp. como alternativa ecológica para el control de *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *cubense*, obteniendo un control superior al 70% proporcionado por los antagonistas.

En Colombia, se ha evaluado la capacidad antagónica de *Trichoderma* sp. contra hongos fitopatógenos agentes causales de pudriciones radicales y marchitamientos como *Rhizoctonia solani*, *Sarocladium* sp. y *Sclerotinia* sp. en arroz, flores, papa, hortalizas, frutales y frijol; *Fusarium oxysporum* en clavel, *Botrytis cinerea* en flores, *Ceratocystis fimbriata* en cafeto, *Rosellinia bunodes* en cacao y *Phytophthora cactorum* en manzano. En la región del caribe colombiano se han establecido estrategias que incorporan a *Trichoderma* spp. en los procesos de manejo integrado de enfermedades (Fernández y Suárez, 2009).

(Sutherland y Lockwood, 1984) citado por Castillo-Fabela *et al.* (2001) encontraron que la semilla de soya tratada con *Actinoplanes missouriensis* redujo las pudriciones radicales, 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 *Phytophthora*.

*megasperma glycinea*. En estudios de campo *Gliocladium roseum* logro reducir la incidencia de *Botrytis cinérea* en frutos de fresa del 48 a 76% y en estambres de 79 a 93% en 8 cultivares. En ambos casos fue tan efectivo como los tratamientos con captan Sutton *et al.* (1997) citados por (Chávez y Wang, 2004)

(Rodríguez *et al.*, 1998) citados por Alarcón *et al.* (2005) mostraron el efecto foliar de *Trichoderma harzianum* contra mildiu velludo y mildiu polvoriento en pepino, con reducciones de la incidencia en 35 y 23,2% respectivamente, y estimulación del desarrollo de las plantas, incrementos en la longitud del tallo y frutos, así como el peso de los frutos.

Torres *et al.* (2008), comentan que diferentes especies del genero *Trichoderma* han sido usadas como agentes de control biológico de enfermedades en la agricultura. Los más usados son *Trichoderma harzianum* (Rifai), *Trichoderma viride* (Persoon), *Trichoderma virens* (Miller y Foster)

Castillo-Fabela *et al.* (2001). Aseguran que existen 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 *Pythium* 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.



Ezziyyanni *et al.* (2004), realizaron ensayos *in vivo* al tratar semillas con *Trichoderma harzianum*. siendo capaz de reducir hasta un 65% la «tristeza» causada por el patógeno *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento.

En cuba se han logrado avances en protección vegetal en la aplicación de microorganismos rizosféricos y/o sus derivados (productos biológicos), fundamentándose debido a la presencia de sustancia antifúngicas, como las que posee; *Burkholderia cepacia* Palleroni y Holmes en el efecto de control sobre *Fusarium verticillioides* (Sacc) Nirenberg y *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) keissl. En el cultivo de maíz (*Zea mays* L) Hernández, (2002) y de *Fusarium* spp. en gladiolo Toledo *et al.* (2002) citados por (González-Vega *et al.* 2007).

En los últimos años el estudio del control biológico ha logrado pasar del laboratorio a la aplicación práctica y a la elaboración de productos comerciales. A la fecha, la Agencia de Protección al Ambiente de los Estados Unidos (EPA por sus siglas en inglés) ha liberado dos productos comerciales: BioSave 110 (anteriormente BioSave 11) (EcoScience, Worcester, MA, EUA) y Aspire (Ecogen, Larchorne PA, EUA). El primero formulado a base de la bacteria *Pseudomonas syringae* y la segunda a partir de la levadura *Candida oleophila*, cepa I-182 Hosftein *et al.* (1991), Janisciewicz y Marchi, (1992), citados por Bautista, (2006) este mismo

autor comenta que en Sudáfrica el Departamento Nacional de Agricultura, Fertilizantes, alimentos para Ganado y Remedios Agrícolas y Animales. Ha liberado dos productos para su comercialización: Avorgreen que contiene la bacteria *Pseudomonas subtilis* (Stimuplant, White River Sudáfrica) y Yieldplus (Anchor Yeast, Capetown, Sudáfrica) formulados ambos productos con la levadura *Cryptococcus albidus*. (Bautista, 2006).

(Qin *et al.*, 2004), citados por Hernández-Lauzardo *et al.* (2007). En un estudio se analizó el comportamiento de cuatro levaduras antagonistas (*Trichosporon pullulans*, *Cryptococcus laurentii*, *Rhodoturla glutinis*, *Pichia membranefanciens*), se encontró que fueron efectivas contra patógenos postcosecha (*Alternaria alternata*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*) en cerezas (*Rubus idaeus* L.) almacenadas a 25°C; sin embargo a bajas temperaturas y en condiciones de atmosfera controlada suprimió el ataque de *Trichosporon pullulans* y *Pichia membrenefanciens*. También se ha encontrado el efecto inverso, en estudio realizado en durazno (*Prunus persica* L.) para controlar la enfermedad causada por *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* con el antagonista *Candida aloephila* (Montrocher), se evidenció que esta levadura por si sola no fue capaz de ejercer efecto de biocontrol, pero cuando se combinó con la atmósfera modificada durante el empaque se redujo la pudrición Karabulud y Baykal, (2004) citados por (Hernández-Lauzardo *et al.* 2007)

La combinación de dos agentes antagónicos *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. en el tratamiento de semillas de pepino redujo considerablemente el síntoma del damping-off causado por *Rhizoctonia solani*. Yobo et al. (2010) citados por (Xu et al. 2011)

Guillen-Cruz et al. (2006) Evaluaron a nivel de campo cepas de *Bacillus* spp. observando un efecto positivo al incrementar altura de la planta, como los rendimientos en el cultivo de chile, lo anterior pudo ser debido a que algunas bacterias del género *Bacillus* inducen diferentes mecanismos relacionados con la promoción de crecimiento en las plantas ya sea que proporcionen directamente nutrientes, participen en la fijación de nitrógeno, fósforo y potasio, o bien que las plantas sean capaces de producir hormonas vegetales y sustancias promotoras de crecimiento como el ácido indolacético o por la producción de sideróforos o antibióticos para la supresión de la microflora dañina.

Rojas-Ruíz et al. (2010) Reconocieron la potencialidad de bacterias asociadas a las plantas que ejercen el biocontrol mediante la síntesis de diversos metabolitos, entre ellos antibióticos y sideróforos, de numerosas bacterias rizosféricas, que incluyen cepas de *Pseudomonas* sp., *Curtobacterium luteum* y *Pantoea agglomerans*, resultaron promisorias para el control de patógenos constituido por sideróforos del tipo pioverdin II, antimicrobianos de naturaleza fenólica y ácido salicílico.

El empleo de *Trichoderma* por medio de las semillas es probablemente la forma más económica y extensiva para introducir el biocontrol en la producción. El método sencillamente consiste en tratar las semillas con una suspensión acuosa de esporas o en forma de polvo, con necesidad de adherente o sin él. Las semillas reciben una cobertura protectora cuyo efecto se muestra cuando se siembran en el sustrato correspondiente. El tratamiento reduce las contaminaciones externas por diversas especies de hongos en cucurbitáceas, col, cebolla, ajo, rábano, remolacha, zanahoria, habichuela, tomate y pimiento, entre otros; incrementa además el porcentaje de germinación y estimula el crecimiento. En las pruebas de protección de las semillas contra las infecciones postemergentes se registraron coberturas elevadas por el antagonista que reducen a menos de 50% las infecciones por *Fusarium solani* y a 3% las de *Rhizoctonia solani* en comparación con 90% en el testigo Sandoval *et al.* (1995) citado por (Estefanova, 2007)

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Localización

La presente investigación fue desarrollada en el laboratorio de Fijación Biológica de Nitrógeno del Área de Microbiología, Edafología del Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo con sede en Texcoco, Edo. de México.

### 5.2 Cepas patógenas y antagónicas involucradas en el control biológico

Las cepas patógenas de *Rhizoctonia* spp, (R2, R3, R4, R5 y R6) y antagónicas tanto de *Trichoderma* spp. (R39, R40, R41, R44 y GT5) como las bacterianas (A46, P14, P23, P61, R11, R44, BSP1.1 y OLS-SF3) empleadas, forman parte de la Colección del Área de Microbiología, Edafología del Colegio de Posgraduados.

#### 5.2.1. Activación de las cepas involucradas en el biocontrol

Las cepas antagónicas proporcionadas se encontraban preservadas en tubo inclinado y con la finalidad de contar con material suficiente para la investigación, estas fueron activadas: para el caso de *Rhizoctonia* spp. y *Trichoderma* spp. se emplearon cajas de Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) y para bacterias Agar nutritivo (AN).

### 5.2.2. Preservación de las cepas utilizadas en el control biológico

Tanto las cepas patógenas de *Rhizoctonia* spp., como las antagónicas (*Trichoderma* spp. y bacterias) fueron preservadas en tubos inclinados de PDA para el caso de hongos y AN para el de bacterias.

El procedimiento para los hongos consistió en introducir con la ayuda de una aguja de disección, un disco de 5 mm de diámetro de la cepa correspondiente en el tubo inclinado. Para el caso de las bacterias la siembra se realizó con asa bacteriana, tomando una porción de la colonia correspondiente e introduciéndola en el tubo con un movimiento en zigzag sobre el medio de cultivo. Una vez que se detectó crecimiento suficiente, los tubos inclinados fueron sellados con parafilm antes de ser guardados a 4°C para su preservación.

## 5.3 Caracterización macro y microscópica de los agentes involucrados en el control biológico.

### 5.3.1 Características macroscópicas de las cepas involucradas en el biocontrol.

Para la caracterización macroscópica de las cepas de *Rhizoctonia* spp. y *Trichoderma* spp. se colocó un disco de 5 mm de diámetro de la cepa respectiva en el centro de la caja de Petri con medio de cultivo PDA . Las variables evaluadas fueron; tipo colonia, aspecto, consistencia, desarrollo y color siguiendo la metodología descrita por Ramírez *et al.* (1998.)

Las bacterias fueron establecidas en cajas Petri con medio de cultivo AN, realizando la siembra en forma de estriado, con la finalidad de obtener colonias aisladas para su caracterización macroscópica: forma, elevación, textura y color, tomando como referencia la metodología de Ramírez *et al.*, (1998).

#### 5.3.2. Características microscópicas de las cepas involucradas en el biocontrol.

La evaluación microscópica de los hongos incluyó preparaciones temporales según la metodología de Ramírez *et al.* (1998), que consistieron en colocar en un portaobjetos, una gota del reactivo azul de algodón y micelio del hongo objeto de estudio que posteriormente, fue cubierto con un/el cubreobjetos; estas se observaron al microscopio a 4, 10 y 40 aumentos. En algunos casos se requirió usar aumentos de 100X, previa adición de aceite de inmersión.

Para la identificación microscópica de las bacterias se realizó tinción de Gram utilizando preparaciones temporales, descrita por la metodología de Ramírez *et al.* (1998). Consiste en utilizar 4 reactivos: Cristal violeta o colorante primario, imparte color a todos los organismos del frote; seguido de la solución iodo de Gram o lugol, (mordente), un tercero alcohol-acetona que actúa como decolorante arrastrando al colorante primario fuera de la pared celular, y por último la safranina o colorante de contraste. Las bacterias con pared celular gruesa, debido a su mayor contenido de péptidoglucanos, adhieren a su pared celular el colorante primario y pigmentan de morado (bacterias Gram +), en tanto que las bacterias

con pared celular delgada (menos contenido de peptidoglucanos), no retienen el colorante primario y se tiñen de color rosa procedente de la safranina (Gram -). Posteriormente las preparaciones fueron observadas al microscopio a 100x.

#### 5.4 Descripción de experimentos

Con la finalidad de evidenciar el fenómeno de biocontrol, se establecieron seis experimentos bajo condiciones de laboratorio, utilizando la técnica de cultivos duales en cajas Petri con medio de cultivo PDA; consistió en enfrentar cepas antagónicas de *Trichoderma* spp, además de bacterias con potencial antagónico, contra el patógeno *Rhizoctonia* spp.



#### 5.4.1 Experimento 1. Confrontación *in vitro* de *Trichoderma* spp. vs *Rhizoctonia* spp. cepa R2

En un primer experimento se evaluó el efecto antagónico de *Trichoderma* spp.; R39, R40, R41, R44 y GT5 sobre la cepa R2 de *Rhizoctonia* spp., en un arreglo estadístico completamente al azar de 6 tratamientos con tres repeticiones, en pruebas *in vitro* empleando la técnica de cultivos duales en cajas Petri con PDA, en las que se colocó en cada extremo un disco de 5 mm de diámetro del patógeno y del antagonista. El tiempo de establecimiento de los organismos se realizó con base a su velocidad de crecimiento previamente evaluado de cada una de las cepas, con la finalidad de sincronizar los enfrentamientos. Los casos que sólo involucraron a uno de los organismos, fue colocado en uno de los extremos de la caja Petri. Posteriormente fueron incubados a 28 °C. Diariamente se evaluó el crecimiento micelial de ambos organismos. Los datos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) para detectar diferencias entre tratamientos y para comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey (P= 0.05), empleando el paquete estadístico. The Statistical Analysis System (SAS) Systems 9 for Windows.

#### 5.4.2 Experimento 2. Confrontación *in vitro* de *Trichoderma* spp. vs *Rhizoctonia* spp., cepa (R5)

Se estableció un segundo experimento completamente al azar de 6 tratamientos con tres repeticiones, para evaluar el efecto de biocontrol de las cepas de *Trichoderma* spp. (R39, R40, R41, R44 y GT5), sobre la cepa R5 de *Rhizoctonia* spp.. en pruebas *in vitro* utilizando la técnica de cultivos duales; consistió en colocar en cada extremo de la caja de Petri un disco de 5 mm de diámetro del antagonista como del patógeno, tomando como referencia la velocidad de su crecimiento previamente evaluado de cada una de las cepas. Para los controles que involucraron a uno de los organismos, este fue colocado en uno extremo de la caja Petri, posteriormente fueron incubados a 28 °C. Dando seguimiento diario al crecimiento micelial de los organismos en confrontación. Los resultados se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) para detectar diferencias entre tratamientos, utilizando la prueba de Tukey (P= 0.05), para la separación de medias empleando el paquete estadístico The Statistical Analysis System (SAS) Systems 9 for Windows.

#### 5.4.3 Experimento 3. Enfrentamiento *in vitro* de ocho cepas bacterias con potencial antagónico vs *Rhizoctonia* spp., cepas R2 y R5

Se emplearon ocho cepas bacterianas (P14, P23, P61, R11, R44, A46, BSP1.1 y OLS-SF3), para evaluar su efecto de biocontrol a *Rhizoctonia* spp. cepas (R2 y R5). Para ello se realizaron bioensayos bajo la técnica de cultivos duales, trazando con una asa bacteriológica en un extremo de la caja de Petri una línea de 4 cm de la cepa bacteriana correspondiente, tres días después, en el extremo opuesto se colocó un disco de 5 mm de diámetro con micelio de la cepa respectiva de *Rhizoctonia* spp., los controles del patógeno fueron dispuestos de manera independiente en un extremo de la caja Petri. Las unidades experimentales se establecieron bajo un arreglo estadístico completamente al azar de 18 tratamientos con tres repeticiones, resultado de enfrentar a las bacterias con cada cepa (R2, R5 y testigo). Las unidades experimentales fueron incubados a 28 °C, realizando a diario la evaluación del crecimiento fúngico; los datos se evaluaron a través del análisis de varianza (ANOVA) para detectar diferencias entre tratamientos, se utilizó la prueba de Tukey (P= 0.05), en la comparación de medias utilizando el paquete estadístico The Statistical Analysis System (SAS) Systems 9 for Windows.

#### 5.4.4 Experimento 4. Enfrentamiento *in vitro* de tres cepas bacterias antagónicas vs *Rhizoctonia* spp., cepas R3, R4 y R6

Con base a los resultados obtenidos en el experimento anterior, se seleccionaron las cepas con potencial antagónico (A46, P61 y OLS-SF3) para ser evaluadas a través de bioensayos *in vitro* contra las cepas R3, R4 y R6 de *Rhizoctonia* spp., utilizando la técnica de cultivos duales que consistió en trazar una línea de 4 cm de la cepa bacteriana objeto de estudio en un extremo de la caja Petri, tres días después, al lado opuesto de la colonia bacteriana se procedió a colocar un disco de 5 mm de diámetro conteniendo micelio de la cepa correspondiente del patógeno, para el testigo absoluto de *Rhizoctonia* spp, se establecieron cajas individuales colocando en un extremo de la caja Petri, un disco de la cepa correspondiente. Las unidades experimentales fueron distribuidas en un modelo estadístico completamente al azar de 12 tratamiento con tres repeticiones, posteriormente se incubaron a 28 °C, diariamente se evaluó el crecimiento micelial en la confrontación. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para detectar diferencias entre tratamientos, para la separación de medias se utilizó la prueba de Tukey (P= 0.05), empleando el paquete estadístico The Statistical Analysis System (SAS) Systems 9 for Windows.

Con la finalidad de evaluar el grado de biocontrol de las bacterias antagónicas, se probaron dos diferentes tiempos de exposición detalladas en los experimentos siguientes:

#### 5.4.5 Experimento 5. Enfrentamiento *in vitro* de *Rhizoctonia* spp. vs cepas bacterianas antagónicas, dispuestas una semana antes del patógeno

Se estableció un experimento a través de bioensayos para evaluar el efecto de biocontrol de las bacterias antagónicas A46, P61 y OLS-SF3, frente a las cepas patógenas R2 y R5 de *Rhizoctonia* spp. empleando la técnica de cultivos duales. Para ello cada cepa bacteriana fue dispuesta en un extremo de la caja Petri trazando una línea de 4 cm, siete días después en el extremo opuesto se colocó un disco de 5 mm conteniendo al patógeno. Los testigos de *Rhizoctonia* fueron establecidos de manera independiente en un extremo de la caja de Petri. Las unidades experimentales se sometieron en un diseño estadístico completamente al azar de 8 tratamientos con tres repeticiones, los enfrentamientos se incubaron a 28 °C. Diariamente se evaluó el crecimiento micelial de los agentes involucrados en los bioensayos. Los datos se sometieron análisis de varianza (ANOVA) empleando la prueba de Tukey ( $P = 0.05$ ) para la comparación de medias, utilizando el programa estadístico The Statistical Analysis System (SAS) System 9 for Windows.

#### 5.4.6 Experimento 6. Enfrentamiento *in vitro* de *Rhizoctonia* spp. vs cepas bacterianas antagónicas, dispuestas a un mes antes del patógeno

Se evaluó a través de bioensayos el enfrentamiento de las bacterias antagónicas A46, P61 y OLS-SF3 sobre cepas patógenas R2 y R5 de *Rhizoctonia* spp. bajo la técnica de cultivos duales. Para ello la cepa bacteriana respectiva fue dispuesta en un extremo de la caja Petri trazando una línea de 4 cm, 30 días después fue colocado en el extremo opuesto un disco de 5 mm de diámetro con micelio de la cepa correspondiente del patógeno. Los testigos del patógeno fueron establecidos de manera independiente en un extremo de la caja Petri. Para su posterior incubación a 28 °C. Evaluando a diario al crecimiento micelial del patógeno durante la confrontación. El diseño estadístico que se utilizó fue completamente al azar que contemplo 8 tratamientos con tres repeticiones, para determinar las mejores cepas, se realizó el Análisis de Varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey (P = 0.05) para la comparación de medias utilizando el paquete estadístico The Statistical Analysis System (SAS) Systems 9 for Windows.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

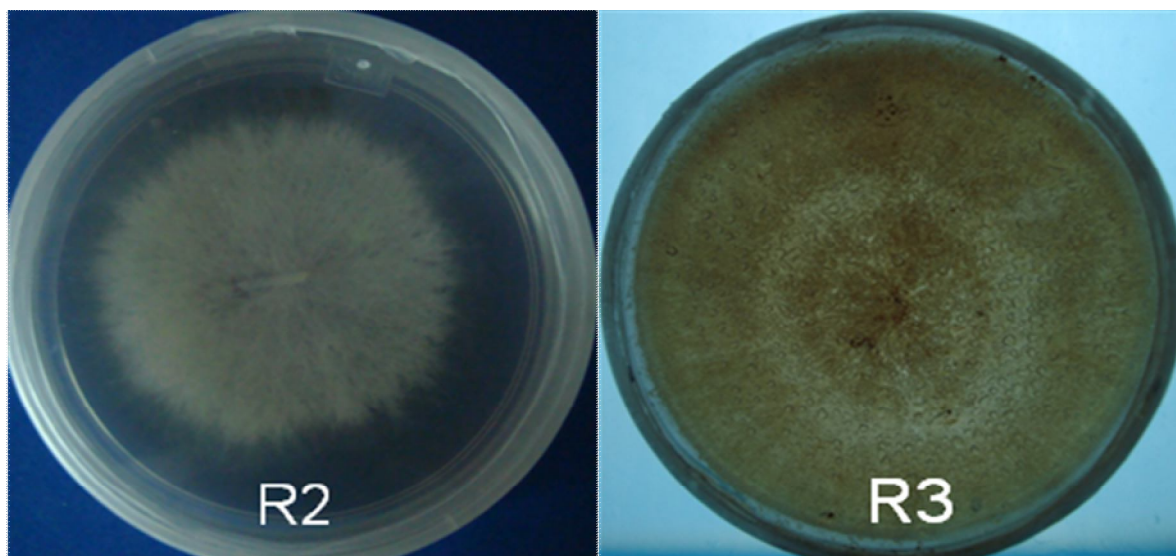
### 6.1. Caracterización de las cepas involucradas en el biocontrol

#### 6.1.1. Caracterización macroscópica de las cepas involucradas en el biocontrol

De manera general, las 5 cepas de *Rhizoctonia* spp. macroscópicamente presentan micelio filamentoso de aspecto algodonoso compacto, consistencia seca a húmeda y su desarrollo, en función de la cepa, puede ser radial, concéntrico-radial y radial-concéntrico (Cuadro 2). En los cultivos jóvenes se encontraron tonalidades claras y oscuras en su madurez (Figura 1) los resultados coinciden de alguna manera con los descritos por (Priyatmojo *et al.*, 2001; González *et al.*, 2006), evaluaron las características morfológicas del género *Rhizoctonia* spp., al describir la apariencia de tipo filamentoso de la colonia, de aspecto algodonoso con variaciones en la coloración desde pardo-claro hasta pardo-oscuro, dependiendo de la edad del cultivo.

**Cuadro 2.** Características macroscópicas de *Rhizoctonia* spp., 9 días después de su siembra descritas bajo la metodología de Ramírez *et al.* (1998).

| Características macroscópicas de <i>Rhizoctonia</i> spp. |                 |                   |              |                     |                            |                            |
|--|-----------------|-------------------|--------------|---------------------|----------------------------|----------------------------|
| Cepa   | Tipo de colonia | Aspecto           | Consistencia | Desarrollo          | Color                      | Pigmento                   |
| R2   | Filamentoso     | Algodonoso, plano | Seca         | Radial              | Café-centro, crema-extremo | Difuso en el medio         |
| R3   | Filamentoso     | Algodonoso, plano | Seca         | Concéntrico, radial | Café-centro, crema-extremo | Difuso en el medio         |
| R4   | Filamentoso     | Algodonoso, plano | Seca         | Radial, concéntrico | Café oscuro                | Difuso en el medio         |
| R5   | Filamentoso     | Algodonoso, plano | Seca         | Concéntrico, radial | Café oscuro                | Circunscrito en la colonia |
| R6   | Filamentosa     | Algodonoso, plano | Húmeda       | Radial              | Café oscuro                | Difuso en el medio         |



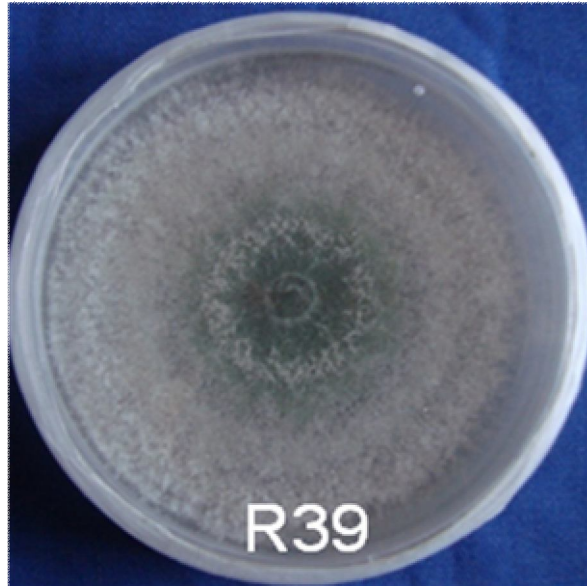
**Figura 1.** Morfología de *Rhizoctonia* spp., durante la etapa juvenil presenta tonalidades claras cepa R2, (izquierda), a través del tiempo contrasta a pigmentación oscura cepa R3 (derecha).



La caracterización macroscópica de las cinco cepas empleadas de *Trichoderma* spp. demostró que poseen micelio filamentoso y compacto, de consistencia húmeda, desarrollo concéntrico, con tonalidades blancas en zona de crecimiento y verde en la región de madurez (Cuadro 3 y Figura 2). Los resultados obtenidos se asemejan o los descritos por Suarez *et al.* (2008), al evaluar los aislamientos; TCN-009, TCN-010, TCN-014 pertenecientes a *Trichoderma harzianum*, evidenciaron un rápido crecimiento de forma concéntrica con aspecto de polvillo, acompañado de una pigmentación blanca con verde olivo.

**Cuadro 3.** Características macroscópicas de cinco cepas de *Trichoderma* spp., 2 días después de su siembra bajo la metodología de Ramírez *et al.* (1998).

| <b>Características macroscópicas de <i>Trichoderma</i> spp.</b> |                        |                |                     |                   |              |                            |
|---|------------------------|----------------|---------------------|-------------------|--------------|----------------------------|
| <b>Cepa</b>   | <b>Tipo de colonia</b> | <b>Aspecto</b> | <b>Consistencia</b> | <b>Desarrollo</b> | <b>Color</b> | <b>Pigmentó</b>            |
| <b>R39</b>  | Filamentosa            | Compacto       | Húmeda              | Concéntrico       | Blanco-verde | Circunscrito en la colonia |
| <b>R40</b>  | Filamentosa            | Compacto       | Húmeda              | Concéntrico       | Blanco-verde | Circunscrito en la colonia |
| <b>R41</b>  | Filamentosa            | Compacto       | Húmeda              | Concéntrico       | Blanco-verde | Circunscrito en la colonia |
| <b>R44</b>  | Filamentosa            | Compacto       | Húmeda              | Concéntrico       | Blanco-verde | Circunscrito en la colonia |
| <b>GT5</b>  | Filamentosa            | Compacto       | Húmeda              | Concéntrico       | Blanco       | Circunscrito en la colonia |

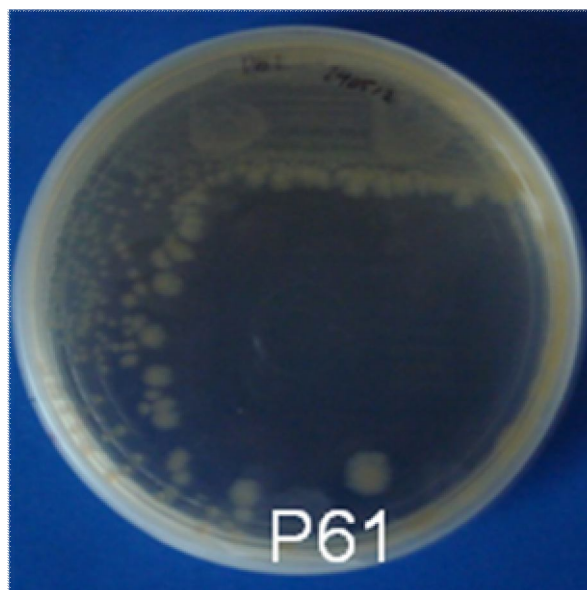


**Figura 2.** Morfología de *Trichoderma* spp., cepa 39 mostrando su característico crecimiento concéntrico, además de su coloración verde en la zona de madurez y blanco en el área de crecimiento.

Con lo que respecta a las cepas bacterianas con potencial antagónico, macroscópicamente, tienen forma circular de borde entero, ondulado y lobulado, su elevación puede ser plana, elevada o umbonada, de textura membranosa y butirosa, presentan tonalidades claras a oscuras (Cuadro 4 y Figura 3) Dichas características fueron tomadas de la metodología de Ramírez *et al*, (1998).

**Cuadro 4.** Características macroscópicas de las cepas bacterianas con potencial antagonico empleadas en el estudio de biocontrol, 5 días después de su siembra bajo la metodología de Ramírez *et al.*, (1998).

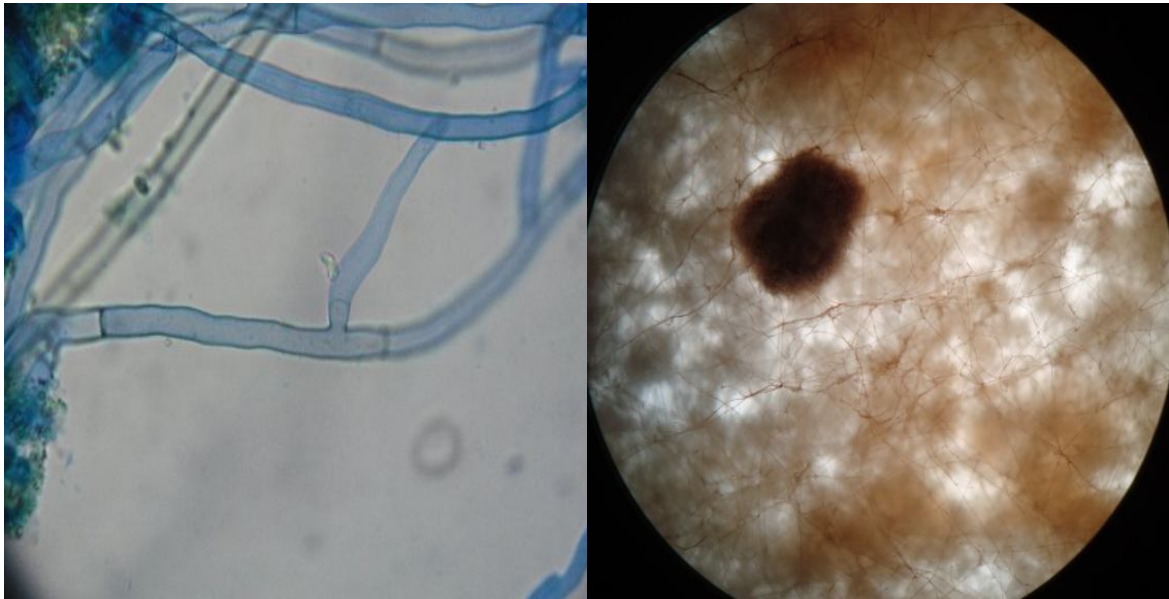
| Cultivo | Forma    | Borde    | Elevación | Textura    | Color                              |
|---------|----------|----------|-----------|------------|------------------------------------|
| P61     | Circular | Entero   | Convexa   | Membranosa | Café-amarillo y difuso en el medio |
| P14     | Amiboide | Lobulado | Elevada   | Membranosa | Crema circunscrito a la colonia.   |
| P23     | Circular | Entero   | Elevada   | Membranosa | Crema circunscrito a la colonia.   |
| A46     | Circular | Ondulado | Elevada   | Membranosa | Crema circunscrito a la colonia.   |
| R11     | Amiboide | Entero   | Plana     | Membranosa | Blanco circunscrito a la colonia.  |
| R44     | Circular | Entero   | Elevada   | Membranosa | Blanco circunscrito a la colonia.  |
| OLS-SF3 | Circular | Ondulado | Convexa   | Membranosa | Crema circunscrito a la colonia.   |
| BSP1.1  | Circular | Lobulado | Plana     | Butirosa   | Crema circunscrito a la colonia.   |



**Figura 3.** Morfología de cepa bacteriana con potencial antagonico (P61), mostrando su típica pigmentación café-amarillo, bajo la técnica de estriado para su siembra.

### 6.1.2 Caracterización microscópica de las cepas involucradas en el biocontrol

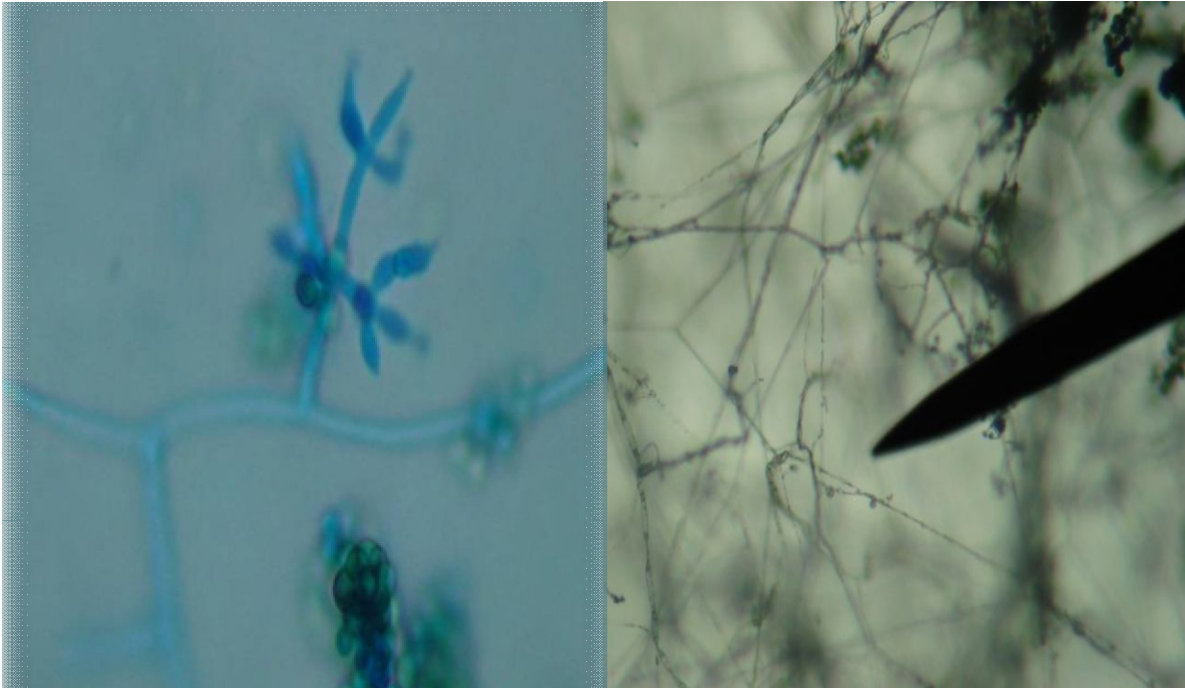
En la evaluación microscópica de las cinco cepas de *Rhizoctonia* spp. (R2, R3, R4, R5 y R6) se encontró que poseen micelio septado, con ramificaciones en un ángulo recto, de pigmentación clara en su etapa juvenil, que a través del tiempo se tornan oscuras (Figura 4). Estos resultados coinciden con los atributos citados por (Paulitz y Schroeder, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2006) quienes mencionan las características típicas de *Rhizoctonia* spp que incluyen micelio septado, constricción de la hifa al punto de origen de la ramificación hifal cercana al septo y tonalidades del micelio que van desde el claro hasta el oscuro dependiendo de la edad de la cepa, además de la presencia de estructuras de resistencia (esclerosios), de forma esférica de color blanco durante su formación, que al llegar a la madurez su pigmentación se torna parda-oscuro.



**Figura 4.** Características microscópicas de *Rhizoctonia* spp. observadas al microscopio óptico y estereoscópico. Micelio septado y ramificación en ángulo recto, estructura típica del patógeno (izquierda) a 10 X; micelio maduro con pigmentación oscura, además de formación de estructura de resistencia (esclerocio) observada al Microscopio estereoscopio (derecha).

*Trichoderma* spp., presenta micelio septado, poseen conidióforos hialinos que son ramificaciones que se desprenden de la hifa principal y pueden presentarse en par o solitarios. Estos sostienen a las fialides que pueden ser únicas o en par, incoloras y localizadas en ángulo recto con respecto al conidióforo; sus conidios son subglobosos y crecen en masa sobre los ápices de las fialides (Figura 5). Las cepas R39, R40, R41 y R44 presentaron estructuras de resistencia intercalares o terminales denominadas clamidosporas. Estas características concuerdan con las descritas por Suarez *et al.* (2008), al evaluar a través de observaciones al microscopio; evidenciaron micelio septado, además de ramificaciones de la hifa principal (conidióforos), que a su vez sostiene estructuras cortas en forma de

botella (fialides), con un conidio o varios en la extremidad de forma globosa de color verde (esporas).



**Figura 5.** Características microscópicas de *Trichoderma* spp. A la izquierda, se observa un conidióforo sosteniendo a las fialides, además de las conidias (esporas). A la derecha, la aguja señala una clamidospora intercalar observada a 10 X.

En lo referente a las características microscópicas de las ocho cepas bacterianas con potencial antagónico evaluadas, se encontraron en su mayoría cocos en cadena, cocos en racimo y bacilos. Con base a la tinción de Gram la mayoría de las cepas fueron de tipo Gram negativo (G -) (Cuadro 5). Los resultados se comparan a los descritos por Reyes *et al.* (2011) mencionan la importancia de la

técnica de Gram, que define la forma tan variada que presentan las bacterias durante su estudio.

**Cuadro 5.** Caracterización microscopica del conjunto de cepas bacterianas con potencial antagónico.

| <b>Cepa</b>    | <b>Forma</b>                                  | <b>Gram</b> |
|----------------|---|-------------|
| <b>P14</b>     | Cocos en cadena (estreptococos)               | +           |
| <b>P23</b>     | Cocos en racimo (estafilococos)               | -           |
| <b>P61</b>     | Bacilos cortos en cadena dobles (cocobacilos) | -           |
| <b>A46</b>     | Cocos en cadena (estreptococos)               | +           |
| <b>R11</b>     | Cocos en cadena (estreptococos)               | +           |
| <b>R44</b>     | Cocos en cadena (estreptococos)               | -           |
| <b>BSP1.1</b>  | Cocos en cadena (estreptococos)               | -           |
| <b>OLS-SF3</b> | Cocos en cadena (estreptococos)               | -           |

## 6.2. Control *in vitro* de *Rhizoctonia* spp.

### 6.2.1 Experimento 1. Confrontación *in vitro* de *Trichoderma* spp. vs *Rhizoctonia* spp. cepa (R2)

En la evaluación de los cultivos duales de las cepas (R39, R40, R41, R44 y GT5) de *Trichoderma* spp. sobre la cepa (R2) del patógeno *Rhizoctonia* spp. bajo condiciones *in vitro*. Al tercer día de la confrontación se observó la interacción física entre las hifas de ambos hongos. Al respecto Arzate-Vega *et al.* (2006) reportaron contacto a las 24 h después de haber inoculado las cepas de *Trichoderma* spp, todas las cepas hicieron contacto con *Mycosphaerella fijiensis* y el número de días al primer contacto entre las hifas fue el mismo para las 8 cepas estudiadas. De acuerdo a los análisis estadísticos, se encontraron diferencias altamente significativas ( $P=0.01$ ) entre las especies de *Trichoderma* en su habilidad para inhibir el crecimiento de *Rhizoctonia* spp. Al evaluar el porcentaje de área ocupada por el antagonista (PAOA), fue estadísticamente diferente entre las cepas ensayadas. Al quinto día se observó que (GT5) logró colonizar la placa al 100 % sobre el patógeno que inicialmente fue sembrado. Así mismo R39 y R41 tuvieron un crecimiento estadísticamente similar al invadir el 43.52 y 45.48 %, diferenciándose de R40 al cubrir el 39.60 % del área de la placa, colonizadas inicialmente con el patógeno, seguidas por R44 con el 36.46% del espacio de la placa que inicialmente fue sembrada, sobre el patógeno. Al evaluarse el crecimiento diario de las cepas ensayadas de *Trichoderma* spp.; R39, R40, R41, R44 y GT5, se incrementó desarrollando un halo miceliar de 36, 35, 38, 31 y 85



mm respectivamente, a diferencia del crecimiento micelial del patógeno; 27, 37, 40, 44 y 39 mm, hasta el tercer día, momento en el que ocurre el contacto físico entre organismos. Así mismo Torres *et al.* (2008) al evidenciar a 28°C el crecimiento diario de hongos antagonistas, se incrementó obteniéndose que en cinco días *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* y *Trichoderma virens*, desarrollaron un halo micelial de 90, 88 y 80 mm respectivamente a diferencia del patógeno *Cladosporium fulvum* que tuvo un desarrollo de 8 mm. Transcurridos nueve días del enfrentamiento el PAOA; R39 y R41 fue estadísticamente igual, al colonizar el 99.21 y 98.82 %, a si mismo R40 ocupó el 87.05 %, en contraste con R44 al invadir el 64.30 % del espacio de la placa, con un crecimiento micelial de 84, 84, 74 y 54 mm respectivamente, quedando reducido el desarrollo del patógeno en comparación con el control (Cuadro 6 y 7).

**Cuadro 6.** Efecto antagónico de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento micelial de *Rhizoctonia* spp., en cultivos duales.

| Cepas de <i>Trichoderma</i><br>spp. | Diámetro de la colonia<br>(mm) |      |      | (PCRA)  |        |        |
|-------------------------------------|--------------------------------|------|------|---------|--------|--------|
|                                     | 3dde                           | 5dde | 9dde | 3dde    | 5dde   | 9dde   |
| <b>GT5</b>                          | 35                             | 85   | 85   | 41.56a  | 100a   | 100a   |
| <b>R41</b>                          | 34                             | 38   | 84   | 39.99a  | 45.48b | 98.82a |
| <b>R39</b>                          | 30                             | 36   | 84   | 35.29ab | 43.52b | 99.21a |
| <b>R40</b>                          | 27                             | 34   | 74   | 31.76b  | 39.60c | 87.05b |
| <b>R44</b>                          | 27                             | 31   | 54   | 32.54b  | 36.46d | 64.30c |

(PCRA)= Porcentaje de Crecimiento Radial del Antagonista.

dds= días después del enfrentamiento.

Medias en cada columna seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes Tukey (P= 0.05)

**Cuadro 7.** Crecimiento radial de *Rhizoctonia* spp. en cultivos duales en presencia de diferentes cepas de *Trichoderma* spp.

| Tratamientos  | Diámetro de la colonia (mm) |      | (PCRP)  |         |
|---------------|-----------------------------|------|---------|---------|
|               | 3dde                        | 5dde | 3dde    | 5dde    |
| <b>R2</b>     | 46                          | 85   | 54.90a  | 100a    |
| <b>R2-R44</b> | 44                          | 44   | 51.76a  | 51.76b  |
| <b>R2-R41</b> | 40                          | 40   | 47.44a  | 47.44b  |
| <b>R2-GT5</b> | 39                          | 39   | 46.66a  | 46.66b  |
| <b>R2-R40</b> | 37                          | 37   | 44.31ab | 44.31bc |
| <b>R2-R39</b> | 27                          | 27   | 32.15b  | 32.15c  |

(PCRP)= porcentaje de crecimiento radial del patógeno.

dds= días después del establecimiento.

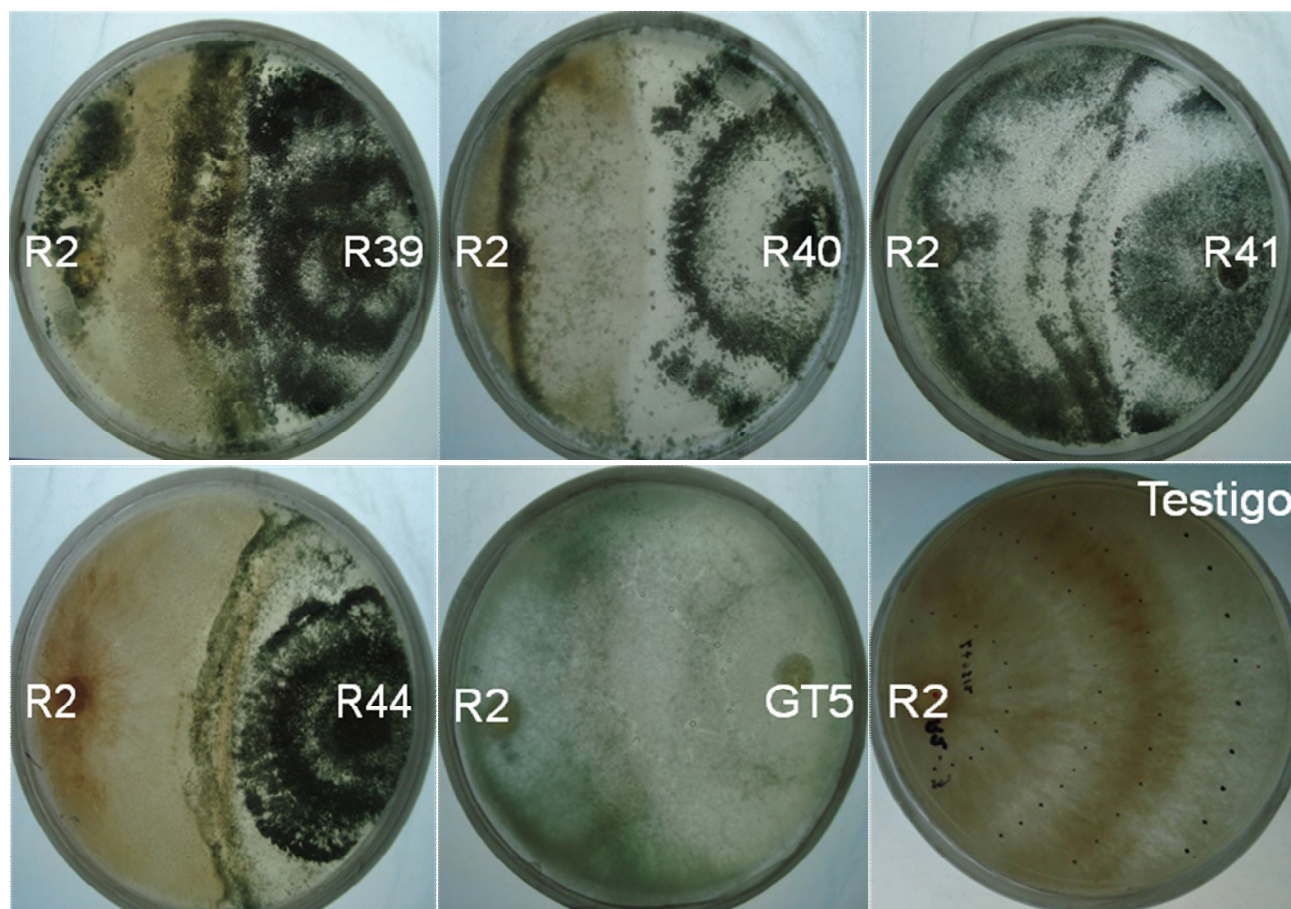
(R2)= Cepa de *Rhizoctonia* spp.

(R40, R44, R41, R39 y GT5)=Cepas de *Trichoderma* spp.

Columnas con la misma letra no tienen diferencia estadística significativa (Tukey, P=0.05)

A través de los bioensayos se observó inhibición, con una pigmentación (amarillo-café) en la zona de interacción acompañado de la destrucción del micelio fúngico, debido a que *Trichoderma* produce antibióticos y enzimas degradadoras de la pared celular. Para dar lugar a un marcado efecto hiperparasítico, que se manifiesta en la reducción del desarrollo micelial del patógeno. Por lo tanto los resultados encontrados en la investigación, muestran que las cepas de *Trichoderma* spp. ejercieron antagonismo sobre el patógeno *Rhizoctonia* spp. mediante el mecanismo de acción tipo micoparasitismo que se pudo observar, ya

que las cinco cepas ensayadas crecieron sobre el patógeno colonizándolo y degradando sus paredes celulares, mediante actividades enzimáticas, que anteceden al micoparasitismo. Michel *et al.* (2005) encontraron diferencias en la producción de enzimas; *Trichoderma harzianum* (Thzcf-9, Thzcf-6 y Thzcf-2) produjeron la mayor cantidad de quitinasas presentando un efecto antagónico, al inhibir del 19 al 33 % y del 20 al 35 % el crecimiento del micelio de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium subglutinas*, respectivamente. Para glucanasas, *Trichoderma Koningii* (TKcf-2) y *Trichoderma harzianum* (Thzcf-6) logrando la producción más alta y manifestaron mayor efecto de inhibición, al reducir entre el 27 y 34 % y del 20 al 35 % el crecimiento miceliar de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium subglutinas*, respectivamente. (Ezziyyani *et al.*, 2004; Suarez *et al.*, 2008), quienes mencionan que el micoparasitismo es el principal mecanismo de *Trichoderma* spp. el cual envuelve a su hospedero y secreta enzimas que degradan la pared celular, luego continua la retracción de la membrana plasmática y finalmente la desorganización del citoplasma. Lo cual corrobora que las cepas usadas en los bioensayos poseen habilidades antagónicas debido al sinergismo de sus mecanismos de acción, que juegan un papel importante en la reducción y destrucción de patógeno *Rhizoctonia* spp. (Figura 6).



**Figura 6.** Bioensayos de antagonismos *in vitro* de *Trichoderma* spp. frente a *Rhizoctonia* spp. Se puede observar que el antagonista ejerció actividad de biocontrol por encima del testigo, sobrecreciendo en su área de acción al inhibir el avance de crecimiento de la colonia del patógeno debido a la secreción de sustancias (antibióticos y enzimas) para dar lugar al micoparasitismo.

### 6.2.2 Experimento 2. Confrontación *in vitro* de *Trichoderma* spp. vs *Rhizoctonia* spp., cepa (R5)

Durante la evaluación de las cepas de *Trichoderma* spp. (R39, R40, R41, R44 y GT5), mostraron efecto antagónico contra *Rhizoctonia* spp. cepa (R5) en los cultivos duales realizados previamente *in vitro*, a los tres días de la confrontación se observó el contacto entre las hifas de ambos organismos. Así mismo Michel-Aceves *et al.* (2009), reportaron que las hifas de *Fusarium* tuvieron contacto con las hifas de *Trichoderma* en diferentes tiempos; ambas especies de *Fusarium*, a pesar de que se les dieron tres días de ventaja por su crecimiento lento, se observó que *Trichoderma* se comportó como hiperparásito, los valores oscilaron entre 2 y 3 días en el caso de *Fusarium subglutinans* y entre 3 y 4 para *Fusarium oligrandum*. Al evaluar el Porcentaje de Crecimiento Radial del Antagonista (PCRA), se obtuvieron diferencias altamente significativas ( $P=0.01$ ), en cada enfrentamiento. Al quinto día el (PCRA) fue estadísticamente diferente, se observó que GT5, colonizó la placa en un 100 % sobre el patógeno que inicialmente fue sembrada, además R39 y R41, tuvieron un crecimiento similar estadísticamente del 47.05 y 45.09 %, respectivamente, así mismo R40 con el 38.43 % del área de la placa colonizadas inicialmente con el patógeno, diferenciándose de R44 al invadir el 36.07 % del espacio de la placa que inicialmente fue sembrada sobre el patógeno, el radio de crecimiento de las cepas de *Trichoderma* spp.; R39, R40, R41, R44 y GT5, aumentó desarrollando un halo miceliar de 40, 32, 38, 30 y 85 mm, mientras que el crecimiento del patógeno mostró un diámetro miceliar de 37,

31, 30, 31 y 28 mm respectivamente hasta el tercer día, momento en el que se observó el contacto físico con el antagonista. (Alarcón *et al.*, 2005) demostraron que *Trichoderma harzianum* presentó *in vitro*, una elevada actividad antagónica e hiperparasítica contra *Rhizoctonia solani* y *Pyricularia grisea* al colonizar totalmente a ambos patógenos 120 h después de su siembra. Nueve días después del enfrentamiento el (PCRA); R40 y R41 presento diferencias estadísticamente, al colonizar el 89.80 y 99.60 % respectivamente, de la misma manera R39 ocupo el 85.87 %, a diferencia de R44 al invadir el 81.95 % del diámetro de la placa, con un crecimiento micelial de 73, 84, 72 y 70 mm respectivamente, quedando reducido el desarrollo del patógeno en comparación con el testigo (Cuadro 8 y 9). Rivas y pavone, (2010), señalan que las cepas TVC36 (*Trichoderma theobromicola*, *Trichoderma koningiopsis*, *Trichoderma ovalisporum*, *Trichoderma asperellum*) y TVC37 (*Trichoderma virens*); lograron colonizar toda la placa en el menor tiempo (9 días) mientras que las cepas TVC18 (*Trichoderma harzianum*) y TVC56 (*Trichoderma koningiopsis*, *Trichoderma ovalisporum*) solo colonizaron parte de la colonia de *Crinipellis pernicioso* entre los 9 y 16 días.

**Cuadro 8.** Efecto antagónico de *Trichoderma* spp., sobre el crecimiento micelial de *Rhizoctonia* spp. a través de bioensayos.

| Cepas de <i>Trichoderma</i><br>spp. | Diámetro de la colonia<br>(mm) |      |      | (PCRA)  |         |         |
|-------------------------------------|--------------------------------|------|------|---------|---------|---------|
|                                     | 3dde                           | 5dde | 9dde | 3dde    | 5dde    | 9dde    |
| <b>GT5</b>                          | 42                             | 85   | 85   | 49.79a  | 100a    | 100a    |
| <b>R41</b>                          | 28                             | 39   | 84   | 33.33b  | 45.09bc | 99.60a  |
| <b>R40</b>                          | 30                             | 33   | 76   | 35.68b  | 38.43cd | 89.80b  |
| <b>R39</b>                          | 33                             | 40   | 73   | 39.21ab | 47.05b  | 85.87bc |
| <b>R44</b>                          | 26                             | 30   | 70   | 31.37b  | 36.07d  | 81.95c  |

(PCRA)= Porcentaje de Crecimiento Radial del Antagonista.

dde= días después del enfrentamiento.

Medias en cada columna seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey (P= 0.05)



**Cuadro 9.** Crecimiento radial de *Rhizoctonia* spp. en cultivos duales en presencia de diferentes cepas de *Trichoderma* spp.

| Tratamientos  | Diámetro de la colonia (mm) |      |      | (PCRP) |        |        |
|---------------|-----------------------------|------|------|--------|--------|--------|
|               | 3dde                        | 5dde | 7dde | 3dde   | 5dde   | 7dde   |
| <b>R5</b>     | 35                          | 52   | 85   | 41.95a | 61.95a | 100a   |
| <b>R5-R40</b> | 31                          | 31   | 31   | 36.07a | 36.07b | 36.07b |
| <b>R5-R44</b> | 31                          | 31   | 31   | 36.07a | 36.07b | 36.07b |
| <b>R5-R41</b> | 30                          | 30   | 30   | 35.68a | 35.68b | 35.68b |
| <b>R5-R39</b> | 37                          | 37   | 37   | 34.50a | 34.50b | 34.50b |
| <b>R5-GT5</b> | 28                          | 28   | 28   | 32.93a | 32.93b | 32.93b |

(PCRP)= Porcentaje de Crecimiento Radial del Patógeno.

dde= días después del enfrentamiento.

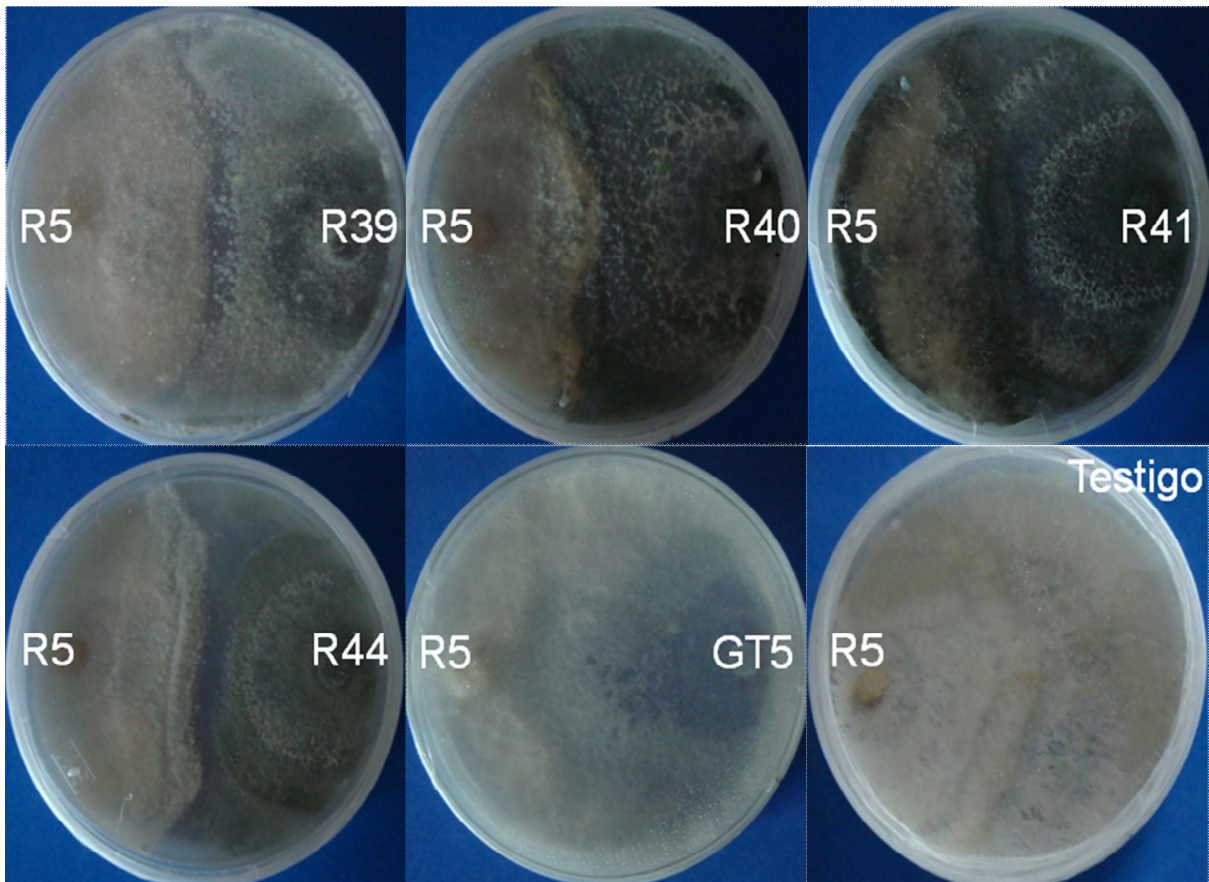
(R5)= Cepa de *Rhizoctonia* spp.

(R40, R44, R41, R39 y GT5)=Cepas de *Trichoderma* spp.

Columnas con la misma letra no tienen diferencia estadística significativa (Tukey, P=0.05)

Lo que se observó a través de los bioensayos fue la inhibición, acompañada de una pigmentación (amarillo-café) en la zona de confrontación seguida de la destrucción micelial, ya que *Trichoderma* produce antibióticos y enzimas que dañan la pared celular, seguido de un efecto hiperparasítico, que se manifiesta por el crecimiento micelial sobre el patógeno. Nuestros resultados están de acuerdo con los publicados por otros autores Ezziyyani *et al.* (2004). Observaron en ensayos *in vitro* que *Trichoderma harzianum* aumenta la actividad antifúngica sobrecreciendo y reduciendo la colonia del patógeno, *Phytophthora capsici*.

invadiendo su campo de crecimiento, quedando a los cuatro días la colonia del patógeno totalmente reducida en comparación con el control, efecto que se debe a la actividad enzimática. Por consiguiente Suarez *et al.* (2008) Mencionan la importancia de la actividad enzimática al degradar la pared celular del hospedero, dicho proceso limita el crecimiento y la actividad del hongo patógeno y algunas especies de *Trichoderma*. son conocidas por producir elevadas concentraciones de enzimas antecedidas al micoparasitismo. Esto se debió probablemente a que, como lo propone. Howel, (2003). El micoparasitismo se puede analizar en preparaciones al microscopio electrónico de barrido donde se observan las hifas de *Trichoderma harzianum* enrollando a las del patógeno e impidiendo su crecimiento. Lo que permite concluir que las cepas utilizadas en los bioensayos poseen habilidades antagónicas, debido a la actividad de sus mecanismos de acción, que intervienen en el biocontrol de *Rhizoctonia* spp. (Figura 7).



**Figura 7.** Capacidad antagonística de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia* spp. al inhibir el crecimiento del patógeno en comparación con el testigo, atribuido a la secreción de sustancias antifúngicas (enzimas y antibióticos) permitiendo sobrecrecer y esporular en su campo de acción seguido de la actividad del micoparasitismo.

### 6.2.3 Experimento 3. Enfrentamiento *in vitro* de ocho cepas bacterianas con potencial antagónico vs *Rhizoctonia* spp., cepas R2 y R5.

A través de bioensayos *in vitro*, se evaluó la confrontación entre cepas bacterianas (A46, P14, P23, P61, R11, R44, BSP1.1 y OLS-SF3) sobre cepas (R2 y R5) del patógeno *Rhizoctonia* spp. Al evaluar el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento del Patógeno (PICP), únicamente las cepas (A46, P61 y OLS-SF3) mostraron efecto antagónico al inhibir el crecimiento de *Rhizoctonia* spp., con efecto altamente significativo ( $P= 0.01$ ), al cuarto día del enfrentamiento, en todos los casos las bacterias; A46, P61 y OLS-SF3, se establecieron 72h antes que *Rhizoctonia* spp.; R2 y R5, al realizar la separación de medias el (PICP) fue estadísticamente diferente en cada tratamiento con el 46.79 y 37.43 %, así mismo se observó el 47.29 y 36.47 % diferenciándose del 31.17 y 32.94 % respectivamente frente al patógeno (Cuadro10). Resultados parecidos obtuvo Valencia-Cantera *et al.* (2005), a través de ensayos de antibiosis: cepa ZUM80 *Pseudomonas fluorescens*, además de cuatro cepas mutantes; ZUM8011Sid-, ZUM8026Sid-, ZUM8078Sid- y ZUM80111Sid- inhibieron el crecimiento de *Fusarium oxysporum*, en forma directamente relacionada con el tiempo de ventaja que tuvieron para establecerse en la caja Petri antes que el hongo. En todos los casos, cuando las bacterias se sembraron 72 ó 48 h antes que el hongo, la inhibición sobre éste fue prácticamente total.

**Cuadro 10.** Inhibición del crecimiento micelial de *Rhizoctonia* spp. por cepas bacterianas en cultivos duales.

| Cepas bacterianas | Diámetro de la colonia (mm) |    | (PICP)  |         |
|-------------------|-----------------------------|----|---------|---------|
|                   | 4dde                        |    |         |         |
|                   | R2                          | R5 | R2      | R5      |
| <b>A46</b>        | 39                          | 32 | 46.79ab | 37.43ab |
| <b>P61</b>        | 40                          | 31 | 47.29a  | 36.47ab |
| <b>OLS-SF3</b>    | 26                          | 26 | 31.17b  | 32.94ab |

(PICP)= Porcentaje de Inhibición del Crecimiento del Patógeno.

dde= días después del enfrentamiento

(R2 y R5)= Cepas de *Rhizoctonia* spp.

Letras iguales en los renglones no tienen diferencia estadística significativa (Tukey, P=0.05)

Debido a lo anterior podemos mencionar que el porcentaje de inhibición ejercido sobre *Rhizoctonia* pudo observarse a través de los bioensayos debido al establecimiento temprano de las bacterias en cada ensayo, además se observó que las colonias del patógeno, no entraron en contacto físico con las bacterias, acompañado de un cambio en la pigmentación del micelio fúngico. Lo anterior indica la existencia de metabolitos que requirieron tiempo para ser producidos y dispersarse en el medio de cultivo, repercutiendo en la reducción del crecimiento seguido de la destrucción micelial del patógeno en comparación con el testigo (cuadro 11). Reyes *et al*, (2011), evidenciaron que la cepa CBCK08 de *Bacillus* sp. produce metabolitos en medio artificial PDA, lo que permitió la inhibición del crecimiento de *Macrophomina phaseolina*. Adicionalmente la cepa, mostró tener actividad antifúngica *in vitro* contra *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. y *Colletotrichum*

sp. al inhibir el desarrollo miceliar con el 40, 35, 33 y 32 % respectivamente. La cepa inhibió a los fitopatógenos por competencia de espacio, así como por la producción de metabolitos difusibles en el medio, debido a la observación de halos de inhibición que no permitieron el contacto entre los microorganismos.

**Cuadro 11.** Crecimiento radial de *Rhizoctonia* spp. en presencia de diferentes cepas bacterianas a través de bioensayos.

| Tratamientos      | Diámetro de la colonia<br>(mm) |      | (PCRP) |        |
|-------------------|--------------------------------|------|--------|--------|
|                   | 4dde                           | 5dde | 4dde   | 5dde   |
| <b>R2</b>         | 67                             | 83   | 79.81a | 98.21a |
| <b>R5</b>         | 56                             | 75   | 66.33b | 88.66b |
| <b>R2-OLS-SF3</b> | 42                             | 42   | 49.80c | 49.80c |
| <b>R5-OLS-SF3</b> | 39                             | 39   | 45.87c | 45.87c |
| <b>R5-A46</b>     | 38                             | 38   | 44.70c | 44.70c |
| <b>R2-P61</b>     | 36                             | 36   | 42.35c | 42.35c |
| <b>R5-P61</b>     | 36                             | 36   | 42.34c | 42.34c |
| <b>R2-A46</b>     | 35                             | 35   | 41.95c | 41.95c |

(PCRP)= Porcentaje de Crecimiento Radial del Patógeno.

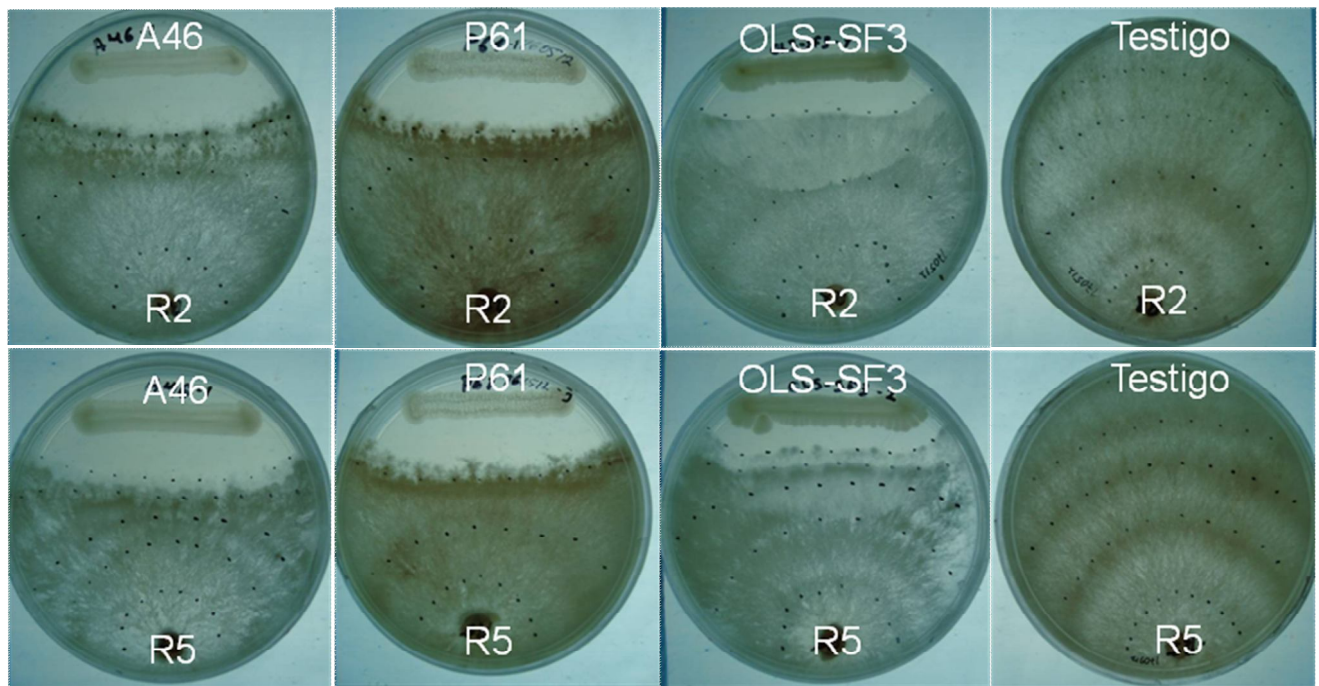
dde= días después del enfrentamiento.

(R2 y R5)= Cepas de *Rhizoctonia* spp.

(A46, P61 y OLS-SF3)= Cepas bacterianas.

Letras iguales en la misma columna no difieren los porcentajes estadísticamente de acuerdo con la prueba de Tukey (P=0.05)

Por lo anterior, las cepas bacterianas con efecto antagónico para el patógeno fueron P61, A46 y OLS-SF3. La evidencia de que las bacterias redujeran el crecimiento de *Rhizoctonia* demuestra el potencial antagónico ejercido por las cepas bacterianas ensayadas, debido a los días de ventaja sobre el patógeno dando tiempo a difundir sus metabolitos en el medio de cultivo al inhibir el crecimiento micelial, seguido de la destrucción del patógeno (figura 8)



**Figura 8.** Enfrentamiento *in vitro* de cepas bacterianas sobre *Rhizoctonia* spp., al inhibir el crecimiento micelial, debido a la producción de sustancias tóxicas (antibiosis), que al difundirse a través del medio de cultivo, frenaron el crecimiento del patógeno en comparación con el testigo.

#### 6.2.4 Experimento 4. Enfrentamiento *in vitro* de tres cepas bacterianas antagonicas vs *Rhizoctonia* spp., cepas R3, R4 y R6

Las cepas bacteriana con efecto antagonico fueron enfrentadas a través de bioensayos *in vitro* con cepas del patógeno *Rhizoctonia* spp., al evaluar el radio de crecimiento del patógeno (RCP), fue diferente el grado de inhibición del crecimiento miceliar. En todos los eventos, el establecimiento de las bacterias (A46, P61 y OLS-SF3) se realizo 72 h antes que las cepas del patógeno (R3, R4 y R6), durante la evaluación del (RCP) hubo diferencias altamente significativas ( $P=0.01$ ) en cada tratamiento a los cuatro días de la confrontación, se obtuvieron diferencias estadísticas al realizar la comparación de medias con el 32.59, 33.70 y 34.46 % así mismo se observo el 37.50, 38.42 y 38.88 % diferenciándose del 28.24, 30.50 y 32.04 % respectivamente (Cuadro 12). Los resultados del presente trabajo coinciden con otros reportados en la literatura sobre el biocontrol de *Rhizoctonia* sp. en los que emplean cepas bacterianas. Reinoso *et al.* (2007) tuvieron resultados semejantes a los presentes en el control *in vitro* mediante cepas de *Bacillus* spp., al evaluar el efecto antifúngico, la mayoría de las cepas antagonistas produjeron metabolitos que inhibieron en más de 55% el crecimiento de *Rhizoctonia solani*. Bajo estas condiciones experimentales los metabolitos producidos por las cepas Q4 y Q5 fueron los de menor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de este hongo fitopatógeno.



**Cuadro 12.** Efecto de inhibición de las cepas bacterianas sobre el crecimiento micelial de *Rhizoctonia* spp.

| Cepas bacterianas | Diámetro de la colonia (mm) |    |    | (PICP)  |         |         |
|-------------------|-----------------------------|----|----|---------|---------|---------|
|                   | 4dde                        |    |    |         |         |         |
|                   | R3                          | R4 | R6 | R3      | R4      | R6      |
| <b>A46</b>        | 27                          | 28 | 29 | 32.59ab | 33.70ab | 34.46ab |
| <b>P61</b>        | 32                          | 33 | 33 | 37.50a  | 38.42a  | 38.88a  |
| <b>OLS-SF3</b>    | 24                          | 26 | 31 | 28.24b  | 30.50b  | 32.04ab |

(PICP)= Porcentaje de Inhibición del Crecimiento del Patógeno.

dde=días después del enfrentamiento.

(R3, R4 Y R6)=Cepas de *Rhizoctonia* spp.

Medias con letras iguales no presentan diferencias estadísticas significativas (Tukey, P=0.05)

El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial, ejercido sobre *Rhizoctonia* spp. pudo evidenciarse a través de los cultivos duales, debido al tiempo de ventaja de las bacterias en cada bioensayo, además se observó que las hifas del patógeno, no entraron en contacto físico con las bacterias, seguido de un cambio en la pigmentación micelial del hongo, esto se debió a la secreción de metabolitos a través del medio de cultivo, ocasionando inhibición micelial del patógeno en comparación con el testigo (Cuadro 13). Por otra parte Montealegre *et al.* (2003). Evaluaron a través de bioensayos *in vitro* tres cepas del género *Bacillus* spp. sobre *Rhizoctonia solani*, observaron un halo de inhibición acompañado de un cambio de la pigmentación del micelio, además de no existir el contacto físico entre ninguna de las bacterias y el fitopatógeno, debido a la presencia de metabolitos secretados por las bacterias.

**Cuadro13.** Crecimiento radial de *Rhizoctonia* spp. en cultivos duales en presencia de diferentes cepas bacterianas.

| Tratamientos      | Diámetro de la colonia (mm) |      | (PRCP)   |          |
|-------------------|-----------------------------|------|----------|----------|
|                   | 4dde                        | 5dde | 4dde     | 5dde     |
| <b>R3</b>         | 72                          | 84   | 84.58a   | 99.70a   |
| <b>R4</b>         | 60                          | 77   | 70.34b   | 90.19b   |
| <b>R6</b>         | 59                          | 76   | 69.17b   | 89.41b   |
| <b>R3-OLS-SF3</b> | 45                          | 45   | 52.94c   | 52.94c   |
| <b>R4-OLS-SF3</b> | 45                          | 45   | 52.15cd  | 52.15cd  |
| <b>R6-OLS-SF3</b> | 44                          | 44   | 51.75cd  | 51.75cd  |
| <b>R3-A46</b>     | 42                          | 42   | 49.79cde | 49.79cde |
| <b>R3-P61</b>     | 41                          | 41   | 48.23cde | 48.23cde |
| <b>R6-A46</b>     | 41                          | 41   | 48.23cde | 48.23cde |
| <b>R4-P61</b>     | 40                          | 40   | 47.84cde | 47.84cde |
| <b>R4-A46</b>     | 40                          | 40   | 47.04de  | 47.04de  |
| <b>R6-P61</b>     | 39                          | 39   | 45.48e   | 45.48e   |

(PCRCP)= Porcentaje de Crecimiento Radial del Patógeno.

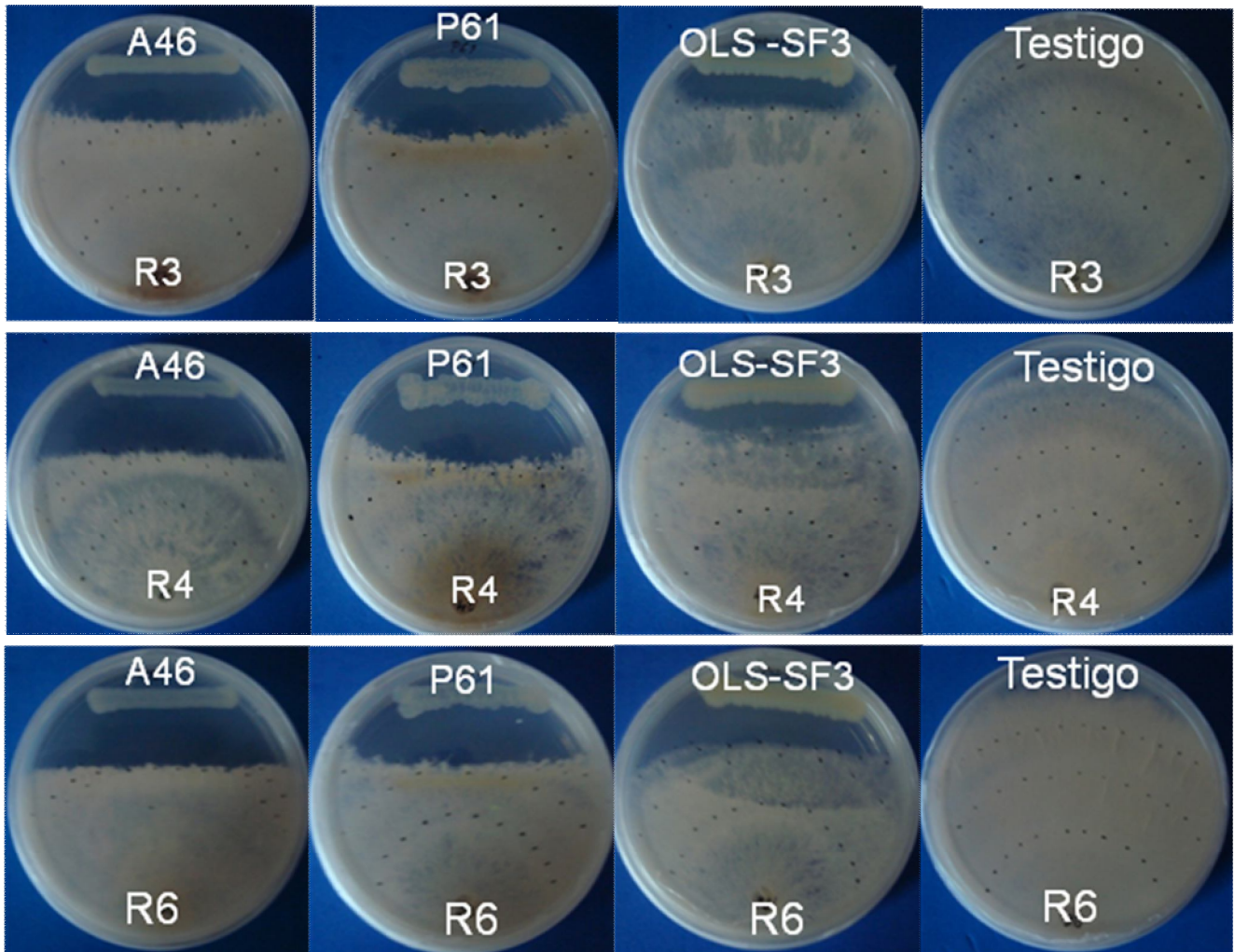
dde= días después del enfrentamiento.

(R3, R4 y R6)= Cepas de *Rhizoctonia* spp.

(A46, P61 y OLS-SF3)= Cepas bacterianas.

Las medias seguidas por una letra común en cada columna no son significativamente diferentes (Tukey, P=0.05)

Sin embargo la inhibición del crecimiento micelial de *Rhizoctonia* spp. ejercido por las bacterias ensayadas, demuestra el potencial que poseen como agentes de biocontrol, debido a su establecimiento temprano dando tiempo a difundir sus metabolitos en el medio de cultivo, para intervenir en la inhibición y destrucción del micelio del patógeno (figura 9).



**Figura 9.** Bioensayos *in vitro* de cepas bacterianas sobre *Rhizoctonia* spp., al inhibir el crecimiento micelial, debido a la acción de antibiosis (producción de metabolitos), que al difundirse sobre el medio de cultivo, frenaron el desarrollo del patógeno, en comparación con el testigo.

#### 6.2.5 Experimento 5. Enfrentamiento *in vitro* de *Rhizoctonia* spp. vs cepas bacterianas antagónicas, dispuestas una semana antes del patógeno

El efecto antagónico ejercido por las bacterias se evidencio a través de cultivos duales *in vitro* sobre cepas de *Rhizoctonia* spp., al evaluar el porcentaje de inhibición del crecimiento radial se observaron diferencias en la inhibición del diámetro de crecimiento miceliar de las cepas del patógeno (R2 y R5), debido al tiempo de ventaja de las bacterias (A46, P61 y OLS-SF3). En todos los tratamientos el establecimiento de las bacterias se realizo 7 días antes que el patógeno, al analizar el porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno (PICP) hubo diferencias altamente significativas ( $P=0.01$ ), en cada tratamiento al tercer día del enfrentamiento, al realizar la comparación de medias entre las variables, se obtuvieron diferencias estadísticamente; con el 52.85 y 60.10 %, así mismo se observo el 66.16 y 62.62 % a diferencia del 50.00 y 49.28 % respectivamente (Cuadro 14). Al respecto Orberá *et al.* (2009). Al evaluar la curva de inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos frente a cinco aislados bacterianos mostrando en todos los casos actividad inhibitoria al evidenciar alteraciones morfológicas que aparecen en las colonias fúngicas tales como el engrosamiento de los bordes en contacto con la zona de inhibición del crecimiento y la formación de regiones de lisis interna, similares a la autólisis que aparece en colonias en fase de decadencia. El porcentaje de inhibición del crecimiento de los hongos osciló entre el 51,69 y el 72,22%, valores alcanzados con los aislados SR/B-8 sobre *Colletotrichum* sp. CH-6 y SR/A-17 sobre *Fusarium oxysporum* CL-

20, respectivamente. El porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los hongos patógenos, reveló que los aislados SR/A-1 y SR/B-16 poseen actividad inhibitoria similar y superior al resto; un segundo grupo homogéneo se conformo con las bacterias SR/B-17 y SR/A-17. El aislado SR/B-8, el cual mostró los menores valores de porcentaje de inhibición del crecimiento *in vitro* de los hongos.

**Cuadro 14.** Efecto de inhibición de las cepas bacterianas en el crecimiento micelial de *Rhizoctonia* spp.

| Cepas bacterianas | Diámetro de la colonia (mm) |    | (PICP)  |          |
|-------------------|-----------------------------|----|---------|----------|
|                   | 3dde                        |    |         |          |
|                   | R2                          | R5 | R2      | R5       |
| <b>A46</b>        | 44                          | 51 | 52.85bc | 60.10abc |
| <b>P61</b>        | 56                          | 53 | 66.16a  | 62.62ab  |
| <b>OLS-SF3</b>    | 43                          | 42 | 50.00c  | 49.28c   |

(PICP)= Porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno.

dde=días después del enfrentamiento.

(R2 y R5)=Cepas de *Rhizoctonia* spp.

Medias seguidas por letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey P=0.05).

La inhibición ejercida sobre *Rhizoctonia* spp. a través de los cultivos duales fue evidente, respecto al margen de tiempo del establecimiento de las bacterias en cada evento, esto se debió a la secreción de compuestos tóxicos (metabolitos), además de la actividad enzimática al observar inhibición del crecimiento radial del hongo sin un contacto entre las cepas, acompañado de un cambio en la coloración micelial en la zona de confrontación en comparación con el testigo. (Cuadro 15).

Cazorla *et al.* (2006) mencionan que a través de un estudio en laboratorio, al

evaluar la cepa PCL1606 de *Pseudomonas fluorescens*; evidenciaron la capacidad que posee para producir enzimas como; lipasas y proteasas además de metabolitos con propiedades antimicrobiana. Así mismo Weller (2007) evaluó la capacidad que presenta *Pseudomonas fluorescens* en la producción de metabolitos como el pyrrolnitrin y pyoluteorin, con actividad antifungica.

**Cuadro 15.** Crecimiento radial de *Rhizoctonia* spp. a través de bioensayos en presencia de diferentes cepas bacterianas.

| Tratamientos      | Diámetro de la colonia<br>(mm) |      | (PCRP)  |        |
|-------------------|--------------------------------|------|---------|--------|
|                   | 3dde                           | 4dde | 3dde    | 4dde   |
| <b>R2</b>         | 50                             | 67   | 58.81a  | 79.21a |
| <b>R5</b>         | 45                             | 56   | 53.33ab | 66.66b |
| <b>R2-OLS-SF3</b> | 42                             | 42   | 49.80ab | 49.80c |
| <b>R5-A46</b>     | 39                             | 39   | 45.87b  | 45.87c |
| <b>R5-OLS-SF3</b> | 38                             | 38   | 44.70b  | 44.70c |
| <b>R2-P61</b>     | 36                             | 36   | 42.35b  | 42.35c |
| <b>R5-P61</b>     | 36                             | 36   | 42.34b  | 42.34c |
| <b>R2-A46</b>     | 35                             | 35   | 41.95b  | 41.95c |

(PCRP)= Porcentaje de crecimiento radial del patógeno.

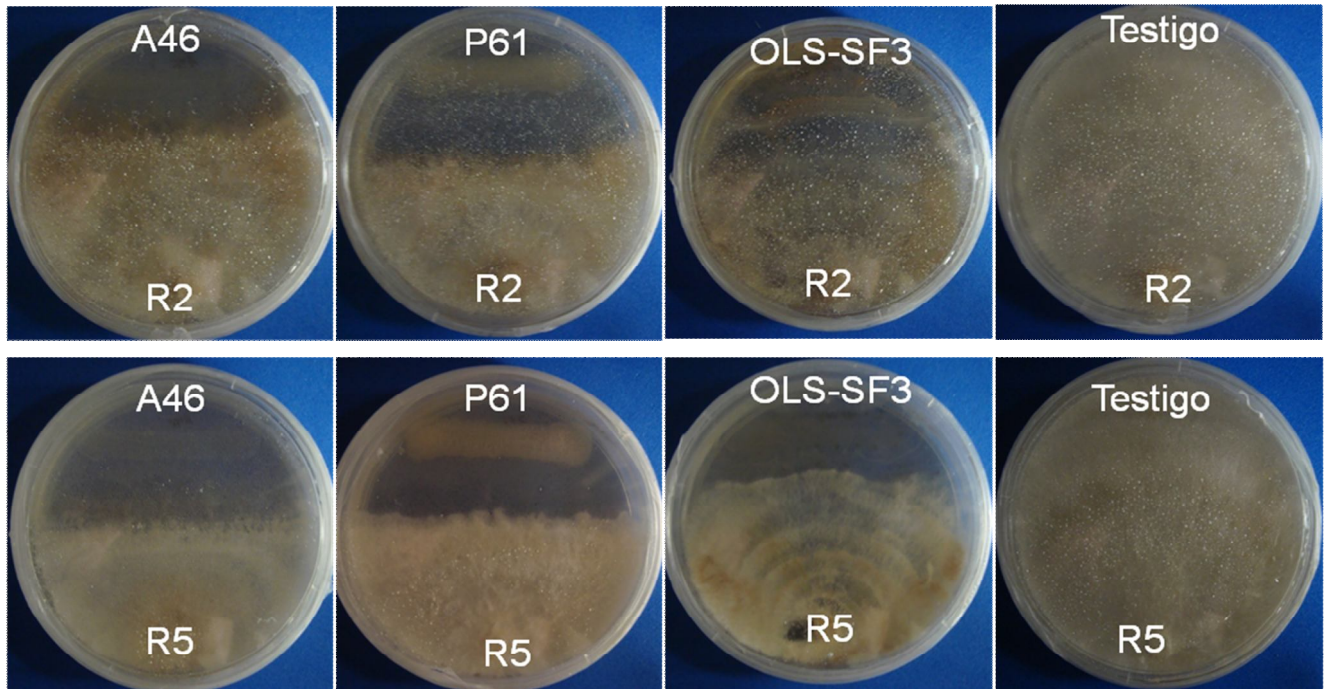
dde= días después del enfrentamiento.

(R2 y R5)= Cepas de *Rhizoctonia* spp.

(A46, P61 y OLS-SF3)= Cepas bacterianas.

Letras distintas en las columnas presentan diferencia estadística significativa (Tukey, P=0.05)

La evidencia de que las bacterias hayan inhibido el crecimiento radial de *Rhizoctonia* spp. demuestra el potencial antagónico ejercido por las cepas bacterianas ensayadas, debido a los días de ventaja sobre el patógeno dando tiempo a difundir sus metabolitos a través del medio de cultivo para intervenir en la reducción y destrucción del micelio del hongo (Figura 10).



**Figura 10.** Fenómeno de biocontrol *in vitro* de cepas bacterianas sobre *Rhizoctonia* spp., ejercido por la producción de sustancias antifúngicas (antibiosis), al inhibir el desarrollo del patógeno en comparación con el testigo.



#### 6.2.6 Experimento 6. Enfrentamiento *in vitro* de *Rhizoctonia* spp. vs cepas bacterianas antagónicas, dispuestas a un mes antes del patógeno.

A través de bioensayos *in vitro* se observó el efecto antagónico ejercido por las bacterias sobre cepas de *Rhizoctonia* spp. en medio de cultivo PDA, incubadas a 28° C, al evaluar el porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno (PICP) se observaron diferencias en la inhibición del diámetro de crecimiento micelial, debido al tiempo de ventaja de las bacterias; A46, P61, y OLS-SF3, el establecimiento de las bacterias se realizó 30 días antes que el patógeno (R2 y R5), se observaron diferencias altamente significativas ( $P=0.01$ ) entre los tratamientos a los dos días después de la confrontación, al comparar las medias de las variables no existieron estadísticamente diferencias en el (PICP), obteniendo el 93.58 y 89.71 %, así mismo se observó el 95.19 y 93.58 % a diferencia del 86.71 y 61.60 % respectivamente (Cuadro 16). Por otra parte Laguna-Laguna *et al.* (2001), evaluaron la inhibición del crecimiento de *Phytophthora capsici in vitro* utilizando los aislamientos B2, B3 y B10 de *Bacillus*. Ambas cepas redujeron de manera significativa ( $P=0.05$ ) el crecimiento del patógeno; B2 inhibió el crecimiento del patógeno en un 41%, B3 en 34% y B10 en 33%.

**Cuadro 16.** Capacidad de inhibición de las cepas bacterianas en el crecimiento micelial de *Rhizoctonia* spp.

| Cepas bacterianas | Diámetro de la colonia (mm) |    | (PICP) |        |
|-------------------|-----------------------------|----|--------|--------|
|                   | 2dde                        |    |        |        |
|                   | R2                          | R5 | R2     | R5     |
| <b>A46</b>        | 79                          | 79 | 93.58a | 86.71a |
| <b>P61</b>        | 81                          | 79 | 95.19a | 93.58a |
| <b>OLS-SF3</b>    | 73                          | 52 | 86.71a | 61.60a |

(PICP)= Porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno.

dde=días después del enfrentamiento.

(R2 y R5)=Cepas de *Rhizoctonia* spp.

Medias en cada columna seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey (P=0.05).

El porcentaje de inhibición ejercido sobre *Rhizoctonia* a través de los bioensayos fue evidente, debido al tiempo de ventaja de las bacterias en cada evento, esto se debió a la producción de compuestos difusibles (antibiosis), además de la actividad enzimática al observar la inhibición del crecimiento radial del hongo sin un contacto entre las cepas, acompañado de un cambio en la pigmentación y destrucción del micelio en comparación con el control (Cuadro 17). Por consiguiente Rojas-Ruíz *et al.* (2010), evidenciaron el efecto antagónico ejercido por bacterias pigmentadas *Pseudomonas fluorescens* sobre varias cepas de *Bacillus thuringiensis* y otros *Bacillus in vitro* debido a la secreción de algún compuesto tóxico; metabolitos, entre estos están los clasificados como antibióticos y los de tipo bacteriocina.

**Cuadro 17.** Crecimiento radial de *Rhizoctonia* spp. en cultivos duales en presencia de diferentes cepas bacterianas.

| Tratamientos | Diámetro de la colonia<br>(mm) |      | (PCRP)  |         |
|--------------|--------------------------------|------|---------|---------|
|              | 2dde                           | 3dde | 2dde    | 3dde    |
| R2           | 12                             | 38   | 14.503a | 45.097a |
| R5           | 11                             | 35   | 12.936a | 41.173a |
| R5-OLS-SF3   | 8                              | 8    | 9.223b  | 9.223b  |
| R5-A46       | 7                              | 7    | 8.235b  | 8.123b  |
| R2-OLS-SF3   | 7                              | 7    | 8.235b  | 8.123b  |
| R2-A46       | 4                              | 4    | 4.700c  | 4.700c  |
| R5-P61       | 4                              | 4    | 4.700c  | 4.700c  |
| R2-P61       | 3                              | 3    | 3.523c  | 3.523c  |

(PCRP)= Porcentaje de crecimiento radial del patógeno.

dde= días después del enfrentamiento.

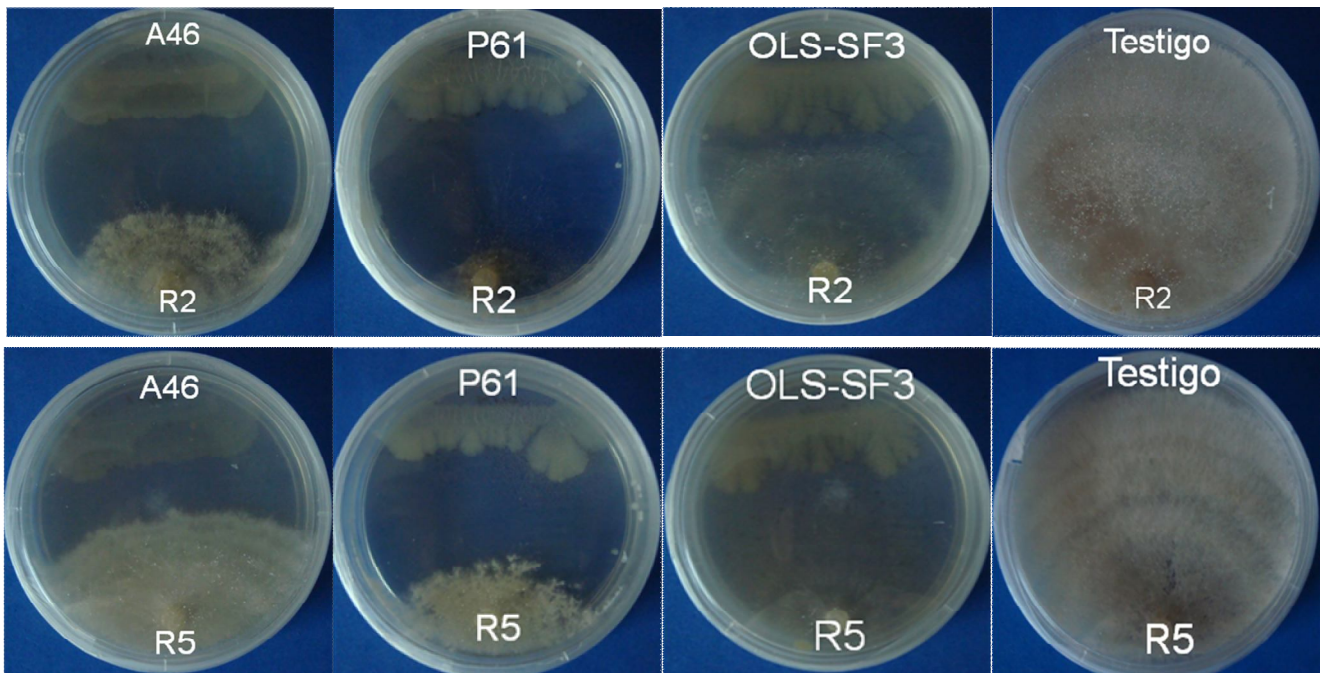
(R2 y R5)= Cepas de *Rhizoctonia* spp.

(A46, P61 y OLS-SF3)= Cepas bacterianas.

Medias con letras iguales no presentan diferencias estadísticas diferentes (Tukey, P=0.05)

Los resultados confirman lo documentado en la literatura, respecto al sinergismo que ejercen los mecanismos de acción involucrados en la interacción antagonista-patógeno debido a que afecta el crecimiento y actividad del fitopatógeno para beneficio del agente (antagonista). Sin embargo el hecho de que las bacterias hayan reducido el crecimiento de *Rhizoctonia* spp. demuestra la capacidad

antagónica que poseen las bacterianas ensayadas, debido al tiempo de ventaja sobre el patógeno dando tiempo a la secreción de sustancias tóxicas (antibiosis), a través del medio de cultivo, frenando el avance de crecimiento, seguido de la destrucción micelial de *Rhizoctonia* spp. (Figura 11).



**Figura 11.** Confrontación de *Rhizoctonia* spp con cepas bacterianas a través de bioensayos *in vitro*, al inhibir el crecimiento del patógeno, debido a la producción de sustancias antifúngicas (antibiosis), en comparación con el testigo.

## 7. CONCLUSIONES

- La caracterización macro y microscópica de los organismos involucrados en el estudio, permitió su plena identificación facilitando su manejo.
- Las pruebas bajo condiciones de laboratorio determinan la capacidad antagónica de los microorganismos, para posteriores ensayos en los sistemas agrícolas.
- La temperatura de 28°C permitió el crecimiento óptimo de *Trichoderma* spp. así como para las bacterias, además de una buena interacción antagónica frente al patógeno *Rhizoctonia* spp.
- La cepa GT5 de *Trichoderma* spp. mostró el mayor efecto hiperparasítico sobre *Rhizoctonia* spp.
- Las cinco cepas de *Trichoderma* spp. mostraron actividad antagónica *in vitro*, contra *Rhizoctonia* spp.

- En la interacción hongo antagonista-hongo patógeno en condiciones *in vitro*, el micoparasitismo fue el principal mecanismo de acción.
- De las ocho cepas bacterianas A46, P61 y OLS-SF3, se seleccionaron como promisorias para el control biológico *in vitro* del hongo *Rhizoctonia* spp.
- En la relación bacteria antagonista-hongo patógeno en condiciones *in vitro*, la antibiosis es el principal mecanismo de acción.
- El tiempo de pre-exposición de la bacteria con el hongo, es un factor fundamental para que la inhibición del patógeno se lleve a cabo.

## **8. RECOMENDACIONES**

- Realizar estudios que comprueben el biocontrol de los antagonistas utilizados en la investigación, frente a los aislamientos del patógeno estudiado mediante pruebas de invernadero y campo.
  
- Evaluar a través de pruebas cuantitativas que permitan determinar dosis eficientes de estos biocontroladores en el cultivo de lechuga, y su capacidad protectora a través del tiempo sin encarecer los costos de producción.

## IX. REFERENCIAS

### 9.1 Bibliograficas

ADIYAMAN, T., SCHISLER, D. A., SLININGER, P. J., SLOAN, J. M., JACKSON, M. A., and ROONEY, A. P. 2011. Selection of biocontrol agents of pink rot based on efficacy and growth kinetics index rankings. *Plant Dis.* 95:24-30.

AGRIOS, G 1991. *Fitopatología*. Editorial. Limusa. México. 506 – 513 p.

ALARCÓN, P. L., REYES, R. T., RODRÍGUEZ, G. G., y PUPO Z. A. 2005. Efectividad *in vitro* de *Trichoderma harzianum* (Rifai) en el biocontrol de *Rhizoctonia solani* Kunh y *Pyricularia grisea* (Sacc.) en el cultivo de arroz (*Oriza sativa* L.). *Fitosanidad* 9: 57-60

ALINA, F. P. M., VILLA, E., TORRES, J. F., SANTO, T., y DELFA, R. 2005. Influencia de la concentración de ácido Glutámico y glicerol en la síntesis de metabolitos microbianos de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PSS 36(3):14-19.

ANDERSON, M. G., BEYER, D. M., and WUEST, P. J. 2001. Yield comparison of hybrid *Agaricus* mushroom strains as a measure of resistance to *Trichoderma* green mold. *Plant Dis.* 85:731-734.

ARZATE-VEGA, J., MICHEL-ACEVES, A. C., DOMÍNGUEZ-MÁRQUEZ, V. M., y SANTOS-ENERTISNA, O. A. 2006. Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la sigatoka negra del plátano (*Musa* sp) *in vitro* e invernadero. *Revista Mexicana de fitopatología* 24:98-104.

AQUINO-MARTÍNEZ, J. G., VÁZQUEZ-GARCÍA, L. M. y REYES-REYES, B. G. 2008. Biocontrol *in vitro* e *in vivo* de *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *dianthi* (Prill. Y Delacr.) Snyder y Hans. Con hongos antagonistas nativos de la zona florícola de Villa Guerrero, Estado de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26:127-137

BAUTISTA, B. S. 2006. El control biológico en la reducción de enfermedades potcosecha en productos Hortofrutícolas: Uso de microorganismos antagonicos revista Iberoamericana de tecnología Postcosecha 8: 1-6.

BENHAMOU, N., REY, P., PICARD, K., and TIRILLY, Y. 1999. Ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction between the mycoparasite *Pythium oligandrum* and soilborne plant pathogens. *Phytopathology* 89:506-517.



- BURNS, J. R., and BENSON, D. M. 2000. Biocontrol of damping-off of *Catharanthus roseus* caused by *Pythium ultimum* with *Trichoderma virens* and binucleate *Rhizoctonia* fungi. *Plant Dis.* 84:644-648.
- CARLING, D. E., POPE, E. J., BRAINARD, K. A., and CARTER, D. A. 1999. Characterization of mycorrhizal isolates of *Rhizoctonia solani* from an orchid, including AG-12, a new anastomosis group. *Phytopathology* 89:942-946.
- CASTILLO-FABELA, E., GALLEGOS-MORALES, G., HERNÁNDEZ-CASTILLO, F.D., CEPEDA-SILLER, M. y ZAMORA-VILLA, V. M. 2001. Efectividad *In Vitro* de actinomicetos aislados de rizósfera de papa sobre *Rhizoctonia solani* Kühn. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:203-207.
- CAZORLA, F. M., DUCKETT, S. B., BERGSTRÖM, T., NOREEN, S., ODIJK, R., LUGTENBERG, B. J. J., THOMAS-OATES, J. E and BLOEMBERG, G. V. 2006. Biocontrol of Avocado Dematophora Root Rot by Antagonistic *Pseudomonas fluorescens* PCL1606 Correlates With the Production of 2-Hexyl 5-Propyl Resorcinol. *The American Phytopathological Society.* 19(4) 418–428
- CONWAY, K. E., MANESS, N. E., and MOTES, J. E. 1997. Integration of biological and chemical controls for *Rhizoctonia* aerial blight and root rot of rosemary. *Plant Dis.* 81:795-798.
- CHAVES, N. y WANG, A. 2004. Combate de moho gris (*Botrytis cinérea*) de la fresa mediante *Gliocladium roseum* *Agronomía Costarricense.* 28(2):73-85.
- CHITRAMPALAM, P., FIGULI, P. J., MATHERON, M. E., SUBBARAO, K. V., and PRYOR, B. M. 2008. Biocontrol of lettuce drop caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor* in desert agroecosystems. *Plant Dis.* 92:1625-1634.
- DORRANCE, A. E., KLEINHENZ, M. D., MCCLURE, S. A., and TUTTLE, N. T. 2003. Temperature, moisture, and seed treatment effects on *Rhizoctonia solani* root rot of soybean. *Plant Disease* 87: 533- 538.
- ELAD, Y., and KAPAT, A. 1999. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* 105:177-189.
- ELMER, W. H. 1997. Influence of chloride and nitrogen form on *Rhizoctonia* root and crown rot of table beets. *Plant Dis.* 81:635-640.
- EZZIYYANI, M., CONSUELO, P. S., AHMED, S. A., y REQUENA, M. E. 2004 *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimienta (*Capsicum annum* L.) *Anales de Biología* 26: 35-45.

FERNÁNDEZ, B. R. J., y SUAREZ, M. C.L. 2009. Antagonismo *In vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp pasiflora *edulis* Sims var. *Flavicarpa*. Revista facultad Nacional de Agronomía-Medellín 62(1):4743-4748

GARCÍA-VELASCO, R., ZAVALETA-MEJÍA, E., ROJAS-MARTINÉZ, R. I., LEYVA-MIR, S. G., SIMPSON, J. K. y FUENTES-DÁVILA, D. 2005. Antagónismo de *Cladosporium* sp. Contra *Puccinia horiana* Henn. Causante de la roya blanca del crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev). Revista mexicana de Fitopatología 23:79-86

GARCÍA, R., RIERA, R., ZAMBRANO, C., y GUTIÉRREZ, L. 2006. Desarrollo de un Fumigicida biológico a base de una cepa del hongo *Trichoderma harzianum* proveniente de la región andina venezolana. Fitosanidad (10):115-121.

GARIBALDI, A., LODOVICA, G. M., and MINUTO, G. 1997. Diseases of Brasil and their Management. The American Phytopathological Society. Plant Disease 81 (2):124-132.

GONZÁLEZ-VEGA., M. E., HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, A., BARRIOS-ALONSO, L. M., VELÁZQUEZ-DEL VALLE, M. G. Y HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A. N. 2007. Efecto antagónico de un producto biológico obtenido de *Burkholderia cepacia* Palleroni y Holmes contra *Capnodium* spp. en plántulas de café (*Coffea canephora*) crecida *in vitro* e *in vivo*. Revista Mexicana de Fitopatología 25:120-126.

GONZÁLEZ, G. V., PORTAL O. M. A. and RUBIO S. V. 2006. Review. Biology and Systematics of the form genus *Rhizoctonia* Spanish Journal of Agricultural Research. 4(1), 55-79.

GREEN, D. E., BURPEE, L. L., and STEVENSON, K. L. 1999. Components of resistance to *Rhizoctonia solani* associated with two tall fescue cultivars. Plant Dis. 83:834-838.

GUÉDEZ, C., CAÑIZALES, L., CASTILLO, C., y OLIVAR R. 2009. Efecto Antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria* spp.) Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 29:34-38

GUIGÓN-LÓPEZ, C., GUERRERO-PRIETO, V., VARGAS-ALBORES, F., CARVAJAL-MILLAN, E., ÁVILA-QUEZADA, G.D., BRAVO-LUNA, L., RUOCCO, M., LANZUISE, S., WOO, S. y LORITO, M. 2010. Identificación Molecular de Cepas Nativas de *Trichoderma* spp. su Tasa de Crecimiento *in vitro* y

Antagonismo contra Hongos Fitopatogenos. Revista Mexicana de Fitopatología 28:87-96.

GUILLEN-CRUZ, R., HERNANDEZ-CASTILLO, F. D., GALLEGOS-MORALES, G., RODRIGUEZ-HERRERA, R., AGUILAR-GONZALES, C. N., PADRON-CORRALES, E. y REYES-VALDES, M. H. 2006. *Bacillus* spp como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). Revista de Fitopatología 24-105-114.

GUTIERREZ., B. GONZALES., S. M. y SALIH., L. A. 2006. Caracterización de aislamientos de *Rhizoctonia solani* Kühn. Que inducen pudriciones radicales en cultivares de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.), Biagro. 18(1): 63-72.

GUTIERREZ, W. A., SHEW, H. D., and MELTON, T. A. 1997. Sources of inoculum and management for *Rhizoctonia solani* damping-off on tobacco transplants under greenhouse conditions. Plant Dis. 81:604-606.

HANHONG, B., DANIEL, P. R., HYOUN-SUB, L., MARY, D. S., SOO-CHUL, P., CHOONG-MIN, R., RACHEL, L., M. and BRYAN., A. B. 2010. Endophytic *Trichoderma* Isolates from Tropical Environments Delay Disease Onset and Induce Resistance Against *Phytophthora capsici* in Hot Pepper Using Multiple Mechanisms. 24(3):336–351.

HANSON, L. E., and HOWELL, C. R. 2004. Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of *Trichoderma virens*. Phytopathology 94:171-176.

HERNÁNDEZ, A., RIVES, N., CABALLERO, A., HERNÁNDEZ, A. N., y HEYDRICH, M. 2004. Caracterización de rizobacterias asociadas al cultivo de maíz en la producción de metabolitos de tipo AIA, sideróforos y ácido salicílico. Revista Colombiana de Biotecnología 6(1): 6-13

HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A. N., BAUTISTA-BAÑOS, S., VELÁZQUEZ-DEL VALLE, M. G., y HERNÁNDEZ- RODRÍGUEZ, A. 2007. Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. Revista Mexicana de Fitopatología 25:66-74.

HEUNGENS, K., and PARKE, J. L. 2001. Postinfection biological control of oomycete pathogens of pea by *Burkholderia cepacia* AMMDR1. Phytopathology 91:383-391.

HOWELL, C. R. 2002. Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 92:177-180.

-----, 2003. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts.

-----, 2005. Understanding the Mechanisms Employed by *Trichoderma virens* to Effect Biological Control of Cotton Diseases. Department of Agriculture-Agricultural Research Service.

HWANG, J., and BENSON, D. M. 2002. Biocontrol of *Rhizoctonia* stem and root rot of poinsettia with *Burkholderia cepacia* and binucleate *Rhizoctonia*. *Plant Dis.* 86:47-53.

JACOME, L. H., and SCHUH, W. 1992. Effect of leaf wetness duration and temperature on development of black sigota disease on banana infected by *Mycosphaerella fijiensis* var. *Difformis*. *Phytopathology*. 82, 515 – 520.

JOHNSON, K. L., MINSAVAGE, G. V., LE, T., JONES, J. B., and WALCOTT, R. R. 2011. Efficacy of a nonpathogenic *Acidovorax citrulli* strain as a biocontrol seed treatment for bacterial fruit blotch of cucurbits. *Plant Dis.* 95:697-704.

KEINATH, and FARNHAM, 1997. Differential cultivars and criteria for evaluating to resistance to *Rhizoctonia solani* in seedling Brassica oleracea. *Plant. Dis.* 81:946-952.

KHAN, J., OOKA, J. J., MILLER, S. A., MADDEN, L. V., and HOITINK, H. A. J. 2004. Systemic resistance induced by *Trichoderma hamatum* 382 in cucumber against *Phytophthora* crown rot and leaf blight. *Plant Dis.* 88:280-286

KHAN, N. I., SCHISLER, D. A., BOEHM, M. J., SLININGER, P. J., and BOTHAST, R. J. 2001. Selection and evaluation of microorganisms for biocontrol of *Fusarium* head blight of wheat incited by *Gibberella zeae*. *Plant Dis.* 85:1253-1258.

KHANGURA, R. K., BARBETTI, M. J., and SWEETINGHAM, M. W. 1999. Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* species on canola. *Plant Dis.* 83:714-721.

KIEWNICK, S., JACOBSEN, B. J., BRAUN-KIEWNICK, A., ECKHOFF, J. L. A., and BERGMAN, J. W. 2001. Integrated control of *Rhizoctonia* crown and root rot of sugar beet with fungicides and antagonistic bacteria. *Plant Dis.* 85:718-722.

KIRK P. M., CANNON P.F., DAVID J.C., STALPERS J.A., 2001. Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi. 9<sup>th</sup> edition. International Mycological Institute, CAB International. Wallingford, UK.

KIRK, W. W., WHARTON, P. S., SCHAFER, R. L., TUMBALAM, P., POINDEXTER, S., GUZA, C., FOGG, R., SCHLATTER, T., STEWART, J., HUBBELL, L., and RUPPAL, D. 2008. Optimizing fungicide timing for the control of *Rhizoctonia* crown and root rot of sugar beet using soil temperature and plant growth stages. *Plant Dis.* 92:1091-1098.

KÖHL, J., BÉLANGER, R. R., and FOKKEMA, N. J. 1997. Interaction of four antagonistic fungi with *Botrytis aclada* in dead onion leaves: A comparative microscopic and ultrastructural study. *Phytopathology* 87:634-642.

LAGUNA-LAGUNA, J., ZAVALETA-MEJÍA, E., OSADA-KAWASOE, S., ARANDA-OCAMPO, S., LUNA-ROMERO, I., Y VAQUERA-HUERTA, H. 2001. *Bacillus firmus* como agente de control biológico de *Phytophthora capsici* Leo. en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:57-65.

LARA HERNÁNDEZ, M.E., y R. FERRERA-CERRATO. 2007. Mecanismos microbianos en el control biológico. 342-404 pp. *In: Microbiología Agrícola.* R. Ferrera-Cerrato y A. Alarcón (Eds). Ed. Trillas. México.

LARENA, I., and MELGAREJO, P. 2009. Development of a method for detection of the biocontrol agent *Penicillium oxalicum* strain 212 by combining PCR and a selective medium. *Plant Dis.* 93:919-928

LARKIN, R. P., and FRAVEL, D. R., 1998. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of Fusarium wilt of tomato. *Plant Dis.* 82:1022-1028.

LÓPEZ, Y., PINEDA, JUAN. B., HERNANDEZ, A., y ULACIO, D. 2010. Efecto diferencial de seis aislamientos de *Trichoderma* spp., sobre la severidad de *Rhizoctonia solani.*, desarrollo radical y crecimiento de plantas de maíz. *Bioagro* (22):37-47.

LARS, B., and BERNHARD, H. 2008. Control of the bean rust fungus *Uromyces appendiculatus* by means of *Trichoderma harzianum*: leaf disc assays on the antibiotic effect of spore suspensions and culture filtrates. *International Organization for Biological Control (IOBC)* 54:575–585.

MAO, W., LUMSDEN, R. D., LEWIS, J. A., and HEBBAR, P. K. 1998. Seed treatment using pre-infiltration and biocontrol agents to reduce damping-off of corn caused by species of *Pythium* and *Fusarium*. *Plant Dis.* 82:294-299

MAROTO, B.J. V. 1989. Horticultura Herbácea Especial. Ed. Mundi-Prensa. España pp 240-263.

-----, 2002. Horticultura Herbácea Especial. Ed. Mundi-Prensa. España pp 240-263.

METCALF, D. A., DENNIS J. J. C., and WILSON, C. R. 2004. Effect of inoculum density of *Sclerotium cepivorum* on the ability of *Trichoderma koningii* to suppress white rot of onion. Plant Dis. 88:287-291.

MILUS, E. A., and ROTHROCK, C. S. 1997. Efficacy of bacterial seed treatments for controlling Pythium root rot of winter wheat. Plant Dis. 81:180-184.

MICHEL, A. A. C., OTERO, S. M. A., REBOLLEDO, D. O., LEZAMA, G. R. y OCHOA, M. M. A. 2005. Producción y efecto antagónico de quitinasa y glucanasas por *Trichoderma* spp. en la inhibición de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium subglutinans* *in vitro*. Revista Chapingo. Serie hortícola 11(2):273-278

MICHEL-ACEVES, A. C., OTERO-SÁNCHEZ, M. A., SOLANO-PASCACIO, L.Y., ARIZA-FLORES, R., BARRIOS-AYALA, A. y REBOLLEDO-MARTÍNEZ, A. 2009. Biocontrol *in vitro* con *Trichoderma* spp. de *Fusarium subglutinans* (Wollenweb. y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas y *F. oxysporum* Schlecht., agentes causales de la "escoba de bruja" del mango (*Mangifera indica* L.). Revista Mexicana de Fitopatología 27:18-26.

MONTEALEGRE, J. R., RODRIGO REYES, R., PÉREZ, L. M., HERRERA, R., SILVA, P., y BESOAIN, X. 2003. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato Electronic journal of biotechnology. 6(2)115-127.

NELSON, E. B., and HARMAN, G. E. 1997. Improved biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum* 1295-22 for foliar phases of turf diseases by use of spray applications. Plant Dis. 81:1132-1138.

OHKURA, M., ABAWI, G. S., SMART, C. D., and HODGE, K. T. 2009. Diversity and aggressiveness of *Rhizoctonia solani* and *Rhizoctonia*-like fungi on vegetables in New York. Plant Dis. 93:615-624.

ORBERÁ, R. T. M., SERRAT, D. M. J., y GONZÁLEZ, G. Z. 2009. Potencialidades de bacterias aerobias formadoras de endosporas para el biocontrol en plantas ornamentales. Fitosanidad. 13(2):95-100

OSORIO, N. M. E., VELÁZQUEZ, G. L. M., SALGADO, S. M.L., y GONZÁLEZ, E. C. E. 2005. Efecto de dos enmiendas orgánicas y *Trichoderma* spp. para controlar *Sclerotinia* spp. en lechuga. Revista Chapingo. Serie hortícola 11(2):203-208

PAULITZ, T. C., and SCHROEDER, K. L. 2005. A new method for the quantification of *Rhizoctonia solani* and *Rhizoctonia oryzae* from soil. Plant Dis. 89:767-772.

PORRAS, M., BARRAU, C., ARROYO, F. T., SANTOS, B., BLANCO, C., and ROMERO, F. 2007. Reduction of *Phytophthora cactorum* in strawberry fields by *Trichoderma* spp. and soil solarization. Plant Dis. 91:142-146.

PRIYATMOJO, A., YOTANI, Y., HATTORI, K., KAGEYAMA, K., and HYAKUMACHI, M. 2001. Characterization of *Rhizoctonia* spp. causing root and stem rot of miniature rose. Plant Dis. 85:1200-1205.

PUSEY, P. L., STOCKWELL, V. O., and RUDELL, D. R. 2008. Antibiosis and acidification by *Pantoea agglomerans* strain E325 may contribute to suppression of *Erwinia amylovora*. Phytopathology 98:1136-1143.

-----, STOCKWELL, V. O., REARDON, C. L., SMITS, T. H. M., and DUFFY, B. 2011. Antibiosis activity of *Pantoea agglomerans* biocontrol strain E325 against *Erwinia amylovora* on apple flower stigmas. Phytopathology 101:1234-1241.

QUIROZ-SARMIENTO, V. F., FERRERA-CERRATO, R., ALARCÓN, A., y LARA-HERNÁNDEZ, M. E. 2008. Antagonismo *in vitro* de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan el cultivo de ajo. Revista mexicana de Micología 26:27- 34.

RAMÍREZ, G. R. M. 1998. Manual de Prácticas de Microbiología General. Editor. R. María Ramírez Gama. México. 28–30p.

REINOSO, P. Y., VAILLANT, F. D., CASADESÚS, R. L., GARCÍA, P. E., y PAZOS, R. V. 2007 selección de cepas de *Bacillus* y otros géneros relacionados para el control biológico de hongos fitopatógenos. fitosanidad 11(01)35-40

REYES, R. A., RUIZ, S. E., CARMEN, Y. CH., y MIRZA, D. Ch. 2011. Selección de *Bacillus* spp. con actividad antagónica *in vitro* contra *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en diferentes medios de cultivo fitosanidad 15(2):117-121.

RIVAS, C. M. y PAVONE M. D. 2010. Diversidad de *Trichoderma* spp. en plantaciones de *Theobroma cacao* L. del Estado Carabobo, Venezuela, y su

capacidad biocontroladora sobre *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer 35(10):777-783.

ROBLEDO, O., ETCHEBEHERE, C. y LERCARI, D. 2010 Relationship between bacterial community structure and suppression of *Rhizoctonia solani* damping-off in different potting mixes for tomato seedlings growth. *Phytopathology* 14(2):67-84

RODRIGUEZ, F., and PFENDER, W. F. 1997. Antibiosis and antagonism of *Sclerotinia homoeocarpa* and *Drechslera poae* by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in vitro and in planta. *Phytopathology* 87:614-621.

ROJAS-RUIZ, N. E., VÁZQUEZ-CRUZ, C., SÁNCHEZ-ALONSO, P., SANSINENEA-ROYANO, E. 2010. Population Analysis of *Bacillus thuringiensis* in interaction *in vitro* with soil bacteria *Agrocencia* 44(8)941-953

SÁNCHEZ, V., y REBOLLEDO, O. 2010. Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con *Agave tequilana* en la región de los altos Sur, Jalisco y valoración de su capacidad antagónica contra *Thielaviosis paradoxa*. *Revista de Micología* 32:11-18.

SCHNEIDER, J. H. M., VAN DEN BOOGERT, P. H. J. F., and ZADOKS, J. C. 1999. Exploring differential interactions between *Rhizoctonia solani* AG 2-t isolates and tulip cultivars. *Plant Dis.* 83:474-481.

SMITH, C. M., JOHNSON, L. E. B., and SHILLINGFORD, C. A. 1991. In vitro methods for monitoring flusilazone sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* (back sigota on bananas). *EPPO Bulletin* 21: 332 – 325.

STEDDOM, K., and MENGE, J. A. 2001. Evaluation of continuous application technology for delivery of the biocontrol agent *Pseudomonas putida* 06909-rif/nal. *Plant Dis.* 85:387-392

STEFANOVA, N. M. 2007. Introducción y Eficacia Técnica del Biocontrol de Fitopatógenos con *Trichoderma* spp. en Cuba. *Fitosanidad.* 11(3) 75-79.

STEFANOVA, N. M., Franco C. Y., Coronado, I. M. F., y Villa, G. P. M Gómez. 2007. Efecto Antagónico *in vitro* de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PSS contra aislamientos de *Pectobacterium Carotovorum* y *Dickeya Chrysanthemi*. *Fitosanidad.*11(4) 47-49

STOCKWELL, V. O., JOHNSON, K. B., SUGAR, D., and LOPER, J. E. 2002. Antibiosis contributes to biological control of fire blight by *Pantoea agglomerans* strain Eh252 in orchards. *Phytopathology* 92:1202-1209.



SUÁREZ, M. C. L., BARBOSA, F. R. J., VALERO, N. O., GÁMEZ, C. R. M., y PÁEZ, R. A. R. 2008. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. Revista Colombiana de Biotecnología. 10(2) 35-43.

TAHERI, P., GNANAMANICKAM, S., and HÖFTE, M. 2007. Characterization, genetic structure, and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. associated with rice sheath diseases in India. Phytopathology 97:373-383

TIAN, S. P., FAN, Q., XU, Y., and LIU, H. B. 2002. Biocontrol efficacy of antagonist yeasts to gray mold and blue mold on apples and pears in controlled atmospheres. Plant Dis. 86:848-853.

TOMASO-PETERSON, P. M., and TREVATHAN, L. E. 2007. Characterization of *Rhizoctonia*-like fungi isolated from agronomic crops and turfgrasses in Mississippi. Plant Dis. 91:260-265.

TORRES, E., LANNACONE, J., y GOMEZ, H. 2008. Biocontrol del moho foliar del tomate *Cladosporium fulvum* empleando cuatro hongos antagonistas. Revista de Ciencias Agronómicas 67(1):169-1178.

ULASIO, D., SALAS, J., QUERALES, P., y SANABRIA, M. E. 2002. Micobiota del suelo de zonas productoras de papas del Estado de Mérida y su relación con *Rhizoctonia solani* Kuhn. Bioagro 14:11-16

VALENCIA-CANTERO, E., VILLEGAS-MORENO, J., SÁNCHEZ-YÁÑEZ, J. M., PEÑA-CABRIALES, J. J. y FARÍAS-RODRÍGUEZ, R. 2005. *Fusarium oxysporum* Inhibition by Zum80 *Pseudomonas fluorescens* Mutant Strains Unable to Produce Siderophores. Tierra latinoamericana 23(1)18-88.

WELLER, D. M. 2007. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: Looking back over 30 years. Phytopathology 97:250-256.

XU, X.-M., JEFFRIES, P., PAUTASSO, M., and JEGER, M. J. 2011. A numerical study of combined use of two biocontrol agents with different biocontrol mechanisms in controlling foliar pathogens. Phytopathology 101:1032-1044.

## 9.2 Electrónicas

FAOSTAT. 2012. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Database consulted on November 2012: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>

[http://www.SIAP.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=3](http://www.SIAP.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=3)  
51

## **IX. ANEXO**

## 10.1 Análisis de varianza

### 10.1.1 Experimento 1.

| Información del nivel de clase |         |                   |                      |          |               |        |    |
|--------------------------------|---------|-------------------|----------------------|----------|---------------|--------|----|
| Clase                          | Niveles | Valores           |                      |          |               |        |    |
| TRA                            | 6       | GT5-R2            | R39-R2               | R40-R2   | R41-R2        | R44-R2 | R2 |
| Número de observaciones        |         |                   |                      |          |               | 18     |    |
| Variable dependiente: PCA3dds  |         |                   |                      |          |               |        |    |
| Fuente                         | DF      | Suma de cuadrados | Cuadrado de la media | F-Valor  | Pr > F        |        |    |
| Modelo                         | 5       | 3512.964761       | 7024.592952          | 128.71   | <.0001        |        |    |
| Error                          | 12      | 65.506400         | 5.458867             |          |               |        |    |
| Total correcto                 |         | 17                | 3578.471161          |          |               |        |    |
|                                |         | R-cuadrado        | Coef Var             | Raiz MSE | PCA3dds Media |        |    |
|                                |         | 0.981694          | 7.738347             | 2.336422 | 30.19278      |        |    |
| Variable dependiente: PCA5dds  |         |                   |                      |          |               |        |    |
| Fuente                         | DF      | Suma de cuadrados | Cuadrado de la media | F-Valor  | Pr > F        |        |    |
| Modelo                         | 5       | 15450.94823       | 3090.18965           | 2366.35  | <.0001        |        |    |
| Error                          | 12      | 15.6706716480     | 1.30589              |          |               |        |    |
| Total correcto                 |         | 17                | 15466.61889          |          |               |        |    |
|                                |         | R-cuadrado        | Coef Var             | Raiz MSE | PCA5dds Media |        |    |
|                                |         | 0.998987          | 2.586621             | 1.142755 | 44.17944      |        |    |

Variabl e dependi ente: PCA9dds

| Fuente         | DF | Suma de cuadrados | Cuadrado de la media | F-Val or | Pr > F  |
|----------------|----|-------------------|----------------------|----------|---------|
| Model o        | 5  | 22989. 49732      | 4597. 89946          | 1358. 71 | <. 0001 |
| Error          | 12 | 40. 60813         | 3. 38401             |          |         |
| Total correcto | 17 | 23030. 10545      |                      |          |         |

| R-cuadrado | Coef Var  | Rai z MSE | PCA9dds Medi a |
|------------|-----------|-----------|----------------|
| 0. 998237  | 2. 456087 | 1. 839568 | 74. 89833      |

## 10.1.2 Experimento 2

Información del nivel de clase

| Clase | Nivel es | Val ores                              |
|-------|----------|---------------------------------------|
| TRA   | 6        | GT5-R5 R39-R5 R40-R5 R41-R5 R44-R5 R5 |

Número de observaciones 18

Variabl e dependi ente: PCA3dds

| Fuente         | DF | Suma de cuadrados | Cuadrado de la media | F-Val or | Pr > F  |
|----------------|----|-------------------|----------------------|----------|---------|
| Model o        | 5  | 4221. 826178      | 844. 365236          | 56. 61   | <. 0001 |
| Error          | 12 | 178. 999867       | 14. 916656           |          |         |
| Total correcto | 17 | 4400. 826044      |                      |          |         |

| R-cuadrado | Coef Var  | Rai z MSE | PCA3dds Medi a |
|------------|-----------|-----------|----------------|
| 0. 959326  | 12. 23595 | 3. 862209 | 31. 56444      |

Variabl e dependi ente: PCA5dds

| Fuente         | DF | Suma de cuadrados | Cuadrado de la media | F-Val or | Pr > F  |
|----------------|----|-------------------|----------------------|----------|---------|
| Model o        | 5  | 15525. 61425      | 3105. 12285          | 395. 70  | <. 0001 |
| Error          | 12 | 94. 16480         | 7. 84707             |          |         |
| Total correcto | 17 | 4400. 826044      |                      |          |         |

|            |           |           |                |
|------------|-----------|-----------|----------------|
| R-cuadrado | Coef Var  | Rai z MSE | PCA5dds Medi a |
| 0. 993971  | 6. 303233 | 2. 801262 | 44. 44167      |

Vari abl e dependi ente: PCA9dds

| Fuente         | DF | Suma de cuadrados | Cuadrado de la medi a | F-Val or | Pr > F  |
|----------------|----|-------------------|-----------------------|----------|---------|
| Model o        | 5  | 21697. 466660     | 4339. 49332           | 1710. 02 | <. 0001 |
| Error          | 12 | 30. 45220         | 2. 53768              |          |         |
| Total correcto | 17 | 21727. 91880      |                       |          |         |

|            |           |           |                |
|------------|-----------|-----------|----------------|
| R-cuadrado | Coef Var  | Rai z MSE | PCA9dds Medi a |
| 0. 998598  | 2. 090382 | 1. 593011 | 76. 20667      |

### 10.1.3 Experimento 3.

Información del nivel de clase

| Cl ase | Ni vel es | Val ores  |
|--------|-----------|---|
| TRA    | 8         | A46-R2 A46-R5 OLS-R2 OLS-R5 P61-R2 P61-R5 R2 R5 |

Número de observaciones 24

Vari abl e dependi ente: PIP4dds

| Fuente         | DF | Suma de cuadrados | Cuadrado de la medi a | F-Val or | Pr > F  |
|----------------|----|-------------------|-----------------------|----------|---------|
| Model o        | 7  | 7441. 810741      | 1063. 115820          | 33. 25   | <. 0001 |
| Error          | 16 | 511. 617698       | 31. 976106            |          |         |
| Total correcto | 23 | 7953. 428439      |                       |          |         |

|            |           |           |                |
|------------|-----------|-----------|----------------|
| R-cuadrado | Coef Var  | Rai z MSE | PIP4dds Medi a |
| 0. 933837  | 8. 223130 | 5. 654742 | 29. 01443      |

### 10.1.4 Experimento 4.

#### Información del nivel de clase

| Clase | Niveles | Valores |        |        |        |        |        |        |        |        |    |    |    |
|-------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----|----|----|
| TRA   | 12      | A46-R3  | A46-R4 | A46-R6 | OLS-R3 | OLS-R4 | OLS-R6 | P61-R3 | P61-R4 | P61-R6 | R3 | R4 | R6 |

Número de observaciones 36

Variab le dependiente: PIP4dds

| Fuente         | DF | Suma de cuadrados | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F |
|----------------|----|-------------------|----------------------|---------|--------|
| Modelo         | 11 | 8143.549691       | 740.322699           | 136.29  | <.0001 |
| Error          | 24 | 130.369570        | 5.432065             |         |        |
| Total correcto | 35 | 8273.919261       |                      |         |        |

| R-cuadrado | Coef Var | Rai z MSE | PIP4dds Media |
|------------|----------|-----------|---------------|
| 0.984243   | 9.128651 | 2.330679  | 25.53147      |

### 10.1.5 Experimento 5

#### Información del nivel de clase

| Clase | Niveles | Valores |        |        |        |        |        |    |    |
|-------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|----|----|
| TRA   | 8       | A46-R2  | A46-R5 | OLS-R2 | OLS-R5 | P61-R2 | P61-R5 | R2 | R5 |

Número de observaciones 24

Variab le dependiente: PIP3dds

| Fuente         | DF | Suma de cuadrados | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F |
|----------------|----|-------------------|----------------------|---------|--------|
| Modelo         | 7  | 35845.35686       | 5120.76527           | 14.30   | <.0001 |
| Error          | 16 | 5729.53721        | 358.09608            |         |        |
| Total correcto | 23 | 41574.89407       |                      |         |        |

| R-cuadrado | Coef Var | Rai z MSE | PIP3dds Media |
|------------|----------|-----------|---------------|
| 0.984236   | 9.029126 | 3.699866  | 42.67175      |

### 10.1.6 Experimento 6.

#### Información del nivel de clase

| Clase | Niveles | Valores  |
|-------|---------|--|
| TRA   | 8       | A46-R2 A46-R5 OLS-R5 OLSR2 P61-R2 P61-R5 R2 R5 |

Número de observaciones 24

Variabl e dependi ente: PIP2dds

| Fuente         | DF | Suma de cuadrados | Suma de la media | Cuadrado de F-Valor | Pr > F |
|----------------|----|-------------------|------------------|---------------------|--------|
| Modelo         | 7  | 35845.35686       | 5120.76527       | 14.30               | <.0001 |
| Error          | 16 | 5729.53721        | 358.09608        |                     |        |
| Total correcto | 23 | 41574.89407       |                  |                     |        |

|            |          |           |                |
|------------|----------|-----------|----------------|
| R-cuadrado | Coef Var | Rai z MSE | PIP2dds Medi a |
| 0.962188   | 8.26073  | 1.92343   | 64.67175       |