

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE
UNIDAD REGIONAL LOS MOCHIS
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
MAESTRÍA EN FITOPATOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE



UAdeO
UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE
OCCIDENTE

TESIS:

BACTERIAS ASOCIADAS A LA RIZOSFERA DE PAPA, CON POTENCIAL PARA
EL BIOCONTROL DE *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia*
solani EN EL NORTE DE SINALOA

PRESENTA:

OCTAVIO ERNESTO MARTÍNEZ EREVA

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN FITOPATOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE

DIRECTORES DE TESIS:

DRA. GUADALUPE ARLENE MORA ROMERO

DR. RUBÉN FÉLIX GASTÉLUM

LOS MOCHIS, SINALOA, DICIEMBRE 2022



UAdeO
UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE
OCCIDENTE

"2018, Año de Nuestra Autonomía Universitaria"

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE
VICERRECTORÍA ACADÉMICA
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

Asunto: **carta conclusión de tesis para opción de grado.**
Los Mochis Sinaloa, 08 de noviembre 2022

Dra. Karla Mariela Sandoval Cota
Jefa del Departamento de Investigación y Posgrado
Unidad Regional Los Mochis
Presente.-

Habiendo constatado que las observaciones realizadas por el comité revisor han sido atendidas en la obra, el suscrito en la calidad de director de tesis, doy por concluido el trabajo siguiente:

Nombre del maestrante: **Octavio Ernesto Martínez Ereva** Matrícula: **20020019**

Nombre de Tesis: **"Bacterias asociadas a la rizosfera de papa con potencial para el biocontrol de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfii* y *Rhizoctonia solani* en el Norte de Sinaloa"**.

Nombre del Programa Educativo: **Maestría en Fitopatología y Medio Ambiente.**

Atentamente.

Dra. Guadalupe Arlene Mora Romero
Directora de Tesis



UAdeO
UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE
OCCIDENTE

El presente trabajo de investigación titulado "**Bacterias asociadas a la rizosfera de papa con potencial para el biocontrol de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani* en el Norte de Sinaloa**" realizado por el **Biol. Octavio Ernesto Martínez Erevá** con matrícula **20020019**, dirigido por los integrantes del Comité de Tesis abajo indicados, ha sido aprobado por el mismo y aceptado como requisito parcial, para la obtención del grado de Maestro en Ciencias.


COMITÉ DE TESIS:



Dra. Guadalupe Arlene Mora Romero
Directora de tesis



Dr. Rubén Félix Gastélum
Co-Director de tesis



MC. Cecilia de Los Angeles Romero Urias
Asesora



Dra. Karla Yeriana Leyva Madrigal
Asesor

Los Mochis, Sinaloa, noviembre de 2022



UAdeO
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE
CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la ciudad de Los Mochis, Sinaloa, el día 16 del mes de noviembre del año 2022, quien suscribe Octavio Ernesto Martínez Erevá alumno del programa educativo de maestría en fitopatología y medio ambiente (Registro CONACyT 004128) con número de matrícula 20020019, de la Unidad Regional Los Mochis manifiesta que es el autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Guadalupe Arlene Mora Romero y Dr. Rubén Félix Gastélum cede los derechos del trabajo titulado "**Bacterias asociadas a la rizosfera de papa, con potencial para el biocontrol DE *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani* en el Norte de Sinaloa**", a la Universidad Autónoma de Occidente para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los Usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente hola la tesis como fuente dónde la obtuvo y mencionar autor intelectual. Cualquier Uso distinto como el lucro reproducción edición o modificación será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Octavio Ernesto Martínez Erevá

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento de mis estudios de Maestría.

A la Universidad Autónoma De Occidente por permitirme realizar mis estudios de maestría y la infraestructura que puso a disposición para elaborar mi proyecto de investigación.

A la Dra. Guadalupe Arlene Mora Romero y al Dr. Rubén Félix Gastélum por ser siempre unos excelentes guías en este proyecto de investigación.

A la Dra. Karla Yeriana Leyva Madrigal, M.C. Cecilia De Los Ángeles Romero Urías y M.I. Carlos Ibarra por sus asesorías y conocimientos compartidos.

A mis compañeros y amigos: Juan Pérez, Jesús Marrufo, Ramon García, Hugo Aguilar, Manuel, Chávez, Héctor Leyva, Massiel Magaña, Luis Parra y José Higuera.

DEDICATORIA

A mis padres: **Diana Maribel Erevá Verduzco y Ernesto Martínez Acosta**

Y

A mi familia

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ÍNDICE DE CUADROS.....	II
RESUMEN.....	III
ABSTRACT.....	IV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 El cultivo de papa; su importancia en México y en Sinaloa.....	2
2.2 Clasificación taxonomía de <i>Solanum tuberosum</i>	3
2.4 Estrategias de control de enfermedades fúngicas.....	6
2.4.1 Control cultural o preventivo.....	6
2.4.2 Control químico.....	7
2.4.3 Control biológico.....	8
2.5 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	9
2.5.1 Taxonomía.....	11
2.5.2 Ciclo de vida.....	11
2.6 <i>Sclerotium rolfsii</i>	12
2.6.1 Taxonomía.....	14
2.6.2 Ciclo de vida.....	14
2.7 <i>Rhizoctonia solani</i>	15
2.7.1 Taxonomía.....	16
2.9 Mecanismos de antagonismo empleados por bacterias.....	19
4.1 Objetivo general.....	22
4.2 Objetivos específicos.....	22
5. HIPÓTESIS.....	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
6.1 Estrategia de trabajo.....	23
6.2 Obtención de aislados bacterianos.....	24
6.3 Procesamiento de las muestras.....	24
6.4 Creación de colección de bacterias de la rizosfera de papa.....	24
6.5 Obtención de hongos fitopatógenos.....	26

6.6	Preservación de hongos	27
6.7	Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i>	27
6.8	Prueba de hemólisis	28
6.9	Pruebas para la detección de posibles mecanismos de actividad antagonica	30
6.9.1	Producción de sideróforos	30
6.10	Pruebas para detección de posibles mecanismos de promoción de crecimiento vegetal.....	31
6.10.1	Capacidad de solubilización de fosfatos.....	31
6.10.2	Producción de ácido indolacético (AIA).....	32
6.11	Pruebas de antagonismo <i>in planta</i>	32
6.11.2	Producción de inóculo fúngico	33
6.11.3	Bioensayo de antagonismo <i>in planta</i>	34
6.12	Identificación molecular	36
6.13	Análisis estadístico	38
7.	RESULTADOS	39
7.1	Generación de una colección de 54 aislados bacterianos de la rizosfera de papa ..	39
7.2	Escrutinio de aislados con antagonismo <i>in vitro</i> y conformación de una sub-colección γ -hemolítica con potencial antagonico contra <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	39
7.3	Escrutinio de aislados con antagonismo <i>in vitro</i> y conformación de una sub-colección γ -hemolítica con potencial antagonico contra <i>Sclerotium rolfsii</i>	41
7.4	Detección de aislados con antagonismo <i>in vitro</i> y conformación de una sub-colección γ -hemolítica con potencial antagonico contra <i>Rhizoctonia solani</i>	42
7.5	Bioensayo de antagonismo <i>in vitro</i>	44
7.6	Bioensayo de antagonismo <i>in planta</i>	47
7.6.1	Producción de inóculo bacteriano para pruebas <i>in planta</i>	47
7.6.2	Bioensayo de antagonismo <i>in planta</i> de aislado bacteriano D02 contra <i>S. sclerotiorum</i> , <i>S. rolfsii</i> y <i>R. solani</i>	48
7.7	Mecanismos de antagonismo y promoción de crecimiento vegetal	51
7.7.1	Producción de sideróforos	51
7.7.2	Inhibición por compuestos orgánicos volátiles en placa dividida.....	52
7.7.3	Pruebas de solubilización de fosfatos	56
7.7.4	Producción de auxinas	56
7.8	Identificación molecular del aislado bacteriano D02	56
7.9	Identificación molecular de los aislados de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> utilizados en el presente estudio	57

8. DISCUSIÓN	58
8.1 Colección bacteriana de aislados rizosféricos del cultivo de papa.....	58
8.2 Efecto antagónico <i>in vitro</i> del aislado bacteriano D02.....	59
8.3 Efecto antagónico <i>in planta</i> del aislado bacteriano D02 sobre los aislados de <i>S. sclerotiorum</i> y <i>R. solani</i>	61
8.4 Detección de mecanismos antagónicos y de crecimiento vegetal.....	62
8.5 Identificación molecular del aislado bacteriano D02.....	64
8.6 Identificación molecular de los aislados de <i>S. sclerotiorum</i>	65
9. CONCLUSIONES	66
10. BIBLIOGRAFIA	67
11. ANEXOS	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Negrillo <i>et al.</i> , 2009).....	12
Figura 2. Ciclo de vida <i>Sclerotium rolfsii</i> (Aycocock, 1966)	15
Figura 3. Ciclo de <i>Rhizoctonia solani</i> (Acuña <i>et al.</i> , 2015)	18
Figura 4. Estrategia general de trabajo	23
Figura 5. Antagonismo por confrontación <i>in vitro</i> contra asilados de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	45
Figura 6. Antagonismo por confrontación <i>in vitro</i> contra asilados de <i>Sclerotium rolfsii</i>	46
Figura 7. Pruebas de antagonismo por confrontación <i>in vitro</i> contra asilados de <i>Rhizoctonia solani</i>	47
Figura 8. Curva de crecimiento del aislado D02.....	48
Figura 9. Experimento de antagonismo del aislado D02 contra <i>S. sclerotiorum in planta</i> bajo condiciones de invernadero	49
Figura 10. Tubérculo cosechado.	51
Figura 11. Prueba de producción de sideróforos en agar CAS.....	52
Figura 12. Antagonismo <i>in vitro</i> mediante compuestos orgánicos volátiles	53
Figura 13. Antagonismo <i>in vitro</i> mediante compuestos orgánicos volátiles	54
Figura 14. Antagonismo <i>in vitro</i> mediante compuestos orgánicos volátiles	55
Figura 15. Árbol filogenético generado con el método de máxima verosimilitud usando secuencias de la región 16S de ADN ribosomal de especies de <i>Pseudomonas</i>	57
Figura 16. Árbol filogenético generado con el método de Máxima Verosimilitud usando secuencias de la región ITS de especies de <i>Sclerotinia</i>	58

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de la papa (<i>Solanum tuberosum</i>).....	3
Cuadro 2. Clasificación taxonómica de <i>S. sclerotiorum</i>	11
Cuadro 3. Clasificación taxonómica de <i>S. rolfsii</i>	14
Cuadro 4. Clasificación taxonómica de <i>R. solani</i>	16
Cuadro 5. Código de los aislados bacterianos, ubicación y su fecha de recolección en el norte de Sinaloa.....	25
Cuadro 6. Código de los aislados de <i>S. sclerotiorum</i> , ubicación y su fecha de recolección en el norte de Sinaloa.....	27
Cuadro 7. Inhibición <i>in vitro</i> del crecimiento micelial de tres cepas de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> con aislados bacterianos de la rizosfera del cultivo de papa, colectados en los Municipios de Ahome y El Fuerte, Sinaloa, México.....	40
Cuadro 8. Inhibición <i>in vitro</i> del crecimiento micelial de tres cepas de <i>Sclerotium rolfsii</i> con aislados bacterianos de la rizosfera del cultivo de papa, colectados en los Municipios de Ahome y El Fuerte, Sinaloa, México.	42
Cuadro 9. Inhibición <i>in vitro</i> del crecimiento micelial de tres cepas de <i>Rhizoctonia solani</i> con aislados bacterianos de la rizosfera del cultivo de papa, colectados en los Municipios de Ahome y El Fuerte, Sinaloa, México.	43
Cuadro 10. Diámetro micelial de colonias de tres aislados de <i>S. sclerotiorum</i> en pruebas de antagonismo por confrontación con el aislado D02.	44
Cuadro 11. Diámetros miceliales en cada tratamiento de la prueba de antagonismo por confrontación y su respectiva inhibición en los aislados de <i>S. rolfsii</i>	45
Cuadro 12. Diámetro micelial de colonias de tres aislados de <i>R. solani</i> en pruebas de antagonismo por confrontación con el aislado D02.....	46
Cuadro 13. Efecto del aislado D02 contra <i>S. sclerotiorum</i> en plantas de papa	50
Cuadro 14. Efecto del aislado D02 contra <i>R. solani</i> en plantas de papa.	50
Cuadro 15. Inhibición de crecimiento micelial en la prueba de antagonismo <i>in vitro</i> por compuestos orgánicos volátiles	56

RESUMEN

La papa es el cuarto cultivo alimenticio en el mundo. Al igual que otros cultivos, es hospedero de diversos agentes fitopatógenos como el agente causal del moho blanco *Sclerotinia sclerotiorum*, el agente causal de la sarna negra que afecta a tubérculos y cancro en los tallos *Rhizoctonia solani*, y de *Sclerotium rolfsii* que provoca podredumbre blanda en la papa. Estos hongos forman estructuras de resistencia denominadas esclerocios. El control químico tiene repercusiones en el ámbito ambiental y salud, mientras que el control biológico es una alternativa sustentable. El objetivo del presente trabajo es seleccionar cepas bacterianas aisladas la rizosfera del cultivo de papa en el Norte de Sinaloa, con potencial para el control de *S. sclerotiorum*, *S. rolfsii* y *R. solani*. Se obtuvo una colección de 54 aislados bacterianos, posteriormente como resultado de un escrutinio se seleccionó el aislado no hemolítico D02 con potencial antagonico *in vitro* contra los tres patógenos. D02 inhibió del 50.2 al 55.8 % el crecimiento micelial de *S. sclerotiorum* (Ss1, Ss2 y Ss3), del 21.9 al 28.5 %, a *S. rolfsii* (Sr1, Sr2 y Sr3) y de 44.3 al 54.49% a los aislados de *R. solani* (Rs1, Rs2 y Rs3). En la evaluación *in planta* se observó 0% de incidencia en los tratamientos Ss1 + D02 y Ss2 + D02, y 6.25 % en el tratamiento Ss3 + D02. Por otro lado, D02 redujo a 33.33 % y 10 % la incidencia y la severidad de Rs3. El aislado D02 presento la capacidad de producir compuestos volátiles como mecanismo de antagonismo contra los hongos fitopatógenos, con inhibición de 61.51, 51.49 y 60.3 % en los aislados de Ss1, Ss2 y Ss3, así como del 80.13, 74.88 y 75.46 % en Sr1, Sr2 y Sr3, y el 53.21, 38.32 y 42.41 % sobre los aislados Rs1, Rs2 y Rs3 respectivamente. Este aislado produce sideróforos y ácido indol acético (AIA). El aislado D02 se identificó molecularmente con base a la región 16S del ADN ribosomal como *Pseudomonas* sp. Se sugiere realizar estudios en campo con el aislado D02.

ABSTRACT

Potato is the fourth food crop in the world. Like other crops, it is host to various phytopathogenic agents such as the causal agent of the white mold *Sclerotinia sclerotiorum*, the causal agent of black scab that affects tubers and stem canker *Rhizoctonia solani*, and the soft rot in the potato *Sclerotium rolfsii*. These fungi form resistant structures called sclerotia. Chemical control has repercussions in the environment and health, while the biological control is a sustainable alternative. The objective of this work is to select bacterial strains isolated from the rhizosphere of potato crops in northern Sinaloa, with the potential to control *S. sclerotiorum*, *S. rolfsii* and *R. solani*. A collection of 54 bacterial isolates was obtained, later, as a result of a screening, the non-hemolytic isolate D02 with antagonistic potential *in vitro* against the three pathogens was selected. D02 inhibited from 50.2 to 55.8 % the mycelial growth of *S. sclerotiorum* (Ss1, Ss2 and Ss3), from 21.9 to 28.5 %, of *S. rolfsii* (Sr1, Sr2 and Sr3) and from 44.3 to 54.49 % the isolates of *R. solani* (Rs1, Rs2 and Rs3). In planta test, 0 % incidence was observed in treatments Ss1 + D02 and Ss2 + D02, and 6.25% in treatment Ss3 + D02. On the other hand, D02 reduced the 33.33 % and 10% the incidence and severity of Rs3. The isolate D02 had the ability to produce volatile compounds as a mechanism of antagonism against phytopathogenic fungi, inhibiting 61.51, 51.49 and 60.3 % the isolates of Ss1, Ss2 and Ss3, and 80.13, 74.88 and 75.46 % of Sr1, Sr2 and Sr3, as well as 53.21, 38.32 and 42.41 % of the isolates Rs1, Rs2 and Rs3 respectively. This isolate produces siderophores and indole acetic acid (IAA). Isolate D02 was molecularly identified based on the 16S region of ribosomal DNA as *Pseudomonas* sp. It is suggested to carry out field studies with isolate D02.

1. INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L) se originó hace aproximadamente 8000 años en las montañas de los Andes (Greenfiel y Southgate, 2009), es una herbácea anual que puede crecer hasta 100 cm de altura. El tubérculo semilla es producido por propagación vegetativa, en países en desarrollo se seleccionan del 5 al 15 % de los tubérculos con mejor calidad para la siembra del siguiente ciclo, en cambio, los agricultores de países desarrollados utilizan semilla certificada libres de enfermedades (CIP, 2021). En México la papa es una de las principales hortalizas producidas, sus proteínas tienen un elevado valor biológico, es rica en vitamina C y minerales como potasio, fósforo y calcio (Camire *et al.*, 2009).

La papa es el cuarto cultivo alimenticio en el mundo después del maíz, trigo y arroz (SIAP, 2019). La superficie destinada a este cultivo a nivel nacional es de 61,532.44 ha⁻¹, con una producción de 1,943,910.46 t y un rendimiento de 31.94 t ha⁻¹. Los estados de Sonora y Sinaloa son los mayores productores de papa, siendo Sinaloa el segundo lugar con una superficie total cosechada de 13,249.52 ha⁻¹, con una producción de 462,094.41 t y un rendimiento de 34.88 t ha⁻¹ (SIAP, 2020).

El cultivo de papa en México es el que más fungicidas requiere para prevenir y controlar diversas enfermedades, estimándose que en este cultivo se aplican el 21.3% del total de los fungicidas disponibles (Hernández *et al.*, 2008). El cultivo de papa en el estado de Sinaloa es afectado por diversas enfermedades causadas por hongos. Entre las enfermedades fúngicas se encuentra el moho blanco provocado por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, que ha aumentado su incidencia en los cultivos debido a las estrategias de riego por aspersión empleadas (Félix-Gastélum, 2021). Otras enfermedades fungosas son la sarna negra que afecta a tubérculos y cancro en los tallos, provocado por *Rhizoctonia solani* Kühn (Felix-Gastélum, 2021). Otro padecimiento importante es la podredumbre blanda en la papa o tizón sureño causando por *Sclerotium rolfsii* (telomorfo: *Athelia rolfsii* (Curzi) C.C. Tu & Kimbr), causante de grandes pérdidas en este cultivo en regiones cálidas y húmedas (Fiers *et al.* 2012).

Los fungicidas sistémicos como los triazoles son ampliamente utilizados por su eficacia contra hongos fitopatógenos en los cultivos. En Estados Unidos de América aumentó un 434 % de 2006 a 2016, a 2,880 toneladas métricas (Toda *et al.*, 2021).

Por otra parte, la rizosfera es una zona estrecha de suelo sujeta a la influencia de las raíces vivas, donde los exudados de las raíces estimulan o inhiben las poblaciones microbianas y sus actividades (Lynch y Leij, 2012). Algunos microorganismos que habitan en la rizosfera tienen la capacidad de promover el crecimiento de la planta y ejercer control sobre los fitopatógenos. Dichos microorganismos pueden ser aislados y utilizados en pro de los sistemas agrícolas (Syed Ab Rahman *et al.*, 2018). Una alternativa para reducir el uso de agroquímicos es la implementación de cepas bacterianas nativas, asociadas a la rizosfera de las plantas de papa, para el control biológico de diversos hongos fitopatógenos.

Por lo tanto, el objetivo general del presente trabajo es aislar y evaluar la efectividad de cepas nativas de bacterias de la rizosfera de papa para el control biológico de *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Rhizoctonia solani*.

2. ANTECEDENTES

2.1 El cultivo de papa; su importancia en México y en Sinaloa

La papa, es el cuarto cultivo alimenticio en el mundo después del maíz, trigo y arroz (SIAP, 2019). La papa proporciona diversos beneficios nutricionales; García (1992) reporta que, por cada 100 g de papa cocida, esta contiene 1.5 g de proteínas, 20 g de carbohidratos y 350 mg de potasio, además de vitaminas A, B y C. En México, la papa es considerada un cultivo de alto valor agregado, que genera fuentes de ingreso de manera directa o indirecta durante la cosecha (Mejía y Castellanos, 2018).

Las plantas de papa tienen una alta demanda de nutrientes; requieren más de 14 elementos minerales esenciales a lo largo de su ciclo, principalmente nitrógeno, fósforo y potasio (Whithe *et al.*, 2007). Es una planta de clima templado-frío, las temperaturas óptimas están entre los 13 y 18 °C (SIAP, 2021). En México, la papa se cultiva en dos ciclos agrícolas, el primero durante la época de lluvias (primavera-verano) y el segundo en la época de sequía (otoño-invierno), el cual está

asociado a riegos. Las principales variedades que se siembran en México para el mercado de consumo fresco son: Alpha, Atlantic, FL1867, Fianna, César, Giant y Mundial, que pertenecen al grupo de cáscara lisa y de color blanco o amarillo (SADER, 2020).

México aporta el 0.5 % del volumen mundial de producción de papa. Los principales estados productores del país son Sonora y Sinaloa, con ingresos en conjunto de 7,646,549.15 de pesos. En la región norte de Sinaloa distrito Los Mochis (Ahome, El Fuerte, Guasave y Sinaloa), se produjeron 415,201.21 t con un rendimiento de 34.48 t ha⁻¹ en el 2020 (SIAP, 2020).

2.2 Clasificación taxonomía de *Solanum tuberosum*

La clasificación taxonómica de la papa (*Solanum tuberosum*) se presenta en el **Cuadro 1**, de acuerdo a Spooner y Salas (2006).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de la papa (*Solanum tuberosum*)

Reino:	Plantae
Subreino:	Tracheobionta
Superdivisión:	Spermatophyta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Asteridae
Orden:	<i>Solanales</i>
Familia:	<i>Solanaceae</i>
Género	<i>Solanum</i>
Especie	<i>Solanum tuberosum</i> L.

2.3 Enfermedades en el cultivo de papa

La papa es afectada por una gran variedad enfermedades tanto en campo como en almacenamiento, lo que dificulta la producción sostenible y rentable de este alimento. Por lo tanto, es necesario ejecutar ciertos manejos específicos para cada agente causal con el fin de reducir el daño en la planta y disminuir pérdidas económicas (Secor y Gudmestad, 1999).

Históricamente una de las enfermedades más devastadoras de este cultivo es el tizón tardío causado por *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, que provoca manchas irregulares de un color verde pálido a oscuro rodeadas por un halo amarillento en el ápice de los peciolo, que se desarrollan hasta provocar lesiones necróticas de color marrón a negro (Méndez y Intostroza, 2009). Cuando estas manchas abarcan la superficie de la hoja puede ocasionar la muerte de la planta, en un periodo de 10 a 15 días posteriores a la pérdida del follaje (Torres, 2002).

Otro padecimiento importante que afecta a tubérculos, es la caspa plateada de la papa, una enfermedad cosmética provocada por el hongo *Helminthosporium solani* (Dur. Y Mont.) Sacc., el nombre se debe a lesiones con brillo plateado y metálico presente en la superficie del tubérculo, los síntomas del padecimiento sólo se presentan en tubérculo (Errampalli *et al.*, 2001). Este padecimiento se presenta con frecuencia en papa almacenada, donde los tubérculos infectados con el hongo sirven como inóculo para los siguientes ciclos de infección (Mérida y Loria, 1994). Sin embargo, aún se desconoce la manera en que transmite el padecimiento a la progenie, según Jellis y Taylor (1977), el hongo es transferido de la semilla madre infectada a los tubérculos descendientes debido al contacto directo o su cercanía con el inóculo.

Los tubérculos almacenados por periodo largo representan una gran vulnerabilidad ante el ataque de enfermedades como la pudrición seca de la papa, sobre todo si la piel del tubérculo ha sufrido golpes durante la cosecha (Nelson *et al.*, 1981). El agente causal pertenece al género *Fusarium* y las especies depende del área geográfica en donde se encuentre. Gachango *et al.* (2012) reporta el aislamiento e identificación de 11 especies de *Fusarium* en cultivos de papa en

Michigan, EE. UU. De las cuales *Fusarium oxysporum* Schldtl es la especie mayormente aislada, seguida de *F. equiseti* (Corda) Sacc., *F. sambucinum* Fuckel (teleomorfo *Giberella pulicaris*) y *F. avenaceum* (Fr.) Sacc.

Las enfermedades provocadas por bacterias en la papa son una seria amenaza para el cultivo. La pudrición blanda (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones, 1901) Hauben y la sarna común *Streptomyces scabiei* Lambert y Loria, una vez introducidas pueden mantenerse y propagarse en un área agrícola inadvertidamente y causar serios daños en tubérculo (Liu *et al.*, 1995; García *et al.*, 1999). *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Yabuuchi, el agente causal de la marchitez bacteriana de la papa, produce enormes cantidades de polisacáridos extracelulares que provocan la obstrucción del sistema vascular, lo que desencadena una serie de problemas en el tráfico de fluidos incluyendo el paso del agua. Se considera que las enzimas encargadas de la desintegración de la pared celular están involucradas en el colapso del tejido vascular (García *et al.*, 2019).

Los virus son causantes de enfermedades con daños significativos en el cultivo de papa, el impacto puede variar dependiendo de la presión del vector hacia la planta, inóculo del virus, condiciones climáticas, características de planta huésped, como el genotipo y etapa de desarrollo. La mayoría de los virus afectan el desarrollo de la planta, modifican la pigmentación, provocan necrosis en tubérculo y área foliar, sus principales vectores son áfidos (Anderson *et al.*, 2004). El *Potato virus x* (PVX), *Potato virus y* (PVY), *Potato virus s* (PVS) y *Potato leafroll virus* (PLRV) son virus limitantes en la producción de papa, rara vez pueden ser letales, aunque reducen el vigor de la planta y el rendimiento del tubérculo (Hooker, 1981). Los virus pueden realizar infecciones mixtas en la planta aumentando la dificultad de su identificación (Baldauf *et al.*, 2007).

Otros vectores reportados son la nematodo aguja *Longidorus* spp. y el nematodo daga *Xiphinema* spp., estos no muestran síntomas propios, su presencia es identificada por los síntomas que causan los virus (Agris, 2005)

Los nematodos fitopatógenos provocan la reducción del 10 al 15 % del rendimiento y afectan la calidad del tubérculo, son causantes de una pérdida

económica anual en el mundo de 78 billones de dólares (Mustafa, 2018). Las especies de nematodos reportadas como patogénicas en el cultivo de papa son el nematodo del quiste de la papa (*Globodera arenaria* Cizhov, Udalova y Nasonova, 2008 y *Globodera pallida* ((Stone, 1973) Behrens, 1975), el nematodo del nudo de la raíz (*Meloidogyne* spp.), el nematodo de la lesión radicular (*Pratylenchus* spp.), el nematodo de la pudrición de la papa (*Ditylenchus destructor* Thorne, 1945), el nematodo del tallo (*Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev, 1936), estas especies tienen en común que se alimentan de raíces, tubérculos o ambos (Jalata, 1986; Mustafa, 2018).

2.4 Estrategias de control de enfermedades fúngicas

La elección de una estrategia de control de enfermedades o el diseño de alguna, está basada y justificada en la información obtenida a partir del estudio científico de los síntomas, causas y los mecanismos que favorecen la proliferación de las enfermedades en las plantas (López, 2001). La diferencia entre los métodos de control de enfermedades radica en la amplia variación de las mismas y la interacción planta-patógeno. Los métodos de control son empleados antes que la enfermedad se presente, por lo que cumplen una función protectora, aunque es posible controlar enfermedades infecciosas en campo con el uso de tratamientos terapéuticos. Los métodos de control biológicos y ciertos métodos culturales son empleados en el fortalecimiento del hospedante o facilitan el desarrollo de microorganismo antagónicos del patógeno. Por otro lado, la quimioterapia tiene la capacidad de proteger y curar infecciones que yacen en las plantas (Agrios, 2005).

2.4.1 Control cultural o preventivo

Existen diversas estrategias de transmisión empleadas por hongos fitopatógenos, la transmisión por suelo tiene un grado de dificultad mayor de manejo, ya que en el suelo se encuentra un ecosistema múltiple. La solarización es un método eficiente para controlar este tipo de patógenos, principalmente en zonas tropicales y subtropicales. La solarización emplea un manto de polietileno transparente capaz

de cubrir el suelo previamente humedecido, el manto captará la luz solar y aumentará la temperatura del suelo (Katan *et al.*, 1976; Katan, 1981).

Raj y Sharma (2005) reportan un 100 % de mortalidad de esclerocios procedente de *S. rolfsii* Sacc a una profundidad de 7 cm con temperaturas registradas de 39.6 °C durante los 40 días que duró el proceso de solarización. Sin embargo, el porcentaje de mortalidad disminuyó a 80 y 70 % en esclerocios colocados a 15 cm de profundidad. Elad (1979) reporta un 100 y 80 % de mortalidad de esclerocios de *S. rolfsii* a 5 y 20 cm de profundidad respectivamente. Tyagi y Raj (2021) reportan 88.7 % de la pérdida de viabilidad de esclerocios provenientes de *Rhizoctonia solani* Kühn en plantas de crisantemo, a una profundidad de 5 cm alcanzado una temperatura de 45.9 °C durante 40 días.

2.4.2 Control químico

El control químico es un método empleado tanto en campo, invernadero y almacenes. Se emplean sustancias tóxicas que inhiben la germinación, el crecimiento o la fase reproductiva del patógeno. Algunos compuestos químicos tienen la característica de ser tóxicos para la mayoría de los patógenos y otros son específicos para un organismo (Agrios, 2005). El carbendazim es un fungicida que ha sido ampliamente utilizado en el norte de Sinaloa contra *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary en frijol, aunque al igual que otros benzimidazoles el uso prolongado por más de 30 años en la región ha disminuido la sensibilidad, una alternativa empleada es el uso de fluazinam, boscalid + pyraclostrobin, fludioxonil + ciprodonil y el procloroaz (Ayala *et al.*, 2015).

El uso de fungicidas sistémicos como hexaconazol y tebuconazol en ensayos *in vitro* contra *S. rolfsii* mostró alta inhibición del hongo, así como el uso de propiconazol y mycobutnil en concentraciones de 1 a 100 ppm (Das *et al.*, 2014). Resultados similares han sido reportados por Madhavi y Bhattiprolu (2011), quienes evaluaron el crecimiento micelial y la germinación de esclerocios de *S. rolfsii* aislado de *Capsicum annum* L. *in vitro* contra los fungicidas hexaconazol, tebuconazol, propiconazol y difenconazole, con porcentajes de inhibición de hasta 82.2 %.

Otros fungicidas sistémicos como el pencicuron y flutolanil en combinación con *Verticillium biguttatum*, W. Gams han demostrado ser eficientes en el control de la costra negra en papa provocada *Rhizoctonia solani* (Van de Boorgert *et al.*, 2004). Djébali y Belhassen (2010) reportan la efectividad de pencicuron y azoxystrobin para el control de *R. solani* en diversas variedades de tubérculos semillas sembradas en suelos infestados con el patógeno. Para el control *R. solani* y *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) S. Hughes en campos mexicanos, Rodríguez-Campos (2008) recomienda una mezcla de tiofanato metílico con thifluzamida o azoxistrobina, lo que reduce el número de agroquímicos empleados de hasta 5 productos a solo dos.

2.4.3 Control biológico

El control biológico agrícola tiene como principio básico controlar plagas por medio del empleo de enemigos naturales, ya sean insectos benéficos, depredadores, parasitoides o microorganismos como bacterias y hongos, sin causar daños en los cultivos ni a enemigos naturales presentes. El control biológico tiene la ventaja que, al ser un método racional y amigable con el medio este no deja residuos en las plantas (Montenegro y Osorio, 2019). El primer método de control biológico con fines comerciales, para controlar la agalla de la corona en plantas, fue introducido por New y Kerr en 1972, empleando una bacteria antagónica (Agrios, 2005).

Diferentes autores han reportado el potencial antagónico de microorganismos como hongos y bacterias contra fitopatógenos de importancia agrícola. Algunos de los hongos con capacidad antagónica reportados son *Trichoderma* spp. (Hoyos *et al.*, 2008; Infante *et al.*, 2009; Mohamed *et al.*, 2021), *Coniothyrium minitans* C.K.Campb, *Pythium oligandrum* Drechsler y *Talaromyces flavus* (Klöcker) Stolk y Samson (Madi *et al.*, 1997). El efecto antagónico de estos organismos radica en la variedad de mecanismos que emplean durante el micoparasitismo y la competencia interespecífica (Naraghi *et al.*, 2012).

Se han reportado el uso de bacterias con cualidades antifúngicas, Fernando *et al.* (2006) reportaron a *Pseudomonas chlororaphis* (Guignard y Sauvageau) Peix, *Bacillus amyloliquefaciens* (Fukomoto) Priest (BS6), *Pseudomonas* sp. (DF41) y *Bacillus megaterium* (de Bary) (E16) con actividad

antagónica *in vitro* contra *S. sclerotiorum*, la cepa PA-23 inhibió la germinación de las ascosporas en pétalos de canola, además, de aumentar los niveles de enzimas hidrolíticas como la quitina y β -1,3-glucanasa. En pruebas en campo, las cepas PA-23 y BS6 mostraron diferencias estadísticas significativa con control (patógeno inoculado). Mohamed et al. (2021) realizaron pruebas de antagonismo *in vitro* e *in planta* contra *R. solani* y *S. sclerotiorum*, con aislados de *Bacillus subtilis* (Cohn) (Bs1 y Bs2), dos aislados de *B. megaterium* (de Bary) (Bm1 y Bm2), un aislado de *Paenibacillus polymyxa* (Prazmowski) Ash y dos aislados de *Pseudomonas fluorescens* (Migula), (Pf1 y Pf2). Los aislados Bm1, Bm2 y Bs2 inhibieron hasta el 70 % de crecimiento micelial de *R. solani* en pruebas *in vitro*, los aislados Bs1, Bm1 y Bm2 mostraron hasta el 50 % de inhibición micelial contra *S. sclerotiorum*.

En pruebas de biocontrol *in planta* en condiciones de invernadero, *P. polymyxa* y *P. fluorescens* (Pf2) contra *R. solani* mostraron un bajo porcentaje de severidad, 22.8 y 23.4 % respectivamente. En las pruebas contra *S. sclerotiorum*, el aislado Bm1 obtuvo el 38.1 %.

2.5 Sclerotinia sclerotiorum

Sclerotinia sclerotiorum, es un hongo fitopatógeno que se encuentra distribuido en todo el mundo, principalmente en zonas templadas del hemisferio norte, aunque, también está presente en algunas regiones desérticas o tropicales, durante las épocas frías (Apodaca, 2012), con temperaturas moderadas y periodos de elevada humedad (Campa et al., 2009).

Este patógeno afecta a más de 500 especies de plantas (Saharan y Mehta 2008; Campa et al., 2009). Chang y Kim (2003) reportaron la identificación del patógenos en las siguientes especies: *Adenophora remotiflora* (Siebold & Zuccarini) Miquel, *Armoracia rusticana* Schur P.Gaertn., B.Mey. y Scherb, *Angelica acutiloba* (Siebold & Zucc.) Kitag, *Angelica archangelica* L., *Aster tataricus* L.fil., *Beta vulgaris* L var. cicla, *Brassica campestris* L. var. *marinasa*, *Brassica juncea* L. Czern var. *laciniata*, *Cichorium intybus* L., *Lactuca indica* L. var. *dracoglossa*, *Lactuca sativa* L var. *crispa*, *Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss y *Phyteuma japonicum* Miq.

El síntoma característico de *S. sclerotiorum* es la aparición de un micelio veloso y blanco en el que en poco tiempo se desarrollan grandes estructuras de resistencia compactas llamadas esclerocios, los cuales son blancos al principio, pero posteriormente se ennegrecen y endurecen superficialmente, con diámetro de 2 a 10 mm, aplanados y largos (Agrios, 2005). *Sclerotinia sclerotiorum* puede sobrevivir durante más de 5 años en el suelo (Adams y Ayers, 1979).

El moho blanco causado por *S. sclerotiorum* es una enfermedad presente en los cultivos de papa en el norte de Sinaloa (Felix-Gastelum, 2021). Este se desarrolla en temperaturas entre 1 a 32 °C, con una temperatura óptima de infección para algunos hospedantes de 19 a 24 °C, mismas que son coincidentes con las lluvias que proporciona la humedad necesaria para el desarrollo del hongo (Reichert y Palti, 1967).

Este padecimiento suele presentarse en campos con un sistema de irrigación aérea que aumenta los niveles de humedad en la planta. Los primeros síntomas se presentan en la parte inferior de la planta en el cultivo de papa, estos síntomas suelen pasar desapercibidos para los agricultores, la planta infectada presenta marchitez en las semanas finales de la etapa de crecimiento (Ojaghian y Davoudi, 2019). Los tubérculos alcanzan su mayor desarrollo durante las semanas finales de la temporada donde no se aplican métodos de control contra la enfermedad, lo que lleva a una pérdida significativa en el rendimiento (Ojaghian, 2011).

2.5.1 Taxonomía

El **Cuadro 2** se presenta la clasificación taxonómica de *S. sclerotiorum* de acuerdo a Purdy (1979).

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de *S. sclerotiorum*

Super reino	Eukaryota
Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Clase	Leotiomycetes
Orden	Helotiales
Familia	Sclerotiniaceae
Género	<i>Sclerotinia</i>
Especie	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary

2.5.2 Ciclo de vida

En condiciones adversas el hongo es capaz de sobrevivir en forma de esclerocio en el suelo, cuando las condiciones climáticas son favorables, en los esclerocios se presenta germinación de apotecios, estos forman ascas que contienen ascosporas que son liberadas hacia el medio. Las ascosporas germinan e infectan pétalos senescentes y zonas axilares del tallo iniciando el proceso de infección en la planta de papa. Los primeros síntomas son lesiones acuosas en tallo y ramas, posteriormente las lesiones son cubiertas de micelio blanco de aspecto algodonoso (Ojaghian, 2009; Kurt *et al.*, 2017). Sobre el tejido infectado se forman esclerocios, éstos terminan en el suelo o restos de plantas (**Figura 1**).

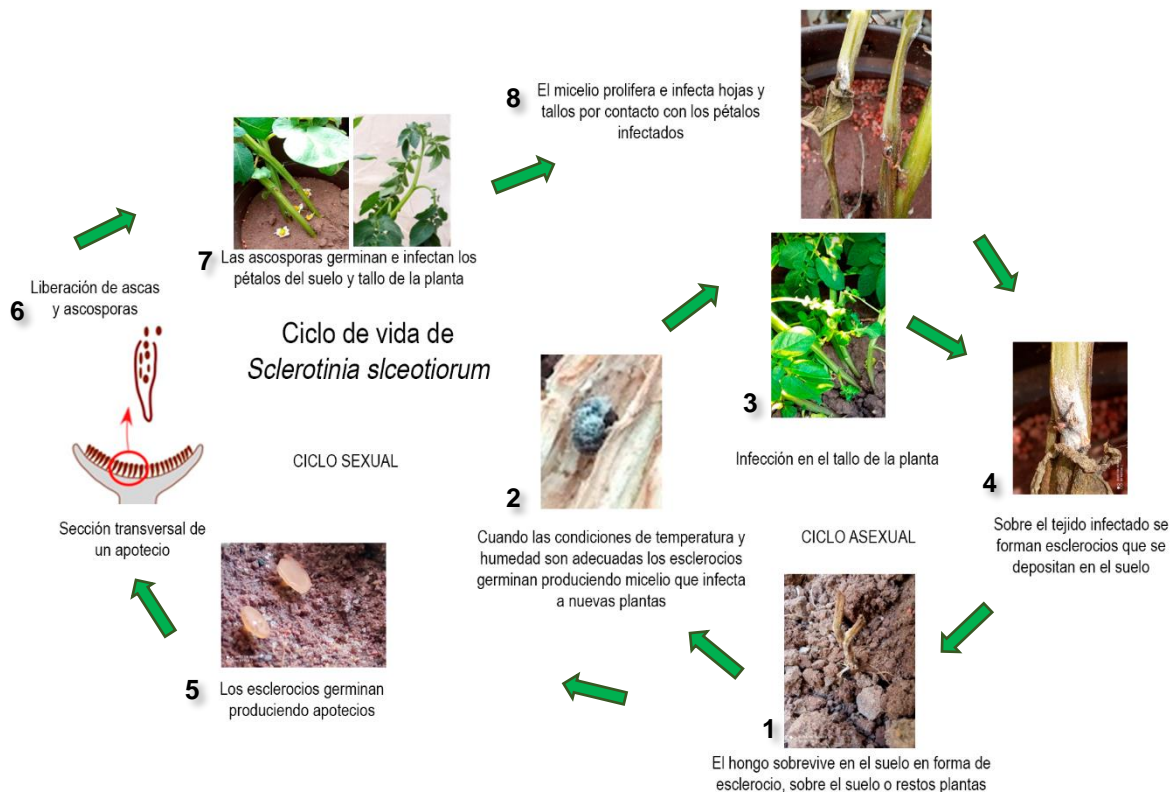


Figura 1. Ciclo biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* (Negrillo et al., 2009). Fase asexual; 1. Supervivencia del patógeno en el suelo, 2. Germinación y proliferación del hongo, 3. Infección en el tallo de la planta, 4. Formación de esclerocios en el tejido infectado. Fase sexual; 5. Germinación y formación de apotecios, 6. Liberación de ascosporas al ambiente, 7. Infección de tallo y pétalos senescentes en el suelo, 8. Proliferación del micelio y ataque a la planta

2.6 *Sclerotium rolfsii*

Sclerotium rolfsii (teleomorfo: *Athelia rolfsii*) un hongo fitopatógeno, habitante del suelo, con alrededor de 500 hospederos, en los que causa podredumbres de raíz y cuello. La enfermedad que produce recibe diferentes denominaciones en la literatura: pudrición basal de tallo y raíz, mal del esclerocio, añublo sureño o tizón sureño, son algunas de ellas (Fernández et al., 2013).

Los esclerocios de *S. rolfsii* se propagan fácilmente en suelo adherido a zapatos, herramientas manuales, vehículos neumáticos, maquinaria o salpicaduras de agua (Billah, 2017). *Sclerotium rolfsii* secreta ácido oxálico que es corrosivo para numerosos tejidos de plantas susceptibles, este reacciona con el calcio presente en

los tejidos vegetales, posterior a esta reacción, el calcio es disociado de los compuestos peptídicos de las paredes celulares de las plantas, lo que favorece a las enzimas del hongo que degradan la celulosa y tejidos de la pared celular (Bateman y Beer, 1965; Punja y Damiani, 1996).

El tizón del sur causado por el hongo *S. rolfsii*, es una de las enfermedades más importantes de los cultivos de hortalizas, incluida la papa, que causa grandes pérdidas económicas en las regiones cálidas y húmedas (Fiers *et al.*, 2012). Pequeñas lesiones de color amarillo-tostado ligeramente hundidas (2-3 mm) se presentan en las lenticelas de la papa. El micelio y los esclerocios se desarrollan abundantemente en los tejidos en descomposición. En ocasiones, las bacterias ingresan a los tejidos previamente dañados y se nota un olor agrio (Mullen, 2001).

Este patógeno forma esclerocios por lo que es difícil de controlar a través de prácticas culturales o tratamiento químico tradicional. Se ha utilizado mezcla de compuestos químicos para el tratamiento de semillas, que en ocasiones suele ser eficaz para controlar a los patógenos transmitidos por el suelo, sin embargo, la aplicación ha favorecido el desarrollo de la resistencia de patógenos a fungicidas y contaminado el medio ambiente (Rubayet *et al.*, 2017).

2.6.1 Taxonomía

La clasificación taxonómica de *S. rolfsii* se presenta en el **Cuadro 3**, de acuerdo a Schouch et al. (2020).

Cuadro 3. Clasificación taxonómica de *S. rolfsii*

Super reino	Eukaryota
Reino	Fungi
Filo	Basidiomycota
Clase	Agaricomycetes
Orden	Atheliales
Familia	Atheliaceae
Género	<i>Athelia</i>
Especie	<i>Athelia rolfsii</i> (Curzi) C.C. Tu & Kimbr.

2.6.2 Ciclo de vida

El patógeno es capaz de sobrevivir en forma de esclerocios por varios años en el suelo o en restos vegetales, cuando las condiciones ambientales son óptimas los esclerocios germinan e inicia el desarrollo micelial y el proceso de infección, el cual se lleva a cabo en el cuello de las plantas de papa, lo que provoca manchas de color marrón grisáceo, necrosis cortical y pudrición de tubérculo. En la superficie de los tubérculos infectados se desarrolla micelio blanco en forma de abanico, en este se desarrollan los esclerocios con una tonalidad blanca que posteriormente torna a marrón oscuro con diámetros de 2 a 4 mm, estos permanecen en el suelo o en tejido vegetal (Kibria, 1975; Garibaldi *et al.*, 2006; Roca *et al.*, 2016). El ciclo de *S. rolfsii* en el cultivo de papa se aprecia en la **Figura 2**.

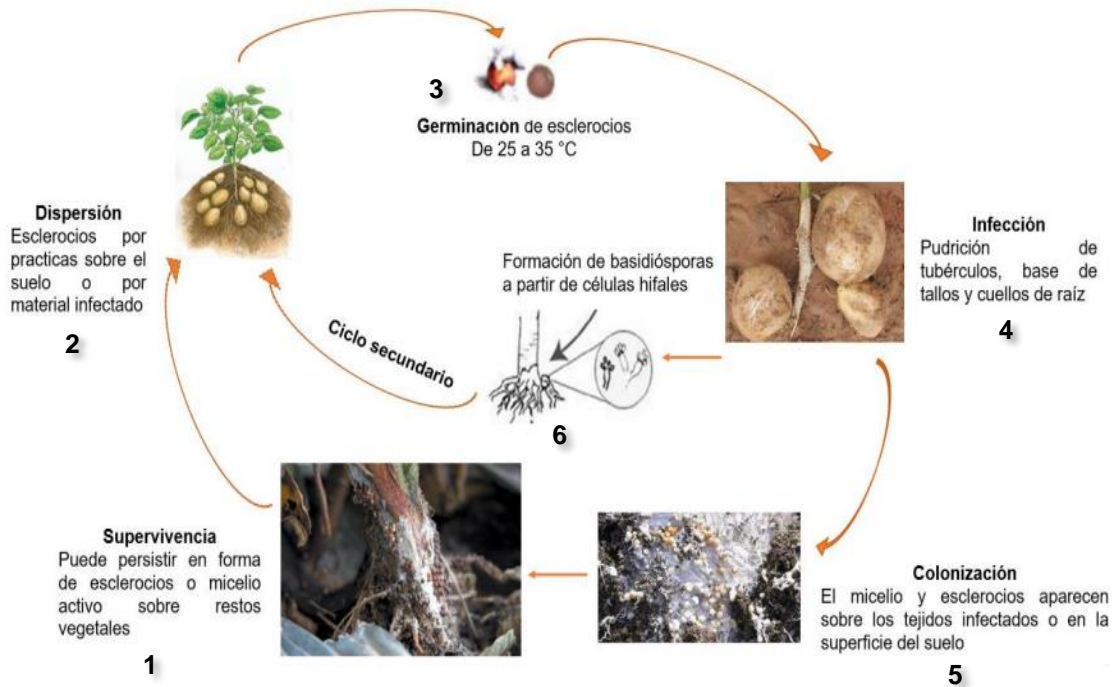


Figura 2. Ciclo de vida *Sclerotium rolfsii* (Aycock, 1966). Fase asexual; 1. El patógeno sobrevive en forma de esclerocio o micelio en restos vegetales, 2. Dispersión de esclerocios en el suelo, 3. Germinación de esclerocios en condiciones óptimas, 4. Proceso de infección en órganos inferiores de la planta, 5. Propagación de micelio y formación de esclerocios. Fase sexual; 6. Formación y dispersión de basidiósporas

2.7 *Rhizoctonia solani*

Rhizoctonia solani (teleomorfo: *Thanatephorus cucumeris*) es un hongo fitopatológico común en los cultivos de papa en todo el mundo, es responsable de causar enfermedades económicamente importantes como la costra negra y canchros en el tallo de la papa (Banville, 1989). Este hongo está clasificado en grupos de anastomosis (GA) y subgrupos, se han reportado 13 GA. El grupo AG3PT ha sido reportado como el causante de enfermedades en papa (Carling y Leiner, 1986; Balali *et al.*, 1995; Woodhall *et al.*, 2008).

Las fuentes de infección son tubérculos infectados con esclerocios e hifas y suelos contaminados con el hongo (Jager *et al.*, 1991). Se transmite por medio de tubérculo semillas infectados, siendo estos el principal inóculo. Los síntomas

pueden presentarse en partes subterráneas y aéreas de las plantas. La costra negra es provocada por la formación de esclerocios negros irregulares en la parte superficial del tubérculo, en lesiones severas el tubérculo puede presentar deformación y agrietamiento. El cancro del tallo provoca lesiones necróticas en la punta de los brotes lo que puede causar el retraso del crecimiento o la inhibición de la planta en etapa de emergencia. En tallo se puede apreciar canchros de color marrón, secos y hundidos, provocando retraso en desarrollo de la planta al atacar a raíces y estolones, en casos severos pueden desarrollarse tubérculos aéreos de color verde en la superficie del suelo (Banville, 1989; Carling *et al.*, 1989).

2.7.1 Taxonomía

La clasificación taxonómica de *R. solani* (teleomorfo: *Thanatephorus cucumeris*) se presenta en el **Cuadro 4**, de acuerdo a Schouch et al. (2020).

Cuadro 4. Clasificación taxonómica de *R. solani*

Super reino	Eukaryota
Reino	Fungi
Filo	Basidiomycota
Clase	Agaricomycetes
Orden	Cantharellales
Familia	Ceratobasidiaceae
Genero	<i>Rhizoctonia</i>
Especie	<i>Rhizoctonia solani</i> Kühn

2.7.2 Ciclo de vida

El patógeno sobrevive en forma de esclerocios sobre tubérculos semilla o como micelio en residuos de cosechas de manera saprofítica (**Figura 3**). Cuando los tubérculos semilla infectados son plantados, el hongo se desarrolla desde la superficie de la semilla hasta el desarrollo del brote ocasionado la infección de la raíz primordial, estolones primordiales y de los primordios foliares. El inóculo presente en los restos vegetales necesita tener cercanía con los órganos de la planta para realizar el proceso de infección, este puede ser igual de perjudicial para el hospedero (Wharton *et al.*, 2007).

La planta puede presentar el proceso de infección en cualquier etapa de cultivo. Los síntomas del complejo patológico Rhizoctonia son observados en partes aéreas y subterráneas de la planta en dos fases, la infección de las plantas en crecimiento (cancro de tallo) e infección de tubérculos por formación de esclerocios (costra negra). El cancro del tallo se presenta en etapas tempranas causando lesiones en las puntas de los brotes, lo que puede inhibir o retrasar la etapa de emergencia. Por otro lado, cuando la severidad de la costra negra es alta, los tubérculos pueden presentar deformaciones y agrietamientos (Tsrer, 2010).

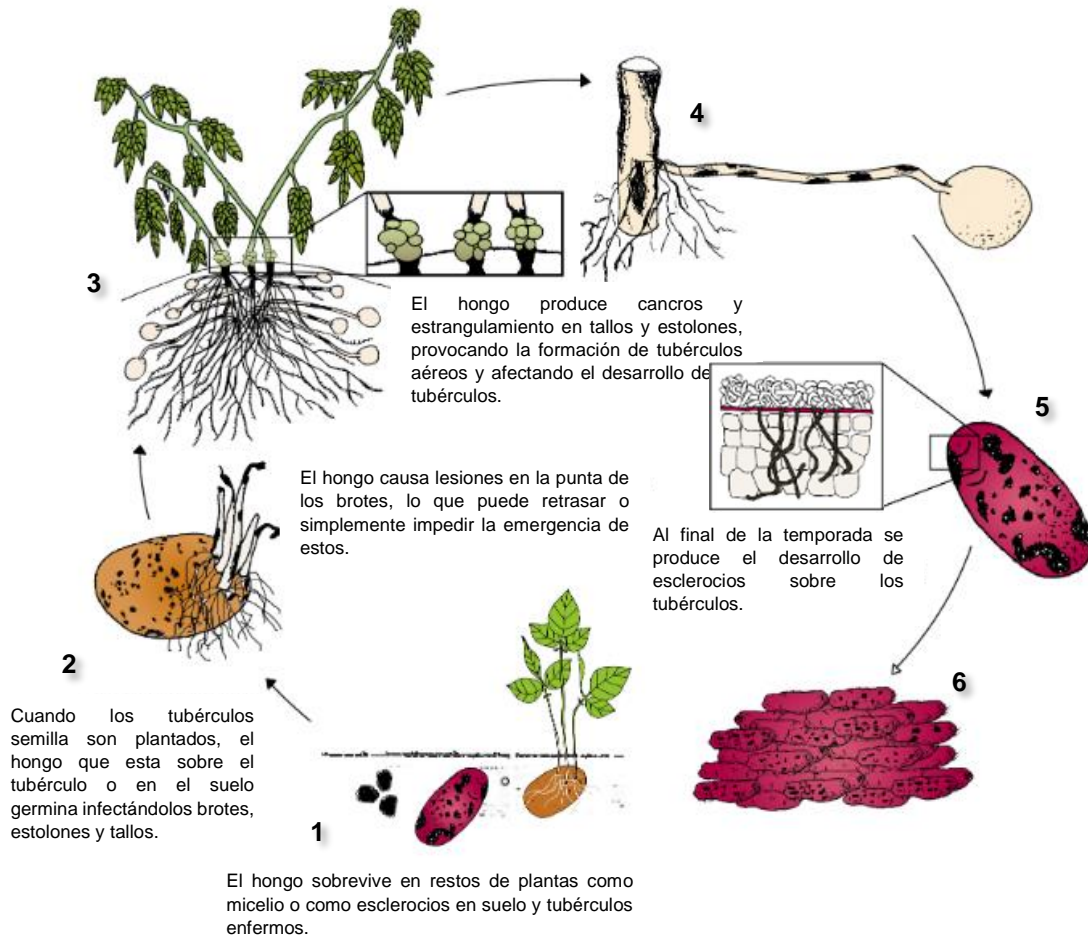


Figura 3. Ciclo de *Rhizoctonia solani* (Acuña et al., 2015). 1. El patógeno sobrevive en esclerocios y en restos de las plantas, 2. Germinación del hongo e infección brotes estolones y tallos, 3. Retraso o impedimento del desarrollo de brotes, 4. Desarrollo de canchros y estrangulamiento en tallos y estolones, 5. Desarrollo de esclerocios sobre los tubérculos, 6. Los tubérculos son almacenados para ser usados como tubérculo semilla o con fines comerciales.

2.8 Interacción microorganismo planta

La rizosfera es el campo de acción o influencia de una raíz, una zona estrecha de suelo sujeta a la influencia de las raíces vivas, donde los exudados de las raíces estimulan o inhiben las poblaciones microbianas y sus actividades (Lynch and Leij, 2012). En el suelo se encuentra una concentración de bacterias, pero, la concentración es mayor en la rizosfera, esto se debe a las condiciones proporcionadas por las plantas, un amplio rango de sustratos como fuentes de carbono o nitrógeno (Lynch, 1990; Glick, 1995). Sin embargo, la temperatura, el pH y la cantidad de fósforo disponible en el suelo pueden ser determinantes en el desarrollo de poblaciones microbianas (Calvo, 2008).

Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) son un grupo al que pertenecen algunas especies de bacterias que aportan a la planta ventajas directas e indirectas en el desarrollo y salud ante condiciones adversas tanto abióticas como bióticas, el término fue empleado por primera vez por Kloepper y Schroth (1980). Estos autores en pruebas *in planta* bajo condiciones de invernadero midieron el efecto de aislados de RPCV en plantas de papa, reportaron un 100 % en el incremento del peso de las plantas y un aumento de crecimiento estolonífero del 25 a 550 %.

Dentro de los géneros reportados como RPCV se encuentran aislados de los géneros *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Rhizobium* y *Serratia* (Bashan y de-Bashan, 2005; Santoyo *et al.*, 2012).

2.9 Mecanismos de antagonismo empleados por bacterias

Los mecanismos de antagonismo empleados por agentes bacterianos son diversos y pueden presentar más de uno (Ahmad *et al.*, 2008). Algunos mecanismos reportados para bacterias del del género *Bacillus*, *Burkholderia*, *Streptomyces* y *Pseudomonas* son el uso de enzimas líticas, producción de polipéptidos, producción

de sideróforos, solubilización de fosfatos y producción de ácido indolacético (Valencia *et al.*, 2005; Trujillo *et al.*, 2007; Arcos y Zuñiga, 2015).

El hierro es un elemento que controla el crecimiento de microorganismos endófitos (patógenos o no patógenos) y rizosféricos (Aguado-Santacruz *et al.*, 2012). La síntesis de sideróforos por aislados bacterianos se lleva a cabo en ambientes deficientes de hierro y se ha relacionado con la promoción de crecimiento vegetal y como factor limitante de crecimiento de patógenos (Kloepper *et al.*, 1980). Los sideróforos actúan como sustancias quelantes de hierro en el entorno, lo que reduce la cantidad de hierro disponible para los microorganismos, las plantas que son capaces de asimilar el hierro proveniente de sideróforos aumentan sus posibilidades de supervivencia y adaptación a diferentes condiciones de suelo (Wang *et al.*, 1993).

Las bacterias tienen la capacidad de producir diferentes compuestos volátiles relacionado con una respuesta sistemática inducida (RSI), lo que activa los sistemas de defensas de la planta contra patógenos (Rojas-Solís *et al.*, 2008). Rudrappa *et al.* (2010), reportan a *Bacillus subtilis* FB17 como productor de acetoína (3-hidroxi-2butanona), un compuesto volátil con la capacidad de activar la RSI en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Ryu *et al.* (2003) reportaron los aislados bacterianos *B. subtilis* GB03 y *B. amyloliquefaciens* IN937a como productores de 2-3 butanediol y acetoína, compuestos volátiles responsable de la señalización química entre las bacterias y la estimulación en el desarrollo de *A. thaliana*.

3. JUSTIFICACIÓN

Sinaloa ocupa el segundo lugar en producción de papa (*S. tuberosum*) a nivel nacional, en 2020 se sembraron un total de 61,532.44 ha⁻¹. Sin embargo, las enfermedades de origen fúngico causadas por *S. sclerotiorum*, *S. rolfsii* y *R. solani* ocasionan daños significativos al cultivo afectando la producción y calidad del producto, esto reduce el valor final del tubérculo lo que resulta en menores ganancias para el agricultor.

La aplicación de fungicidas reduce o inhibe el crecimiento fúngico, aunque, el uso indiscriminado de productos químicos contribuye con la contaminación de los suelos y afecta a la salud de los usuarios que manejan el producto. El proteger a las plantas de patógenos o aumentar la producción, trae consigo consecuencias negativas tanto para el ambiente como para la salud humana.

Una alternativa para disminuir la aplicación de productos químicos es el uso de estrategias biológicas como es el empleo de cepas bacterianas nativas como control biológico de diversos hongos fitopatógenos. El uso de estas cepas con potencial antagonico, tiene como beneficio la capacidad de adaptación adquirida a través del tiempo a las condiciones climáticas del norte de Sinaloa

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la efectividad antagónica en cepas endémicas de bacterias de la rizosfera de papa para el control biológico de *S. rolfsii*, *S. sclerotiorum* y *R. solani* *in vitro* e *in planta*.

4.2 Objetivos específicos

1. Obtener una colección de aislados bacterianos de rizosfera de plantas de papa y de hongos fitopatógenos, recolectados en diferentes lotes del norte de Sinaloa.
2. Evaluar el potencial antagónico *in vitro* de los aislados bacterianos endémicos contra los hongos fitopatógenos *S. sclerotiorum*, *S. rolfsii* y *R. solani*.
3. Evaluar la efectividad biológica *in planta* de los aislados bacterianos seleccionados *in vitro* contra los hongos fitopatógenos.
4. Determinar los mecanismos de antagonismos de los aislados bacterianos con mayor potencial antagónico.
5. Identificar molecularmente los aislados de *S. sclerotiorum* y bacterias con actividad antagónica contra los tres hongos fitopatógenos.

5. HIPÓTESIS

Al menos uno de los aislados bacterianos nativos presenta actividad antagónica contra *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Rhizoctonia solani* *in vitro* e *in planta* en papa en condiciones de invernadero.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Estrategia de trabajo

La **Figura 4** muestra el esquema general de trabajo para la presente investigación.

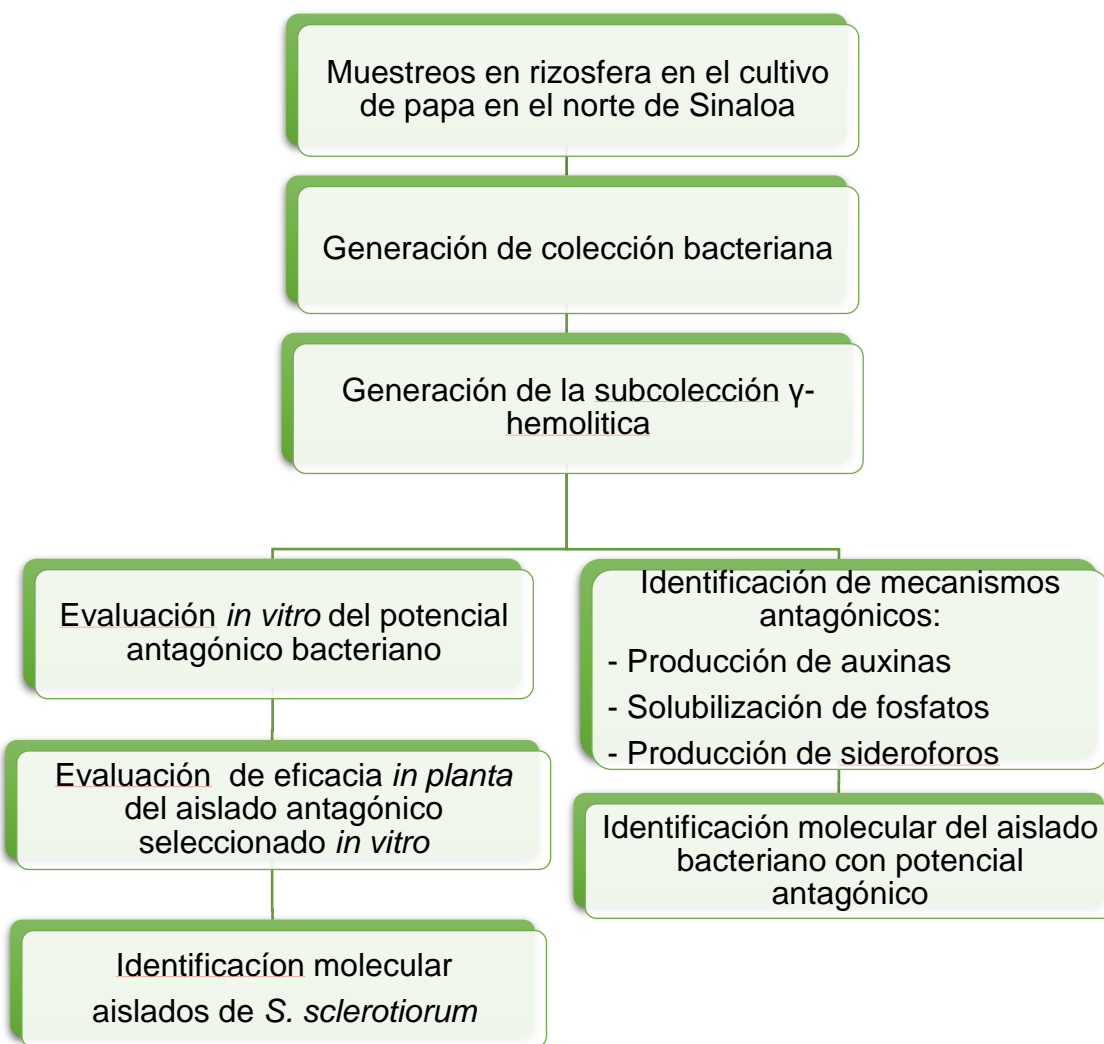


Figura 4. Estrategia general de trabajo

6.2 Obtención de aislados bacterianos

Se realizaron muestreos en cinco lotes comerciales de papa del municipio de Ahome y siete lotes del municipio de El Fuerte (**Cuadro 5**). En cada lote se recolectó suelo de la rizosfera de las plantas, utilizando el método de cinco de oros, que consiste en obtener cinco sub muestras (cuatro en orillas y una central del área seleccionada), las muestras se colectaron con una pala de jardín. En cada punto de muestreo se obtuvieron aproximadamente 300 g de suelo de diferentes plantas. Estas 60 submuestras se transportaron en bolsas de plástico de forma inmediata al Laboratorio de Fitopatología y Medio Ambiente de la Universidad Autónoma de Occidente (UAdeO) para su procesamiento.

6.3 Procesamiento de las muestras

Se separó, con un pincel, el suelo adherido a las raíces de cada submuestra por lote, posteriormente se mezcló todo el suelo obtenido de las cinco submuestras para formar una muestra representativa de cada lote, dando un total de 12 muestras.

6.4 Creación de colección de bacterias de la rizosfera de papa

Se pesó 1.3 g de suelo por muestra en una balanza analítica (modelo AR2140) y se colocó en tubos Eppendorf de 1.6 ml, posteriormente se le agregó 1 ml de agua destilada estéril (ADE) y se agitó por un minuto en un agitador vortex tipo mx-s (DLAB, LB2000). Se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-4} de cada una de las diez muestras compuestas. Se colocaron 100 μ l de las últimas diluciones en cajas Petri con medio agar nutritivo (**Anexo 1**) por duplicado y se plaqueo con varilla de cristal bajo condiciones asépticas en campana de flujo laminar (ESCO Laminar Flow Cabinet). Las cajas Petri se colocaron en una incubadora (Binder, BD 115) a 24 °C durante un tiempo de 24 a 48 horas. Posteriormente las colonias de bacterias, se purificaron mediante estrías en cajas Petri con medio agar Luria Bertani (LB; **Anexo 2**) en condiciones asépticas y se incubaron a 24°C por 24 horas finalizando el proceso de purificación.

Las colonias purificadas en agar LB, se cultivaron en 1 ml medio LB líquido en tubos Eppendorf de 1.6 ml a 25 °C, con agitación (220 RPM) por 40 h. Una vez que los

aislados crecieron en el medio líquido, se tomaron 780 µl del medio con bacteria y se colocaron en tubos con 520 µl de glicerina al 50 %, quedando así un medio al 20 % de glicerina, posteriormente se rotularon y se conservaron a -20 °C (**Cuadro 5**).

Cuadro 5. Código de los aislados bacterianos, ubicación y su fecha de recolección en el norte de Sinaloa.

Aislado	Municipio	Localidad	Coordenadas	Fecha
A01	El Fuerte	Huepaco	25°56'42.9"N 108°49'39.8"W	05/01/2021
A02	El Fuerte	Huepaco	25°56'42.9"N 108°49'39.8"W	05/01/2021
A03	El Fuerte	Huepaco	25°56'42.9"N 108°49'39.8"W	05/01/2021
A04	El Fuerte	Huepaco	25°56'42.9"N 108°49'39.8"W	05/01/2021
A05	Ahome	5 de Mayo	25°51'05.0"N 108°56'37.2"W	31/12/2020
A06	Ahome	5 de Mayo	25°51'05.0"N 108°56'37.2"W	31/12/2020
A07	Ahome	5 de Mayo	25°51'05.0"N 108°56'37.2"W	31/12/2020
A08	Ahome	5 de Mayo	25°51'05.0"N 108°56'37.2"W	31/12/2020
A09	Ahome	5 de Mayo	25°51'05.0"N 108°56'37.2"W	31/12/2020
A10	Ahome	5 de Mayo	25°51'05.0"N 108°56'37.2"W	31/12/2020
B01	Ahome	5 de Mayo	25°51'05.0"N 108°56'37.2"W	31/12/2020
B02	Ahome	Km 19	25°55'14.5"N 108°50'21.3"W	07/01/2021
B03	El Fuerte	Km 19	25°55'14.5"N 108°50'21.3"W	07/01/2021
B04	El Fuerte	Km 19	25°55'14.5"N 108°50'21.3"W	07/01/2021
B05	El Fuerte	Km 19	25°55'14.5"N 108°50'21.3"W	07/01/2021
B06	El Fuerte	Km 19	25°55'14.5"N 108°50'21.3"W	07/01/2021
B07	El Fuerte	Km 19	25°55'14.5"N 108°50'21.3"W	07/01/2021
B08	Ahome	Plan de Ayala	25°46'15.1"N 109°02'44.8"W	11/01/2021
B09	Ahome	Plan de Ayala	25°46'15.1"N 109°02'44.8"W	11/01/2021
B10	Ahome	Plan de Ayala	25°46'15.1"N 109°02'44.8"W	11/01/2021
C01	Ahome	Plan de Ayala	25°46'15.1"N 109°02'44.8"W	11/01/2021
C02	Ahome	Plan de Ayala	25°46'15.1"N 109°02'44.8"W	11/01/2021
C03	Ahome	Plan de Ayala	25°46'15.1"N 109°02'44.8"W	11/01/2021
C04	Ahome	Ejido Mochis	25°48'56.0"N 109°02'53.9"W	04/01/2021
C05	Ahome	Ejido Mochis	25°48'56.0"N 109°02'53.9"W	04/01/2021
C06	Ahome	Ejido Mochis	25°48'56.0"N 109°02'53.9"W	04/01/2021
C07	Ahome	Ejido Compuertas	25°49'35.5"N 109°01'33.1"W	04/01/2021
C08	Ahome	Ejido Compuertas	25°49'35.5"N 109°01'33.1"W	04/01/2021
C09	Ahome	Ejido Compuertas	25°49'35.5"N 109°01'33.1"W	04/01/2021
C10	Ahome	Ejido Compuertas	25°49'35.5"N 109°01'33.1"W	04/01/2021
D01	Ahome	Ejido Compuertas	25°49'35.5"N 109°01'33.1"W	04/01/2021
D02	Ahome	5 de Mayo	25°49'57.1"N 108°56'57.7"W	31/12/2021
D03	Ahome	5 de Mayo	25°49'57.1"N 108°56'57.7"W	31/12/2021
D04	Ahome	5 de Mayo	25°49'57.1"N 108°56'57.7"W	31/12/2021
D05	Ahome	5 de Mayo	25°49'57.1"N 108°56'57.7"W	31/12/2021
D06	El Fuerte	Ejido 2 de Abril	25°54'23.0"N 108°56'50.8"W	31/12/2021
D07	El Fuerte	Ejido 2 de Abril	25°54'23.0"N 108°56'50.8"W	31/12/2021

D08	El Fuerte	Ejido 2 de Abril	25°54'23.0"N 108°56'50.8"W	31/12/2021
D09	El Fuerte	Ejido 2 de Abril	25°54'23.0"N 108°56'50.8"W	31/12/2021
D10	El Fuerte	Ejido 2 de Abril	25°54'23.0"N 108°56'50.8"W	31/12/2021
E01	El Fuerte	Km 19	25°55'14.0"N 108°50'45.6"W	07/01/2021
E02	El Fuerte	Km 19	25°55'14.0"N 108°50'45.6"W	07/01/2021
E03	El Fuerte	Km 19	25°55'14.0"N 108°50'45.6"W	07/01/2021
E04	El Fuerte	Km 19	25°55'14.0"N 108°50'45.6"W	07/01/2021
E05	El Fuerte	Santa Blanca	25°55'03.9"N 108°54'39.2"W	05/01/2021
E06	El Fuerte	Santa Blanca	25°55'03.9"N 108°54'39.2"W	05/01/2021
E07	El Fuerte	Santa Blanca	25°55'03.9"N 108°54'39.2"W	05/01/2021
E08	El Fuerte	Santa Blanca	25°55'03.9"N 108°54'39.2"W	05/01/2021
E09	El Fuerte	Santa Blanca	25°55'03.9"N 108°54'39.2"W	05/01/2021
E10	El Fuerte	La Genoveva	25°52'41.1"N 108°55'38.9"W	02/01/2021
F01	El Fuerte	La Genoveva	25°52'41.1"N 108°55'38.9"W	02/01/2021
F02	El Fuerte	La Genoveva	25°52'41.1"N 108°55'38.9"W	02/01/2021
F03	El Fuerte	Km 19	25°55'14.0"N 108°50'45.6"W	07/01/2021
F04	El Fuerte	Santa Blanca	25°55'03.9"N 108°54'39.2"W	05/01/2021

6.5 Obtención de hongos fitopatógenos

Se obtuvieron 3 aislados (P114, P115 y P19) de *Rhizoctonia solani* proporcionados por el Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), y 3 aislados de *Sclerotium rolfsii* (SrP16, SrP4 y SrP17) donados por M.C. Gabriel Herrera Rodríguez de la Junta Local de Sanidad Vegetal del Valle del Fuerte (JLSVF).

Los aislados de *Sclerotinia sclerotiorum* se obtuvieron por cuenta propia utilizando el método de muestreo de 5 de oros en 3 lotes de papa ubicados en el municipio de Ahome Sinaloa (**Cuadro 6**), durante el ciclo agrícola 2020-2021. Se colectaron los esclerocios presentes en el interior del tallo de las plantas de papa, las muestras se transportaron en bolsas de papel al laboratorio de Fitopatología de la UAdeDO.

Cuadro 6. Código de los aislados de *S. sclerotiorum*, ubicación y su fecha de recolección en el norte de Sinaloa

Aislado	Municipio	Localidad	Coordenadas	Fecha
Ss1	Ahome	La Genoveva	25°50'39.4"N 108°53'39.1"W	14/03/2021
Ss2	Ahome	La Genoveva	25°50'28.8"N 108°53'25.6"W	14/03/2021
Ss3	Ahome	La Genoveva	25°50'02.6"N 108°53'48.6"W	14/03/2021

Las muestras se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1 % por dos minutos bajo condiciones estériles, posteriormente los esclerocios obtenidos de cada lote se sumergieron en agua destilada estéril y se colocaron en papel absorbente estéril para eliminar el exceso de humedad. Cada esclerocio se colocó en cajas Petri con medio papa dextrosa agar (PDA; BD Bioxon®; **Anexo 3**), a una temperatura de 25 °C durante 5 días para la posterior preservación.

6.6 Preservación de hongos

Todos los aislados fúngicos se reactivaron en cajas Petri con medio PDA, cuatro días posteriores a la reactivación se transfirieron a tubos de ensayos con medio PDA (inclinado) y se incubaron por 3 días a 25 °C, después se les añadió aceite mineral estéril y conservaron a 4 °C (Humer, 1997).

6.7 Pruebas de antagonismo *in vitro*

Se realizó un escrutinio de la colección de bacterias para determinar el potencial antagonico contra los tres aislados diferentes de las tres especies de hongos fitopatógenos.

En cajas Petri con PDA, se colocó en el centro de la placa un disco de micelio del aislado fúngico con crecimiento activo de 6 días de edad y en cuatro puntos equidistantes se colocó una asada de cada aislado bacteriano. Como testigos se usaron cajas Petri con medio PDA con el aislado fúngico sin bacteria. El experimento se desarrolló a una temperatura de 25°C y finalizó cuando el crecimiento micelial del testigo llegó al borde de la caja.

Para confirmar el potencial antagónico de las bacterias, se realizaron nuevamente pruebas *in vitro*. Para estas pruebas se seleccionaron aquellos aislados que mostraron inhibición de crecimiento micelial de los patógenos en el experimento anterior. Cada cepa bacteriana se colocó en los cuatro puntos equidistantes de caja Petri con medio PDA y en el centro un disco de PDA con crecimiento activo del hongo. Se emplearon tres réplicas por tratamiento, en un arreglo completamente al azar. El experimento se realizó por duplicado, para todos los aislados fúngicos con incubación a 25 °C hasta el llenado de las cajas Petri de los testigos.

El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (PICM) se evaluó de acuerdo a los métodos de Kumar et al. (2011), $PICM = (R1-R2 / R1)$ multiplicado por 100, donde R1 es el crecimiento radial del patógeno sin presencia de la bacteria y R2 es el crecimiento radial del patógeno que interactúa con las bacterias.

6.8 Prueba de hemólisis

La prueba de hemólisis es un método utilizado para identificar y clasificar aquellos organismos que tienen la capacidad de secretar toxinas proteicas como alfa-hemolisina, una proteína presente durante la lisis de celular. Esta actúa sobre diversos tipos de células como glóbulos rojos, fibroblastos embrionarios y adultos, granulocitos, linfocitos y macrófagos (Bakás *et al.*, 2013).

Para esta prueba se utilizaron placas con medio agar sangre, las cuales se dividieron en ocho secciones iguales, y en cada sección se realizaron dos perforaciones de 5 mm de diámetro. Por otra parte, los aislados bacterianos se cultivaron a 25 °C en tubos de 15 ml con 5 ml de medio LB, sobre un agitador orbital (SCI-L330-Pro) a 220 RPM durante 24 h. Posteriormente se transfirió 1 ml de cada aislado bacteriano a tubos de 1.5 ml, se centrifugó a 13,000 RPM por 10 min. Una vez centrifugado se extrajeron 50 µl del sobrenadante, este se vertió por duplicado en las perforaciones.

Las cajas se incubaron por 20 h a 37 °C. Se utilizaron los criterios de pruebas de hemólisis reportados por Forbes et al. (2002):

- Hemólisis alfa (α -hemólisis) o hemólisis parcial, cuando se presentó un oscurecimiento verdoso en el medio de cultivo alrededor de las perforaciones conteniendo el sobrenadante.
- Hemólisis beta (β -hemólisis), o hemólisis total, cuando se observó un halo claro del medio de cultivo por el efecto de lisis total de los eritrocitos
- Hemólisis gama (γ -hemólisis), o no hemolítico, si el medio de cultivo no presentaba ningún tipo de aclaramiento.

Como control hemolítico positivo se utilizó la cepa β -hemolítica *Bacillus velezensis* Ruiz-García, proporcionada por el Laboratorio de Ecología de la rizosfera del Departamento de Biotecnología Agrícola del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional CIDIR-IPN Unidad Sinaloa del Instituto Politécnico Nacional. La prueba se realizó por duplicado.

6.9 Pruebas para la detección de posibles mecanismos de actividad antagónica

Para las pruebas de detección de posibles mecanismos de actividad antagónica y como resultado de las pruebas de antagonismo *in vitro*, se seleccionó aquel aislado bacteriano con potencial para inhibir los tres aislados de las tres especies de hongos fitopatógenos.

6.9.1 Producción de sideróforos

La producción de sideróforos se determinó de acuerdo con la metodología reportada por Schwyn y Neilands (1987) con pequeñas modificaciones. Los aislados bacterianos se reactivaron y crecieron en tubos de ensayo de 15 ml que contenían 5 ml de medio LB, los tubos se incubaron por 24 h a 25 °C con una agitación de 220 RPM. Posteriormente se transfirió 1 ml del aislado bacteriano a tubos de 1.5 ml y se centrifugó a 13,000 RPM por 10 min. Una vez centrifugado, se extrajeron 50 µl del sobrenadante y se colocaron en las perforaciones de 5 mm previamente realizadas a cajas Petri con medio CAS, estas se incubaron a 25 °C por una semana. Un halo de color amarillo-naranja indica positivo a la producción de sideróforos. Como control positivo se utilizó el aislado *Pseudomonas plecoglossicida* Nishimori, proporcionado por el Laboratorio de Ecología de la rizosfera del Departamento de Biotecnología Agrícola del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional CIDIR-IPN Unidad Sinaloa del Instituto Politécnico Nacional. La prueba se realizó por duplicado.

6.9.2 Antagonismo mediante compuestos orgánicos volátiles (COV) por el método de placa dividida.

La actividad antifúngica de compuestos orgánicos volátiles se analizó mediante una modificación de los métodos descritos por Fernando et al. (2005), en placa Petri dividida, en donde una mitad contenía PDA y el otro agar LB. Para este ensayo se reactivó el aislado bacteriano y se estrió en la división de la placa Petri con medio LB. En la división con PDA se colocó un disco de micelio en crecimiento activo de un cultivo de 6 días de edad, después se sellaron las cajas con Parafilm para asegurar en dado caso de la producción de compuestos volátiles, estos se conserven dentro de la caja. El crecimiento radial del micelio se evaluó al llenado de caja del testigo (cajas con hongo y sin bacteria), el porcentaje inhibición se estimó con la fórmula anteriormente descrita.

6.10 Pruebas para detección de posibles mecanismos de promoción de crecimiento vegetal

Con el propósito de identificar posibles mecanismos de promoción de crecimiento vegetal el aislado bacteriano se sometió a pruebas de solubilización de fosfatos y la producción de ácido indolacético (AIA).

6.10.1 Capacidad de solubilización de fosfatos

El aislado fue reactivado y puesto en crecimiento en tubos de ensayo de 15 ml con 5 ml de medio LB por 24 h a 25 °C con una agitación de 220 RPM. Posteriormente se transfirió 1 ml del aislado bacteriano a tubos de 1.5 ml y se centrifugó a 13,000 RPM por 10 min. Una vez centrifugado se extrajeron 50 µl del sobrenadante y se vertió en las perforaciones de 5 mm realizadas a cajas Petri con medio Agar Pikovskaya, se incubaron a 25 °C por 7 días. Según Pikovskaya (1948) la aparición de un halo claro en el medio de cultivo alrededor de la colonia, indica que la positividad de solubilizar fosfatos. Se utilizó la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula, (95N) como control positivo, proporcionada por el Laboratorio de Ecología de la rizosfera del Departamento de Biotecnología Agrícola del Centro

Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional CIDIR-IPN Unidad Sinaloa del instituto Politécnico Nacional. La prueba se realizó por duplicado.

6.10.2 Producción de ácido indolacético (AIA).

La capacidad para producir auxinas se evaluó por el reactivo Salkowski, el cual consiste en cloruro de hierro III (FeCl_3) disuelto en un ácido oxidante concentrado, este método se desarrolló originalmente para la determinación de indol (Salkowski 1885; Szkop *et al.*, 2012).

Primero se realizó una curva de calibración con la absorbancia registrada de 12 concentraciones de AIA (100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 12, 10, 5 y 0 $\mu\text{M}/\text{mL}$) en medio LB mezclado con reactivo Salkowski (20 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ por litro de H_2SO_4 7.9 M), incubadas a temperatura ambiente por 30 min. La densidad óptica (DO) de las distintas concentraciones se midió a 530 nm.

El aislado bacteriano se cultivó en caldo LB durante 24 h, después se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min. Se tomaron 100 μL del sobrenadante bacteriano y se mezclaron con 100 μL del reactivo Salkowski, se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente en ausencia de luz (Pilet y Chollet 1970) y se llevó a cabo una lectura de DO₅₃₀. El criterio de selección se realizó de manera visual al evaluar si los sobrenadantes bacterianos presentaban coloración rosada y se compararon las lecturas espectrofotométricas con las obtenidas en la curva de calibración.

6.11 Pruebas de antagonismo *in planta*

Se seleccionó el aislado bacteriano no hemolítico, que mostró actividad antagónica *in vitro* contra las tres cepas de los tres hongos fitopatógenos. Previo a la evaluación de este aislado en condiciones de invernadero, se llevó a cabo la estandarización para preparar tanto el inóculo fúngico como bacteriano a utilizar.

6.11.1 Estandarización de la metodología para la producción de inóculo bacteriano.

Para la producción de inóculo bacteriano se realizó una curva de crecimiento de la bacteria seleccionada con la finalidad de determinar la fase de crecimiento exponencial para utilizar células viables y en crecimiento constante. Para la reactivación del aislado, se sembró por estría en placas Petri con medio agar LB, se incubó por 24 h a una temperatura de 25°C. Se realizó la transferencia de una colonia bacteriana reactivada en medio agar LB, se incubó por 24 horas a 25 °C. Posteriormente en tubo de ensayo de 15 mL que contenían 5 mL de caldo LB, se le sembró una asada del aislado reactivado y se incubó a 25 °C, con agitación de 220 RPM por 18 horas. Enseguida se agregaron 4 mL de este cultivo a una botella de 1 L que contenía 200 mL de medio líquido LB y se incubó en un agitador orbital a 25 °C y 200 RPM. De este inóculo se tomaron lecturas de DO₅₉₅ cada dos horas hasta llegar a la fase estacionaria del cultivo. Durante el ensayo se estimaron las unidades formadoras de colonias (UFC/mL) con el método de diluciones seriadas por duplicado durante la fase exponencial.

6.11.2 Producción de inóculo fúngico

Para la producción de inóculo fúngico, se reactivaron los siguientes aislados: *S. sclerotiorum* (*Ss1*, *Ss2* y *Ss3*), *S. rolfisii* (*Sr1*, *Sr2* y *Sr3*) y *Rhizoctonia solani* (*Rs3*), en cajas Petri, de 90 x 15 mm, con medio PDA y se incubaron a 25°C. Posterior a la formación de esclerocios, se recolectaron 120 esclerocios por aislados de los diferentes hongos. Los esclerocios se desinfectaron en remojo en una solución de NaOCl al 1 % (p/v) durante 1 minuto, posteriormente se enjuagaron en ADE y se eliminó el exceso de humedad con papel absorbente estéril en condiciones de asépticas.

6.11.3 Bioensayo de antagonismo *in planta*

El experimento se llevó a cabo a nivel invernadero, se seleccionó el aislado que mostró efecto antagónico contra los tres aislados fúngicos evaluados en condiciones *in vitro*, se utilizaron tubérculos semilla de la variedad Fianna.

Se utilizó como sustrato una mezcla de tierra y arena (2:1), el cual se sometió a pasteurización a 100 ± 5 °C durante 5 h. Las macetas se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 3 %, se enjuagaron seis veces con ADE y se dejaron secar antes de la siembra. Antes de la siembra, los tubérculos semillas se colocaron en una solución de NaClO al 1 % (p/v) durante 3 minutos, luego se enjuagaron con ADE y se dejaron secar en papel absorbente estéril.

Se montó el experimento de acuerdo a la metodología reportada por Adams y Ayers (1979) con pequeñas modificaciones. A cada maceta se le agregaron 4 kg de suelo, se le colocó un tubérculo semilla a una profundidad de 15 cm y 10 esclerocios de los aislados fúngicos a una profundidad de 2.5 cm. En los tratamientos con bacteria, ésta se asperjó en el tubérculo y en la superficie del suelo a una concentración de 1.83×10^7 UFC/mL. Se regaron con agua de grifo según el requerimiento de la planta y se fertilizaron cada 7 días. Los tratamientos se distribuyeron en un arreglo completamente al azar; se utilizaron 6 repeticiones por tratamiento, el experimento se realizó dos veces.

Se emplearon los siguientes tratamientos: Control absoluto (CA; sin bacteria ni patógeno), plantas con bacteria (D02), plantas con bacteria y *S. sclerotiorum* aislado 1 (D02 + Ss1), plantas con bacteria y *S. sclerotiorum* aislado 2 (D02 + Ss2), plantas con bacteria y *S. sclerotiorum* aislado 3 (D02 + Ss3), plantas con bacteria y *S. rolfsii* aislado 1 (D02 + Sr1), plantas con bacteria y *S. rolfsii* aislado 2 (D02 + Sr2), plantas con bacteria y *S. rolfsii* aislado 3 (D02 + Sr3) y plantas con bacteria y *Rhizoctonia solani* aislado 3 (D02 + Rs3).

A los 53 días de la siembra se indujo humedad montando una cámara humedad, se colocó papel tipo periódico entre las macetas y las plantas se rociaron por las tardes (5:30 PM a 6:30 PM) con agua del grifo durante 3 minutos, posteriormente se cubrieron y sellaron con plástico negro, este último se retiraba en

la mañana (7:00AM a 7:30 AM). El experimento culminó a los 100 días posteriores a la siembra. Se registró el número de plantas germinadas, la incidencia y la severidad causada por los diferentes hongos fitopatógenos.

El porcentaje de incidencia de las enfermedades (PIE) se obtuvo dividiendo el número de plantas enfermas entre el número de plantas por tratamiento, el resultado fue multiplicado por 100.

En los tratamientos con los aislados de *S. sclerotiorum* se estimó la severidad con la escala propuesta por Dueck et al. (1993). Donde: y1 = sin lesión (con valor número 0); y2 = pequeñas lesiones en el tallo sin formación de anillos y esclerocio (con valor número 1,25); y3 = lesiones anilladoras del tallo sin formación de esclerocio (con valor de 2,5); y4 = lesiones anilladoras con un esclerocio maduro o inmaduro (con valor número 3,75); y5 = lesiones que rodean el tallo con más de un esclerocio maduro o inmaduro (con valor número 5). El índice de enfermedad (I.E.) fue calculado para cada maceta según la fórmula:

$$IE = \frac{[(1,25 \times y2) + (2,5 \times y3) + (3,75 \times y4) + (5 \times y5)]}{Total\ de\ plantas} \times \frac{1}{.05}$$

Los tratamientos con *S. rolfsii* se evaluaron con la escala de severidad de 0 a 4 empleada por Rubayet y Bhuiyan (2016), donde 0 = sin síntomas, 1 = 1-25 %, 2 = 26-50 %, 3 = 51-75 % y 4 = 76-100 % de estolón de papa cubierto con lesiones.

La evaluación de costra negra causada por *R. solani* se llevó a cabo con la escala de 0-5 propuesta por Bewer y Larkin (2005), de la siguiente manera: 0= esclerocios no visibles; 1= los esclerocios cubren 1 % de la piel superficial del tubérculo; 2= los esclerocios cubren 2-5 %; 3= los esclerocios cubren 5-10 %; 4= esclerocios cubren 10-15%; y 5= esclerocios cubren más del 15%.

6.12 Identificación molecular

Para la identificación molecular del aislado bacteriano y de los aislados de *S. sclerotiorum*, se partió de ADN genómico extraído por el método del Bromuro de Cetil Trimetil Amonio (CTAB; Doyle, 1990).

Se creció la bacteria en un tubo con capacidad de 2 mL que contenía 1 mL de medio LB líquido a una temperatura de 25 °C en un agitador orbital a 200 RPM durante 18 horas. Posteriormente, se centrifugó (Centrifuge 5415 R, eppendorf®) el medio líquido con bacteria (13,000 RPM por 20 min), se decantó el líquido y posteriormente quedó solo una pastilla.

Para los aislados fúngicos (Ss1, Ss2 y Ss3), se realizó un raspado micelial (50 – 100 mg) de una colonia fúngica de 7 días de crecimiento en PDA.

En la extracción de ADN, se agregaron 500 µL de buffer de CTAB al 2 % a cada muestra y se maceró con pistilo. Las muestras se incubaron a 65 °C por 10 min y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Se añadieron 150 µL de cloroformo y se agitó mecánicamente por 3 min. Después se centrifugó por 10 min a 13,000 RPM, se recuperó el sobrenadante (450 µL aproximadamente) en un tubo nuevo y se les añadieron 225 µL de etanol absoluto (0.5 V por sobrenadante recuperado), se agitó vigorosamente, se centrifugaron por 10 min a 13,000 RPM, y se decantó. Se realizó un lavado con 300 µL de etanol al 75 %, se centrifugó 5 min a 10,000 RPM y se decantó nuevamente. Las muestras se secaron colocando el tubo boca abajo en papel absorbente, en condiciones asépticas. Posteriormente se resuspendió en 50 µL de agua ultra pura, Se estimó la concentración de ADN con NanoDrop™ One/OneC en el laboratorio de la Junta Local de Sanidad del Valle del Fuerte, las muestras se almacenaron a -20°C.

EL ADN se utilizó como templado para amplificar un fragmento de ~1400 pb del gen 16S rADN por PCR, con los iniciadores F2C/C (5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC-3' / 5'- ACG GGC GGT GTG TAC-3'; Shi *et al.*, 1997) para el caso de la bacteria. Para los aislados fúngicos, se utilizaron los oligonucleótidos ITS4/ ITS5 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' / 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'; White *et al.*, 1990), que amplifican la región ITS (~ 600 pb). La mezcla de reacción de PCR

con 1 μL ADN (de una dilución 1:10), 3 μL de buffer 10X, 1 μL (50 mM) de MgCl_2 , 1.0 μL (10 μM) de cada primer, 1.0 μL (10 nM) de dNTP mix, 0.1 μL (0.5 U) de ADN polimerasa (Invitrogen, USA) y agua libre de nucleasas para un volumen final de 30 μL . La reacción se efectuó en un termociclador C1000 Thermal Touch de Bio-Rad, el cual se configuró con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 95 °C durante 5 min, seguido por 30 ciclos a 95 °C durante 40 s, 60 °C por 40 s y 72 °C por 1.30 min, una extensión final a 72 °C durante 5 min.

Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.0 % (p/v) en un foto-documentador (Universal Hood II). Estos se enviaron a Macrogen (Corea del Sur) para la purificación y secuenciación.

En ambos casos, tanto para las secuencias obtenidas para los aislados de Ss1, Ss2 y Ss3 como para D02, estas se editaron en BioEdit versión 7.0.5.3. (Hall 1999) y compararon en la base de datos GenBank de NCBI, con el software BLAST y el algoritmo Mega BLAST-N. Los alineamientos múltiples y las reconstrucciones filogenéticas se realizaron en MEGA 11 (Tamura *et al.*, 2021), se utilizó MUSCLE (Edgar 2004) para el alineamiento.

La secuencia de D02 se comparó con secuencias del gen 16S del ADN ribosomal de especies de la sección putida de *Pseudomonas*, de acuerdo a lo reportado por Gomila et al. (2015). Se utilizó la secuencia de *Cellvibrio japonicus* Ueda107 como grupo externo. La reconstrucción filogenética se realizó conforme al método de Máxima Verosimilitud y el modelo de 3 parámetros de Tamura (Tamura 1992), con distribución Gamma discreta para modelar las diferencias de tasas evolutivas entre sitios (4 categorías [+G, parámetro = 0.7039]), con sitios invariables ([+I]; 70.44). El análisis involucró 28 secuencias nucleotídicas. Hubo un total de 1009 posiciones en el conjunto final de datos.

Las secuencias de Ss1, Ss2 y Ss3 se compararon con secuencias reportadas para la región ITS de especie de *Sclerotinia*, se utilizó la secuencia de *Magnaporthe oryzae* Ar2 (KJ850437) como grupo externo. El alineamiento se sometió a una prueba de ajuste de modelo de sustitución nucleotídica de acuerdo al *Akaike Information Criteria* (AIC). El análisis filogenético se realizó conforme al

método de Máxima Verosimilitud y el modelo de 2 parámetros de Kimura (Kimura 1980), se utilizó una distribución Gamma discreta para modelar las diferencias de tasas evolutivas entre sitios (4 categorías (+G, parámetro = 1,7470)). Este análisis involucró 19 secuencias de nucleótidos. Hubo un total de 794 posiciones en el conjunto final de datos.

El soporte de las topologías se evaluó mediante 1000 réplicas bootstrap. Ambos filogramas se editaron en FigTree 1.4.0 (Rambaut, 2012).

6.13 Análisis estadístico

Todos los datos obtenidos se sometieron a pruebas de normalidad Kolmogórov-Smirnov. Los datos de los experimentos de antagonismo por confrontación dual y por compuestos volátiles, se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) con un valor α de 0.05 en el paquete estadístico SAS (versión 9.4). A excepción del ensayo de antagonismo por confrontación en *S. rolfsii*, el cual se analizó mediante Kruskal-Wallis ($\alpha=0.05$).

Para los experimentos *in planta*, los porcentajes de severidad e incidencia obtenidos en con los aislados de *S. sclerotiorum* y *R. solani* se analizaron mediante el análisis estadístico no paramétrico Kruskal-Wallis, con un valor α de 0.05, éstos mostraron diferencias significativas entre tratamientos, así que se empleó la prueba de Conover en el paquete estadístico InfoStat (versión 2008).

7. RESULTADOS

7.1 Generación de una colección de 54 aislados bacterianos de la rizosfera de papa

Se obtuvo una colección microorganismos de la rizosfera de papa en 5 lotes de Ahome y 7 de El Fuerte (**Cuadro 5**). La colección está formada por 54 aislados preservados a -20 °C en medio LB con glicerol al 20 %, en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Autónoma de Occidente UR Los Mochis.

7.2 Escrutinio de aislados con antagonismo *in vitro* y conformación de una sub-colección γ -hemolítica con potencial antagónico contra *Sclerotinia sclerotiorum*

Se realizó un escrutinio en donde se evaluaron los 54 aislados bacterianos contra tres cepas de *S. sclerotiorum*. Los porcentajes de inhibición *in vitro* presentaron un rango de 0 a 55.9 % (**Cuadro 7**). Solamente tres aislados (D02, D03 y D04) obtuvieron un porcentaje cercano o superior al 30% contra los aislados de *S. sclerotiorum*. Estos aislados se sometieron a pruebas de hemólisis, donde solo el aislado D02 mostró características no hemolíticas (γ), los aislados D03 y D04 presentaron hemólisis total (β).

Cuadro 7. Inhibición *in vitro* del crecimiento micelial de tres cepas de *Sclerotinia sclerotiorum* con aislados bacterianos de la rizosfera del cultivo de papa, colectados en los Municipios de Ahome y El Fuerte, Sinaloa, México.

Aislado	% Inhibición			Hemólisis	Aislado	% Inhibición			Hemólisis
	Ss1	Ss2	Ss3			Ss1	Ss2	Ss3	
A01	4.53	0.79	2.23		C08	6.16	1.07	21.28	
A02	0	1.13	2.61		C09	8.73	1.07	17.35	
A03	2.27	0.87	7.15		C10	6.14	0.43	15.27	
A04	0	0.55	3.4		D01	14.45	2.1	7.05	
A05	0	0.98	8.46		D02	31.2	9.61	33.32	γ
A06	0	1.24	5.98		D03	29.04	29.66	34.6	β
A07	0	0	22.85		D04	11.84	55.94	36.34	β
A08	0	0.23	3.9		D05	0	7.33	22.99	
A09	0	0	11.65		D06	0	12.36	7.38	
A10	0	0.55	9.27		D07	3.89	0	15.4	
B01	0	0.59	15.83		D08	3.21	0	11.45	
B02	0	0.81	11.73		D09	5.12	0.53	21.97	
B03	0.37	0.85	0		D10	10.56	0.7	16.74	
B04	4.67	1.07	3.95		E01	1.67	3.49	15.01	
B05	0.37	0.62	10.97		E02	3.64	1.69	14.56	
B06	0.62	0.36	0.96		E03	1.88	6.56	11.17	
B07	0	1.58	27.87		E04	0	1.15	8.57	
B08	8.25	0.27	42.56		E05	33.92	3.86	2.5	
B09	12.67	1.17	6.28		E06	36	0.51	1.4	
B10	0	0.38	18.33		E07	34.44	1.02	2.33	
C01	1.62	0.85	4.04		E08	25.7	0.23	1.92	
C02	18.35	0.87	22.72		E09	53.66	0	16.67	
C03	20.83	8.62	21.89		E10	40.65	0.46	21.54	
C04	3.95	0	20.42		F01	46.45	0.94	12.19	
C05	3.8	1.37	22.13		F02	32.33	0.27	9.74	
C06	0.97	0	21.63		F03	25.26	0.91	13.4	
C07	3.01	1.13	29.52		F04	19.26	3.41	16.77	

7.3 Escrutinio de aislados con antagonismo *in vitro* y conformación de una sub-colección γ -hemolítica con potencial antagónico contra *Sclerotium rolfsii*

Se realizó un escrutinio en donde se evaluaron los 54 aislados de bacterias contra tres cepas de *S. rolfsii*, los porcentajes de inhibición *in vitro* presentaron un rango de 0 a 69 % (**Cuadro 8**). Solo nueve aislados (A04, A09, B02, B03, B07, C02, C03, C10 y D02) obtuvieron un porcentaje cercano o superior al 30 % en los aislados de *S. rolfsii*. Estos aislados fueron sometidos a pruebas de hemólisis, donde los aislados A04, B02 y D02 mostraron características no hemolíticas (γ), mientras que A09, B03, B07, C02, C03 y C10 presentaron hemólisis total (β).

Cuadro 8. Inhibición *in vitro* del crecimiento micelial de tres cepas de *Sclerotium rolfsii* con aislados bacterianos de la rizosfera del cultivo de papa, colectados en los Municipios de Ahome y El Fuerte, Sinaloa, México.

Aislado	% Inhibición			Hemólisis	Aislado	% Inhibición			Hemólisis
	Sr1	Sr2	Sr3			Sr1	Sr2	Sr3	
A01	20.61	20.38	25.41		C08	7.64	16.72	6.82	
A02	37.38	20.09	26.00		C09	4.87	40.92	13.83	
A03	31.36	26.61	26.06		C10	40.77	39.61	52.58	β
A04	33.50	39.59	23.54	γ	D01	14.77	25.81	31.93	
A05	30.56	15.21	9.70		D02	48.77	50.12	50.72	γ
A06	35.50	13.77	12.79		D03	23.60	12.19	47.27	
A07	32.03	11.77	17.24		D04	20.04	24.67	41.60	
A08	37.48	17.42	12.22		D05	24.11	14.74	45.51	
A09	39.74	45.65	69.09	β	D06	4.97	42.27	29.97	
A10	45.44	25.15	60.24		D07	6.58	21.02	13.99	
B01	27.46	29.37	23.65		D08	8.00	18.46	16.60	
B02	43.24	46.87	52.21	γ	D09	8.55	20.52	16.65	
B03	50.75	37.33	34.34	β	D10	2.70	18.76	10.96	
B04	35.20	14.75	13.88		E01	3.23	14.94	6.87	
B05	36.05	22.06	6.77		E02	3.03	35.49	38.25	
B06	35.51	17.42	11.99		E03	1.96	12.62	14.09	
B07	47.59	38.46	27.10	β	E04	5.16	13.11	7.36	
B08	39.70	21.96	14.06		E05	27.94	36.04	31.28	
B09	29.85	12.34	1.67		E06	3.50	6.56	16.30	
B10	35.76	21.35	3.35		E07	4.56	7.78	12.67	
C01	10.18	23.94	23.19		E08	7.77	14.75	19.01	
C02	34.95	41.50	43.61	β	E09	9.63	17.41	4.64	
C03	41.85	44.52	42.70	β	E10	6.72	0.00	5.88	
C04	19.84	32.51	28.91		F01	7.83	10.58	10.80	
C05	4.20	13.14	1.20		F02	8.35	13.28	6.12	
C06	5.77	13.34	5.98		F03	3.99	6.48	22.32	
C07	9.73	31.35	9.73		F04	28.73	12.12	40.21	

7.4 Detección de aislados con antagonismo *in vitro* y conformación de una sub-colección γ -hemolítica con potencial antagónico contra *Rhizoctonia solani*

Se realizó un escrutinio en donde se evaluaron los 54 aislados de bacterias contra tres cepas de *R. solani*, los porcentajes de inhibición *in vitro* presentaron un rango de 0 a 69 % (**Cuadro 9**). Solo 3 aislados (C02, D02 y D03) obtuvieron un porcentaje cercano o superior las tres cepas de *S. rolfsii*. Estos aislados se sometieron a

pruebas de hemólisis, donde el aislado D02 mostró características no hemolíticas (γ), el resto presentaron hemólisis total (β). El objetivo de los ensayos de escrutinio fue evaluar aquellas cepas bacterianas no hemolíticas que ejercen antagonismo contra tres aislados de cada uno de los hongos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani*. Solo uno de los 54 aislados de la colección bacteriana (D02), presentó características no hemolíticas y actividad antagónica contra los aislados fúngicos. Por esta razón, se seleccionó a dicho aislado para las siguientes evaluaciones.

Cuadro 9. Inhibición *in vitro* del crecimiento micelial de tres cepas de *Rhizoctonia solani* con aislados bacterianos de la rizosfera del cultivo de papa, colectados en los Municipios de Ahome y El Fuerte, Sinaloa, México.

Aislado	% Inhibición			Hemólisis	Aislado	% Inhibición			Hemólisis
	Rs1	Rs2	Rs3			Rs1	Rs2	Rs3	
A01	14.38	21.08	22.52		C08	1.26	0.21	0.00	
A02	5.75	8.25	28.27		C09	3.14	0.00	0.23	
A03	2.03	7.33	0.54		C10	12.42	21.59	0.00	
A04	2.09	2.08	1.31		D01	1.92	4.69	0.00	
A05	0.00	0.00	0.00		D02	43.54	53.96	37.51	γ
A06	0.00	0.09	0.00		D03	29.92	31.61	38.14	β
A07	0.00	0.07	0.10		D04	0.00	4.54	0.14	
A08	0.00	0.00	0.00		D05	2.86	0.27	0.00	
A09	20.66	25.19	33.91		D06	1.37	0.00	0.12	
A10	4.36	0.00	1.89		D07	2.36	0.00	0.19	
B01	4.07	0.00	0.06		D08	2.46	0.00	3.48	
B02	2.28	0.00	0.05		D09	2.81	0.00	2.63	
B03	3.96	0.68	0.00		D10	1.89	4.41	0.67	
B04	2.19	1.09	0.00		E01	2.48	0.00	2.05	
B05	2.54	1.53	0.32		E02	2.10	16.26	1.24	
B06	0.00	0.91	0.00		E03	1.49	0.65	0.39	
B07	0.70	0.00	1.74		E04	1.62	0.52	0.00	
B08	4.01	0.00	1.62		E05	2.73	0.68	0.04	
B09	3.71	0.00	1.85		E06	1.76	1.55	0.02	
B10	5.64	0.00	0.25		E07	3.02	0.00	0.00	
C01	5.70	1.48	0.00		E08	3.00	0.00	1.29	
C02	44.35	40.89	34.45	β	E09	3.09	0.97	0.00	
C03	42.19	4.34	3.11		E10	1.33	1.10	1.00	
C04	2.44	1.32	0.60		F01	4.66	0.00	0.00	
C05	0.00	0.25	0.91		F02	1.26	0.37	0.00	
C06	0.61	0.09	0.17		F03	0.00	1.12	0.00	
C07	1.03	0.00	0.00		F04	0.88	0.50	0.00	

7.5 Bioensayo de antagonismo *in vitro*

En el escrutinio para la selección de antagonistas, se observó que únicamente el aislado D02 mostró antagonismo *in vitro* contra los aislados de *S. sclerotiorum* (Ss1, Ss2 y Ss3), *S. rolfsii* (Sr1, Sr2 y Sr3) y *R. solani* (Rs1, Rs2 y Rs3). Por lo que se realizaron nuevamente ensayos de confrontación *in vitro* solo con el aislado D02. El aislado bacteriano inhibió 55.8, 50.2 y 55.3 % del crecimiento micelial de los aislados Ss1, Ss2 y Ss3 de *S. sclerotiorum*, respectivamente (**Cuadro 10; Figura 5**).

Cuadro 10. Diámetro micelial de colonias de tres aislados de *S. sclerotiorum* en pruebas de antagonismo por confrontación con el aislado D02.

Aislado	Diámetro de crecimiento (mm)			Inhibición (%)		
	Ss1	Ss2	Ss3	Ss1	Ss2	Ss3
D02	12.77	14.55	10.38	55.85 ±18.63 a	50.29 ±16.56 a	55.31 ±3.24 a
Control	22.18	23.93	23.14	-	-	-

Los tratamientos agrupados con la misma letra no difieren estadísticamente (ANOVA, Tukey, P> 0.05), n = 6.

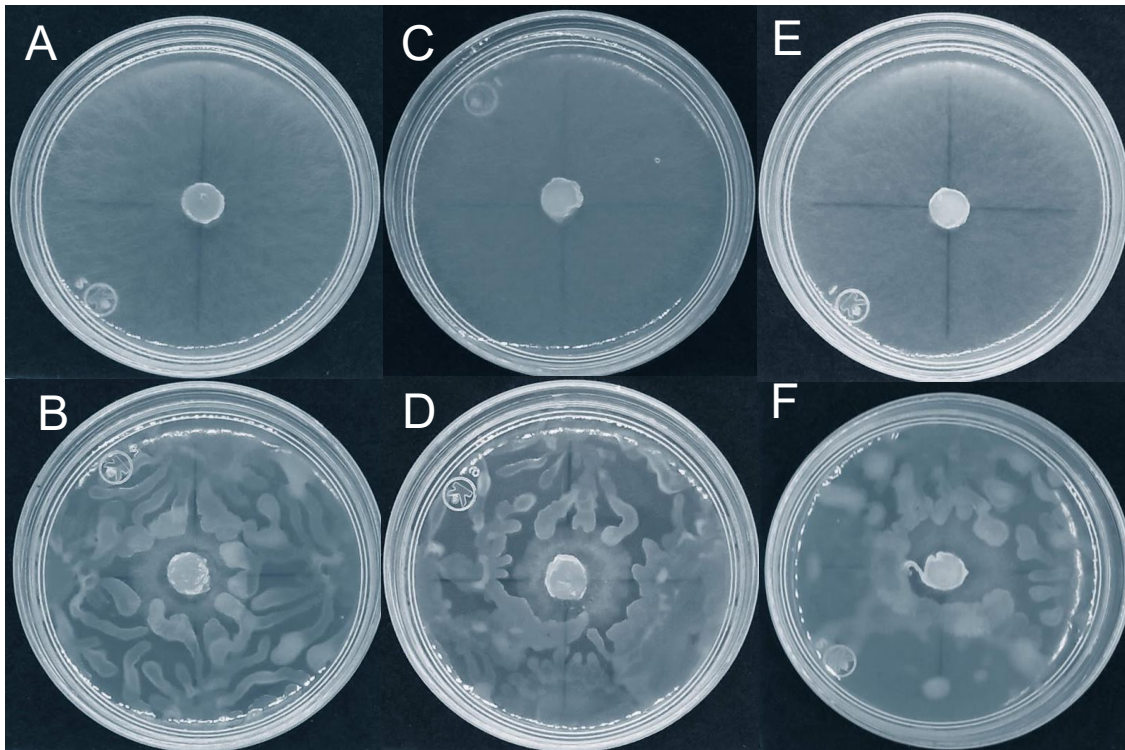


Figura 5. Antagonismo por confrontación *in vitro* contra aislados de *Sclerotinia sclerotiorum*. A) Ss1 B) Ss1 + D02, C) Ss2, D) Ss2 + D02, E) Ss3, F) Ss3 + D02.

Los ensayos de antagonismo con los aislados de *S. rolfsii* (*Sr1*, *Sr2* y *Sr3*) mostraron porcentajes de inhibición del 21.9, 24.9 y 28.5 %, respectivamente (**Cuadro 11**, **Figura 6**).

Cuadro 11. Diámetros miceliales en cada tratamiento de la prueba de antagonismo por confrontación y su respectiva inhibición en los aislados de *S. rolfsii*.

Aislado	Diámetro de crecimiento (mm)			Inhibición (%)		
	<i>Sr1</i>	<i>Sr2</i>	<i>Sr3</i>	<i>Sr1</i>	<i>Sr2</i>	<i>Sr3</i>
D02	27.93	24.99	28.51	21.93 (4.41*) a	24.99 (54.66*) a	28.51(28.93*) a
Control	22.39	22.61	23.28	-	-	-

Comparación de medianas entre tratamientos *Sr1*, *Sr2* y *Sr3*. Letras diferentes indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis, $X^2= 0.57$, $p=0.7508$). Rango intercuartílico, $n = 6$.

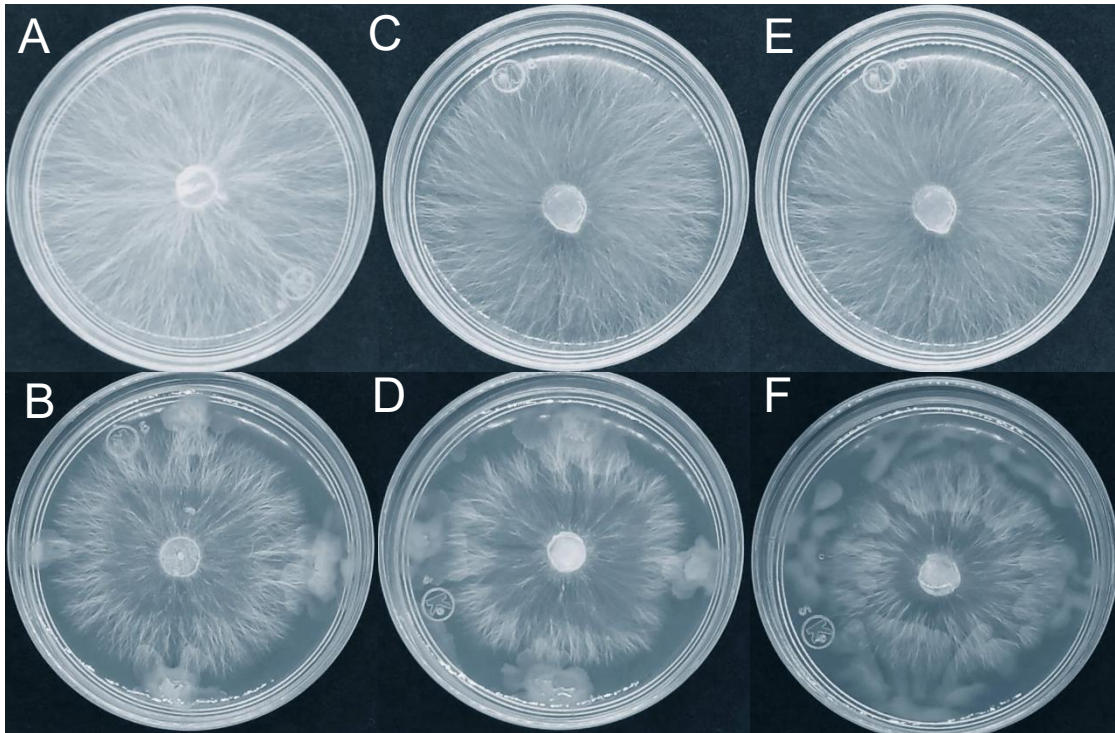


Figura 6. Antagonismo por confrontación *in vitro* contra aislados de *Sclerotium rolfsii*. A) Sr1 B) Sr1 + D02, C) Sr2, D) Sr 2 + D02, E) Sr3, F) Sr 3 + D02.

Los aislados de *R. solani*, presentaron 44.3 % de inhibición contra *Rs1*, 54.49 % para *Rs2* y 46.98 para *Rs3* (**Cuadro 12, Figura 7**).

Cuadro 12. Diámetro micelial de colonias de tres aislados de *R. solani* en pruebas de antagonismo por confrontación con el aislado D02.

Aislado	Diámetro de crecimiento (mm)			Inhibición (%)		
	<i>Rs1</i>	<i>Rs2</i>	<i>Rs3</i>	<i>Rs1</i>	<i>Rs2</i>	<i>Rs3</i>
D02	44.32	54.49	46.98	44.32 ±12.57 a	4.49 ±13.85 a	46.98 ± 13.34 a
Control	22.51	23.71	22.41	-	-	-

Los tratamientos agrupados con la misma letra no difieren estadísticamente (ANOVA, Tukey, P> 0.05), n = 6.

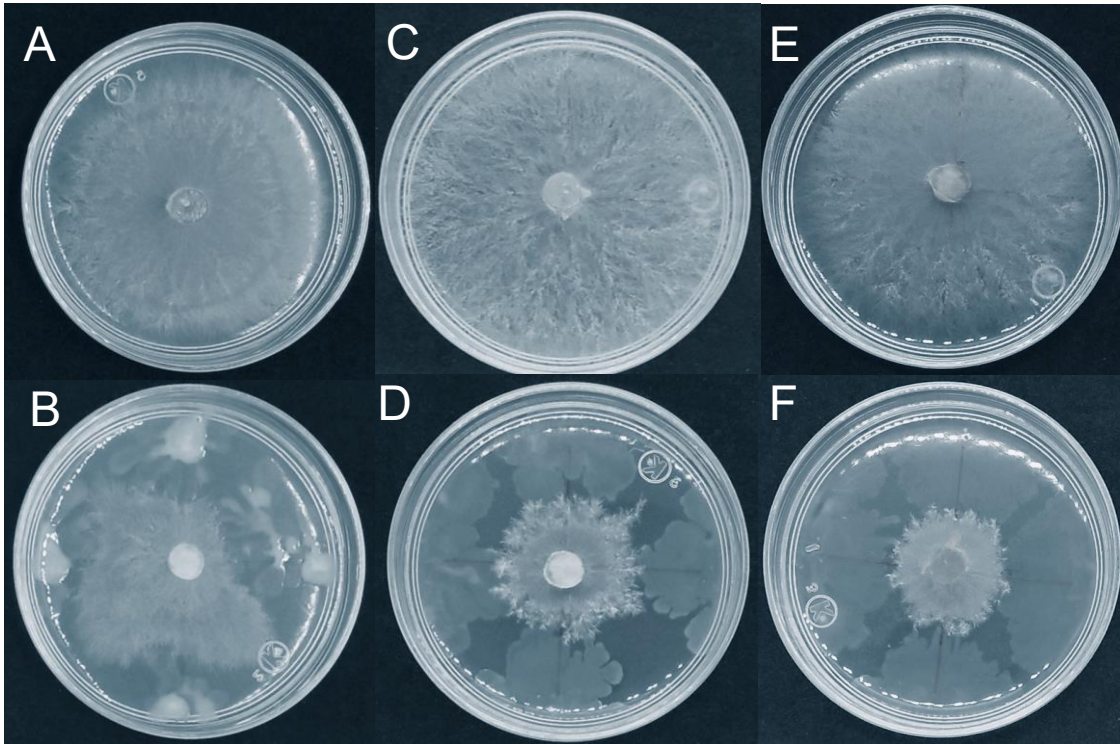


Figura 7. Pruebas de antagonismo por confrontación *in vitro* contra aislados de *Rhizoctonia solani*. A) Sr1 B) Rs1 + D02, C) Rs 2, D) Rs2 + D02, E) Rs3, F) Rs3 + D02.

7.6 Bioensayo de antagonismo *in planta*

El bioensayo de antagonismo del aislado bacteriano D02 contra los aislados de *S. sclerotiorum* (*Ss1*, *Ss2* y *Ss3*), *S. rolfsii* (*Sr1*, *Sr2* y *Sr3*) y el aislado *Rs3* de *R. solani* *in planta* se realizó en condiciones de invernadero.

7.6.1 Producción de inóculo bacteriano para pruebas *in planta*

Con el objetivo de incrementar los niveles de inóculo del aislado bacteriano D02 con potencial antagonico contra los aislados de *S. sclerotiorum*, *S. rolfsii* y *R. solani* para pruebas *in planta* bajo condiciones de invernadero, se estandarizó una técnica de monitoreo con el fin de obtener una curva de crecimiento para identificar la fase exponencial del aislado D02 y determinar concentración de unidades formadores de colonias.

La fase exponencial del asilado D02 mostró un rango de 2 h a las 8-10 h. La concentración obtenida a las 10 h fue de 1.83×10^7 UFC/mL (**Figura 8**).

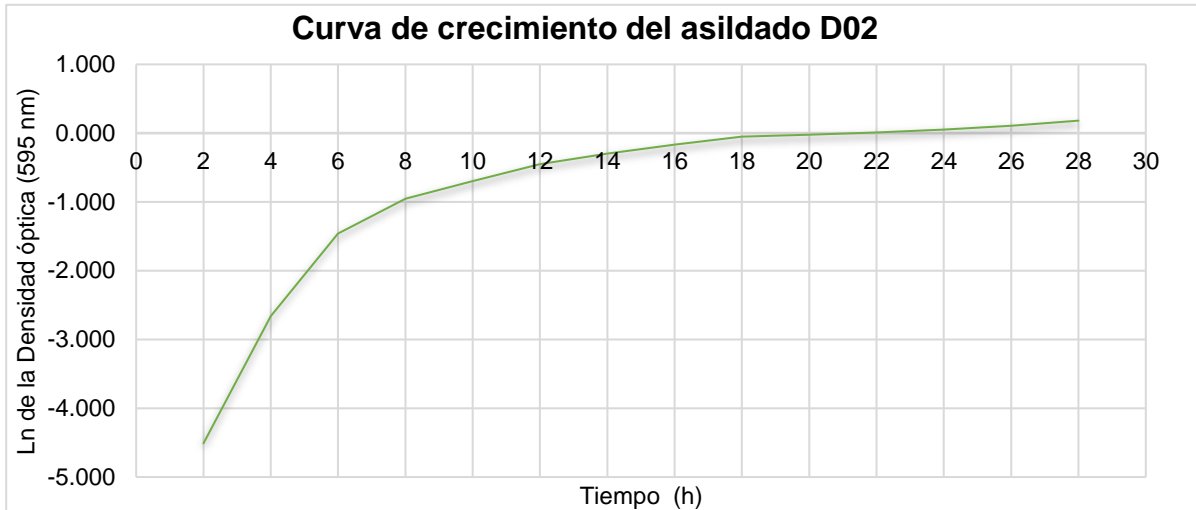


Figura 8. Curva de crecimiento del aislado D02

7.6.2 Bioensayo de antagonismo *in planta* de aislado bacteriano D02 contra *S. sclerotiorum*, *S. rolfsii* y *R. solani*

A los 85 días posteriores a la siembra, la parte aérea de cada planta por maceta se cortó al nivel de la base del tallo. Después de 15 días del corte de follaje, se realizó la cosecha y la evaluación de incidencia y severidad de las enfermedades causadas por los hongos en los tubérculos. El experimento culminó a los 100 días; durante este periodo se observaron síntomas y signos de los patógenos en los tratamientos con *S. sclerotiorum* (**Figura 9**) y *R. solani* (**Figura 10**), sin embargo, éstos no se observaron en los tratamientos con *S. rolfsii*.

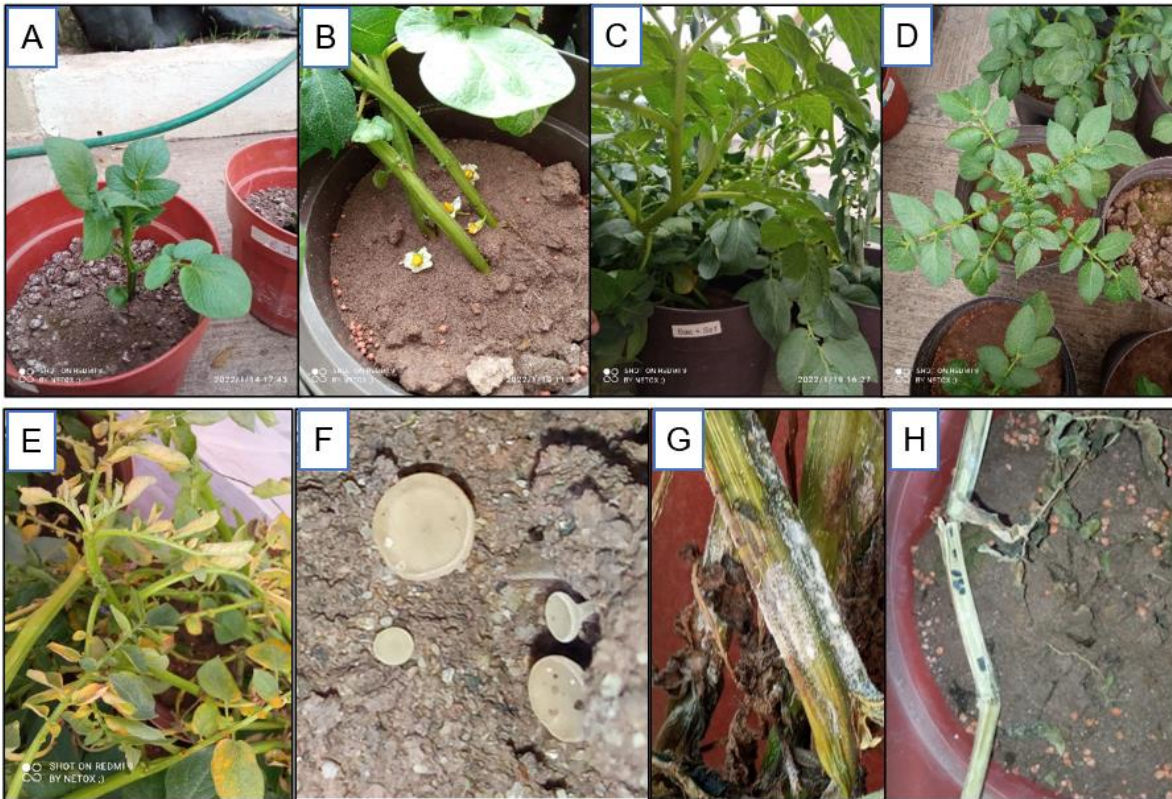


Figura 9. Experimento de antagonismo del aislado D02 contra *S. sclerotiorum* in planta bajo condiciones de invernadero. A) Plántula de papa (Ss1 + D02), B) Senescencia de la flor, C) Planta de papa en etapa de desarrollo de tubérculos (Ss2+ D02), D) Follaje en testigo absoluto, E) Síntomas de amarillamientos en follaje (Ss1), F) Germinación de apotecios (Ss1), G) Micelio en tallo (Ss3), H) Formación de esclerocios en tallo (Ss1).

Al final de los experimentos, los porcentajes de incidencia en las plantas con los tratamientos que contenían sólo los diferentes aislados de *S. sclerotiorum* fue de 37.5, 50 y 58.3 para los aislados Ss3, Ss2 y Ss1. Pero, esta se redujo de manera significativa por presencia del aislado bacteriano D02, donde se observó 0 % de incidencia en los tratamientos Ss1 + D02 y Ss2 + D02, y 6.25 % en el tratamiento Ss3 + D02. Se observó 0 % de incidencia en el tratamiento con solo bacteria y control absoluto esta fue similar a la observada en los tratamientos con patógeno más bacteria (Ss1 + D02, Ss2 y Ss3 + D02) (**Cuadro 13**).

Por otra parte, los tratamientos Ss1, Ss2 y Ss3 mostraron una severidad de 29.1, 33.3 y 25 %, respectivamente. Estos difieren estadísticamente del resto de los tratamientos (Ss1 + D02, Ss2 + D02 y Ss3 + D02, D02 y control absoluto), donde se observa que la severidad es del 0 % (**Cuadro 13**).

Cuadro 13. Efecto del aislado D02 contra *S. sclerotiorum* en plantas de papa

Tratamiento	Incidencia (%)	Severidad (%)
Ss1	58.35 (25*) c	29.17 (25*) b
Ss1 + D02	0 (0*) a	0 (0*) (0*) a
Ss2	50 (41.67*) c	33.33 (25*) a
Ss2 + D02	0 (0*) a	0 (0*) a
Ss3	37.50 (43.75*) bc	25 (30.75*) b
Ss3 + D02	6.2 (25*) ab	0 (6.25*) a
D02	0 (0*) a	0 (0*) a
Control absoluto	0 (0*) a	0 (0*) a

Comparación de medianas entre tratamientos. Letras diferentes indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis, incidencia, $X^2= 35.38$, $p=0.0001$), (Kruskal-Wallis, severidad, $X^2= 40.66$, $p=0.0001$). Rango intercuartílico = *, n = 8.

El porcentaje de incidencia de la costra negra en tubérculo en el tratamiento con el aislado *Rs3* fue de un 94.38 %. Por otro lado, el tratamiento con la bacteria (*Rs3* +D02), redujo significativamente la incidencia a 33.33 % (**Figura 10**), misma que es estadísticamente similar al tratamiento con solo bacteria (D02) y al control absoluto. Sin embargo, en las evaluaciones de severidad, el tratamiento *Rs3* mostró un porcentaje del 20 % y el tratamiento *Rs3* + D02 de 10 %, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre estos (**Cuadro 14**).

Cuadro 14. Efecto del aislado D02 contra *R. solani* en plantas de papa.

Tratamiento	Incidencia (%)	Severidad (%)
<i>Rs3</i>	94.38 (20*) b	20 (60*) b
<i>Rs3</i> + D02	33.33 (50*) a	10 (20*) b
D02	0 (0*) a	0(0*) a
Control absoluto	0 (0*) a	0 (0*) a

Comparación de medianas entre tratamientos. Letras diferentes indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis, incidencia, $X^2= 18.34$, $p=0.0001$), (Kruskal-Wallis, severidad, $X^2= 10.06$, $p=0.0018$). Rango intercuartil = *, n = 8.



Figura 10. Tubérculo cosechado. A) Tubérculos con presencia de costra negra (*Rs3*). B) Tubérculo sano (*Rs3* +Bac)

Para cumplir con los postulados Koch, se colectó una muestra de tejidos dañados y esclerocios formados en las plantas, posteriormente se realizó nuevamente el re-aislamiento de los patógenos. Para los tratamientos con *S. sclerotiorum* y *R. solani* se obtuvieron nuevamente los aislados durante el proceso de aislamiento y purificación. En los tratamientos con *S. rolfsii* no se observó la formación de esclerocios, se recolectó tejido de la planta (tubérculo y tallo) para el aislamiento, sin embargo, las características morfológicas del hongo aislado no eran propias del patógeno, por lo que los tratamientos con *S. rolfsii* no cumplieron con dichos postulados.

7.7 Mecanismos de antagonismo y promoción de crecimiento vegetal

7.7.1 Producción de sideróforos

El aislado D02 se sometió a la prueba de producción de sideróforos en medio CAS. La característica principal de una prueba positiva es la formación de un halo de color amarillo-naranja alrededor del pozo donde se colocó una suspensión de la bacteria con un periodo de incubación de una semana. Se empleó el aislado *Pseudomonas plecoglossicida* (67) como control positivo, mostrando dicha característica en la prueba. El aislado D02 fue positivo a la producción de

sideróforos mostrando este cambio en el medio a las 24 horas de que inicio la prueba (**Figura 11**).

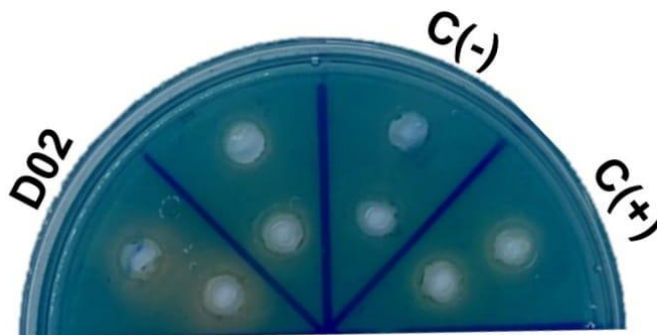


Figura 11. Prueba de producción de sideróforos en agar CAS. El asilado D02 presentó halos indicativos de esta capacidad. La bacteria *Pseudomonas plecoglossicida* (67) como control positivo C (+), donde se observa un halo color naranja. C (-) indica el control absoluto.

7.7.2 Inhibición por compuestos orgánicos volátiles en placa dividida

Se evaluó la actividad antifúngica mediada por la producción de compuestos orgánicos volátiles del aislado bacteriano D02 contra los aislados de *S. sclerotiorum* (Ss1, Ss2 y Ss3; **Figura 12**), *S. rolfsii* (Sr1, Sr2 y Sr3; **Figura 13**) y *R. solani* (Rs1, Rs2 y Rs3; **Figura 14**), por el método de caja dividida.

Se observaron porcentajes de inhibición de los aislados fúngicos Ss1, Ss2 y Ss3 del 61.51, 51.49 y 60.3 %, respectivamente. Los porcentajes de inhibición del aislado bacteriano D02 ante los aislados fúngicos de *S. sclerotiorum* no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos (**Cuadro 15**).

Los porcentajes de inhibición de los aislados Sr1, Sr2 y Sr3 de *S. rolfsii* fueron de 80.13, 74.88 y 75.46 %. Los porcentajes de inhibición no mostraron diferencias significativas entre sí (**Cuadro 15**).

En el ensayo contra *R. solani*, el aislado bacteriano D02 mostró porcentajes de inhibición de 53.21, 38.32 y 42.41 % sobre los aislados Rs1, Rs2 y Rs3, los porcentajes de inhibición del aislado bacteriano D02 no presentaron diferencias estadísticas significativas entre los aislados fúngicos de *R. solani* (**Cuadro 15**.)

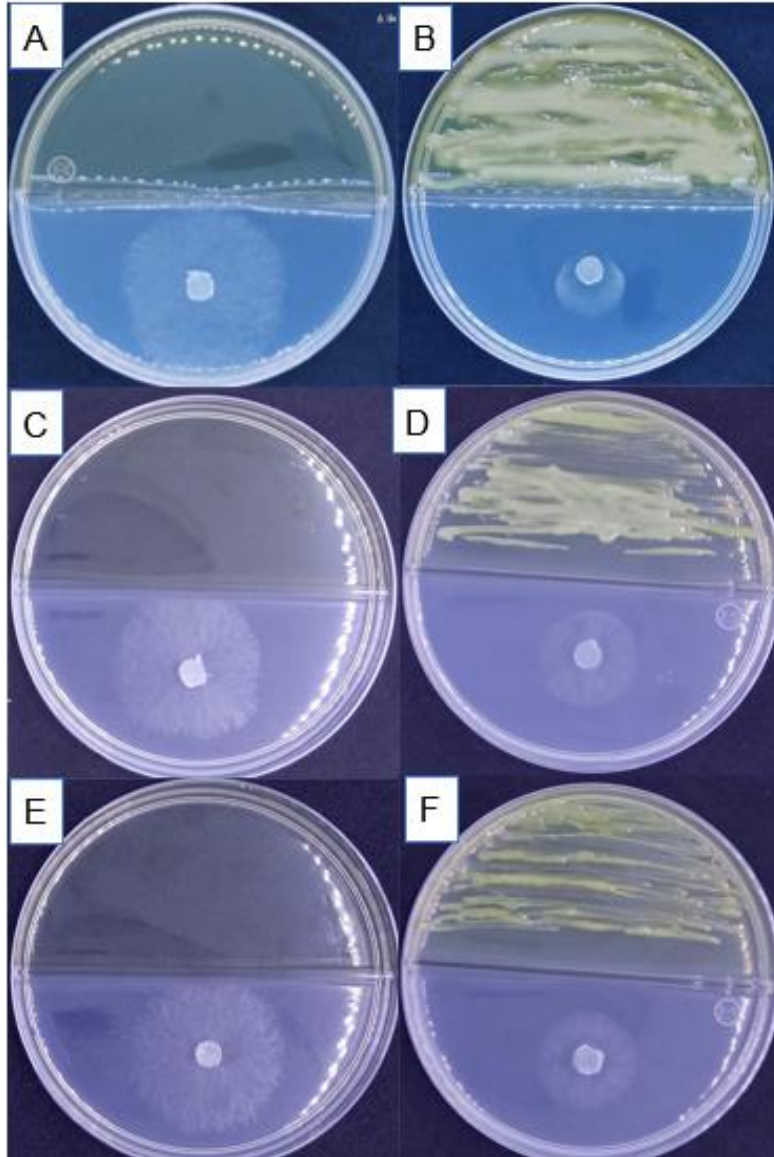


Figura 12. Antagonismo *in vitro* mediante compuestos orgánicos volátiles. A) Ss1, B) Ss1 + D02, C) Ss2, D) Ss2 + D02, E) Ss3, F) Ss3 + D02

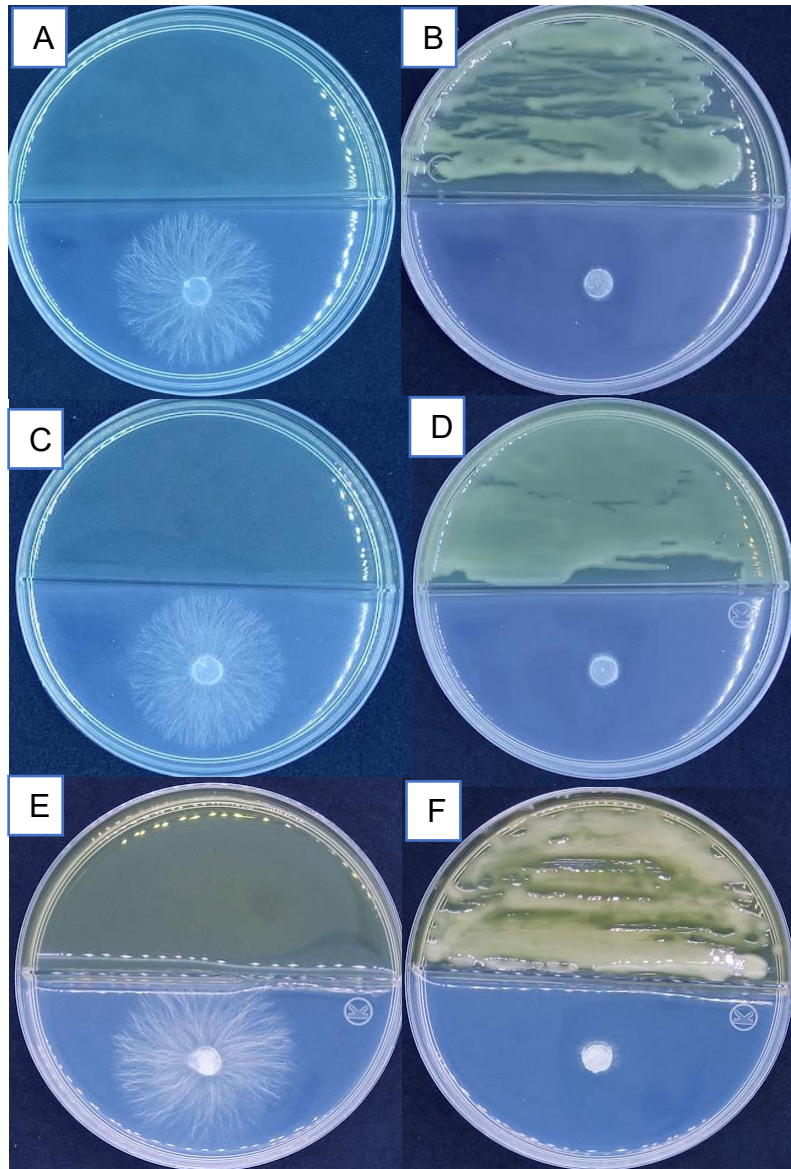


Figura 13. Antagonismo *in vitro* mediante compuestos orgánicos volátiles. A) Sr1, B) Sr1 + D02, C) Sr2, D) Sr2 + D02, E) Sr3, F) Sr3 + D02

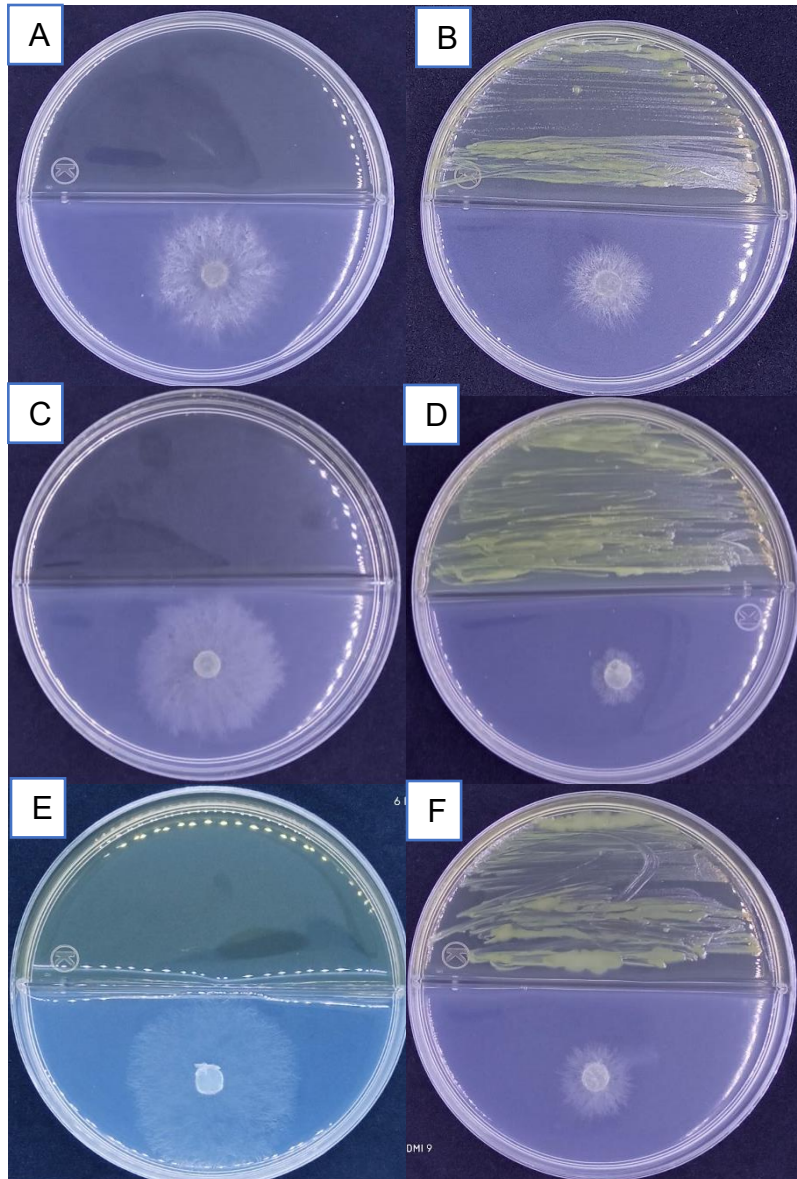


Figura 14. Antagonismo *in vitro* mediante compuestos orgánicos volátiles. A) *Rs1*, B) *Rs1* + D02, C) *Rs2*, D) *Rs2* + D02, E) *Rs3*, F) *Rs3* + D02

Cuadro 15. Inhibición de crecimiento micelial en la prueba de antagonismo *in vitro* por compuestos orgánicos volátiles

Aislado	Diámetro (mm)			Inhibición (%)		
	Ss1	Ss2	Ss3	Ss1	Ss2	Ss3
Ss + D02	7.32	9.00	7.39	61.51±19.04 a	51.48±13.13 a	60.29±28.3 a
Ss	19.44	18.71	18.99	-	-	-
	Sr1	Sr2	Sr3	Sr1	Sr2	Sr3
Sr + D02	3.52	4.22	4.33	80.13±5.60 a	74.87±5.23 a	75.46±5.13 a
Sr	17.86	16.76	17.69	-	-	-
	Rs1	Rs2	Rs3	Rs1	Rs2	Rs3
Rs + D02	8.70	11.74	8.29	53.20±12.44a	38.31±4.18 a	42.40±11.94a
Rs	16.88	18.73	18.75	-	-	-

Los tratamientos agrupados con la misma letra no difieren estadísticamente (ANOVA, Tukey, P> 0.05), n=6.

7.7.3 Pruebas de solubilización de fosfatos

La prueba de solubilización de fosfatos en medio Pikovskaya tiene como característica la formación de un halo transparente en el medio. La prueba se realizó por duplicado y se empleó la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (95N) como control positivo, mostrando estas características alrededor del pozo. El aislado bacteriano D02 no presentó halo transparente alrededor del pozo donde se inoculó la suspensión bacteriana, dando un resultado negativo a la solubilización de fosfatos.

7.7.4 Producción de auxinas

El aislado bacteriano D02 resultó positivo a la prueba colorimétrica para la detección de producción auxinas, con una concentración de AIA de $6.80 \pm 0.13 \mu\text{M/mL}$.

7.8 Identificación molecular del aislado bacteriano D02

La secuencia se comparó con secuencias depositadas en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica usando BLAST y algoritmos MegaBLAST.

En cuanto al aislado D02, la comparación de la secuencia del gen 16S del ADN ribosomal mostró una identidad de 99.5 % con *Pseudomonas* sp. zw40 (MH337952), *Pseudomonas* sp. OIL2 (OM084003), diferentes aislados de *Pseudomonas vranovens* Trvzová et al., 2006 (T26; HQ202851 y T16; HQ202845), y el 95.4 % con *Pseudomonas* sp. R2 (CP019396) y *Pseudomonas*

donghuensis Gao et al. 2015 (HYS; NR136501 y B21-042; CP877171). En el filograma, el aislado D02 se agrupó con las diferentes especies del género *Pseudomonas* (Bootstrap 98 %; **Figura 15**). Por lo que su identificación no se pudo resolver a nivel especie.

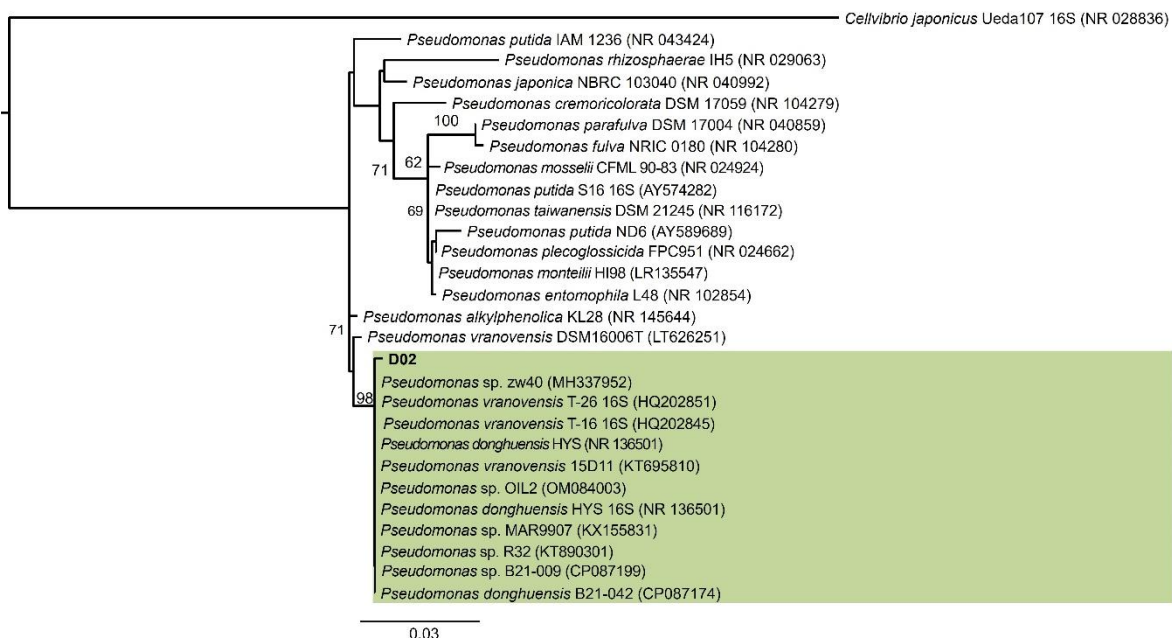


Figura 15. Árbol filogenético generado con el método de máxima verosimilitud usando secuencias de la región 16S de ADN ribosomal de especies de *Pseudomonas*. La secuencia de *Cellvibrio japonicus* Humphry et al. 2003 Ueda107 (NR 028836) se utilizó como grupo externo, el número en la rama indica el valor de soporte dado por 1000 réplicas. El aislado caracterizado en este estudio se indica en negrita.

7.9 Identificación molecular de los aislados de *Sclerotinia sclerotiorum* utilizados en el presente estudio

Las secuencias se compararon con secuencias depositadas en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica usando BLAST y algoritmos MegaBLAST.

La comparación de secuencias de la región ITS para los aislados Ss1, Ss2 y Ss3 reveló una identidad del 100 % con diferentes aislados de *S. sclerotiorum* (CBS 499.50; MH856725, SS1; ON823210, SS4 ON830716 y SS5; ON831560).

El filograma mostró la agrupación de nuestros aislados con *S. sclerotiorum* en un clado bien definido (Bootstrap 53 %; **Figura 16**).

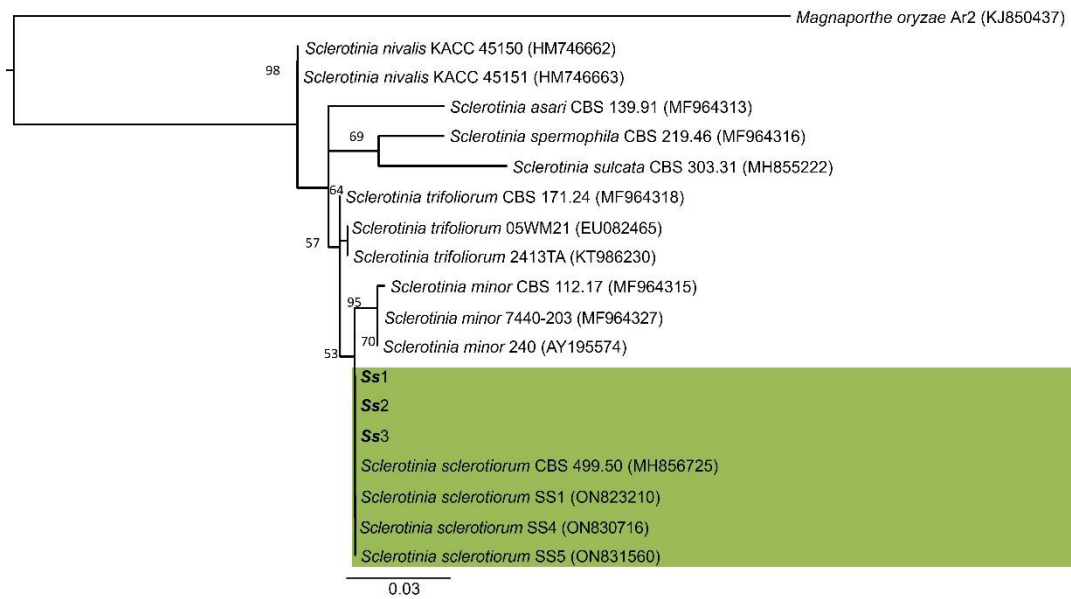


Figura 16. Árbol filogenético generado con el método de Máxima Verosimilitud usando secuencias de la región ITS de especies de *Sclerotinia*. La secuencia de *Magnaporthe oryzae* B.C.Couch (KJ850437) se utilizó como grupo externo, el número en la rama indica el valor de soporte dado por 1000 réplicas. Los aislamientos caracterizados en este estudio se indican en negrita

8. DISCUSIÓN

8.1 Colección bacteriana de aislados rizosféricos del cultivo de papa

La rizosfera representa un área de suelo adyacente e influenciado por las raíces vivas de las plantas, en ella la concentración de microorganismo es mayor, dada a las condiciones proporcionadas por las plantas (Lynch, 1990; Lynch y Leij, 2012). El papel de las bacterias asociadas a la rizosfera ha aumentado su importancia en la agricultura debido a las capacidades benéficas que presentan. La producción de fitohormonas es un mecanismo de la promoción de crecimiento vegetal causada por la elaboración de factores de crecimiento vegetal como AIA, giberelinas y citoquininas. Otra capacidad importante de las rhizobacterias es el control biológico, algunos mecanismos reportados son el antagonismo, interferencias de señales, resistencia sistemática inducida, competencia por iones de hierro, interferencia con

la actividad, supervivencia del patógeno, competencias por nutrientes y nicho (Lugtent y Kamamilova, 2009).

Sin embargo, no todos los microorganismos presentan una alta viabilidad para el control de enfermedades en cultivos agrícolas, además, algunos son un riesgo para el humano, por lo que es necesario un estudio a fondo de los aislados. Un ejemplo es el género de bacterias *Bacillus*, el cual es usado ampliamente en la agricultura por poseer gran diversidad metabólica. *Bacillus cereus* Frankland y Frankland, 1887 y *Bacillus subtilis* son dos especies de este género mayormente usadas en control biológico en campo y no son consideradas como patógenos para humanos. Sin embargo, Pavic et al. (2005) reporta que las especies de *B. subtilis* y *B. lincheniformis* como agentes causantes de una serie de intoxicaciones en un jardín de niños por el consumo de leche en polvo donde se encontraban las especies bacterianas mencionadas. Glasset et al. (2016) reportan que *B. cereus* fue registrada como la segunda o tercera causa principal de brotes transmitidos por alimentos en Francia, provocando dos tipos de enfermedades gastrointestinales, síndromes eméticos y diarreicos.

Con el fin evitar riesgos a la salud y descartar aislados bacterianos con propiedades hemolíticas, se realizó la prueba presuntiva de hemólisis en agar sangre, donde de los 10 aislados con potencial antagónico detectados, sólo los aislados A04, B02 y D02 mostraron una hemolisis gama, lo que representa el 5.56 % del total de aislados de la colección bacteriana formada. Martínez-Álvarez et al. (2020) reporta que de una colección bacteriana formada por 65 aislados obtenidos de la rizosfera de frijol en los municipios de Ahome, Guasave y Angostura de Sinaloa, México, el 4.61 % mostraron actividad antagónica y hemolisis- y.

8.2 Efecto antagónico *in vitro* del aislado bacteriano D02

De los 54 aislados de la colección formada, sólo 3 aislados (A04, B02 y D02) mostraron características no hemolíticas, pero con diferente capacidad antagónica contra los tres aislados de cada hongo fitopatógeno (*S. sclerotiorum*, *S. rolfsii* y *R. solani*). De este pequeño grupo se seleccionó el aislado bacteriano D02 al tener un

porcentaje antagónico superior al 30 % de inhibición contra los tres patógenos, a excepción con el aislado Ss2 que mostró un 9.61 % de inhibición en el escrutinio. Los resultados de los ensayos de antagonismo *in vitro* del aislado bacteriano D02 contra los aislados Ss1, Ss2 y Ss3 de *S. sclerotiorum* mostraron 55.85, 50.29 y 55.31 % de inhibición correspondientemente. Mohamed y colaboradores (2021) reportan tres aislados bacterianos del género *Bacillus* con capacidad antagónica *in vitro* contra aislados fúngicos de *S. sclerotiorum* colectados de plantas de papa, las cepas bacterianas mostraron una alta reducción de crecimiento micelial, estas fueron identificadas como *B. subtilis* (Bs2), *B. megaterium* (Bm1) y *B. megaterium* (Bm2) con un porcentaje de inhibición de 53.43, 52.8 y 51.6, respectivamente.

Mansour et al. (2008) reportan zonas de inhibición en pruebas de antagonismo *in vitro* de *B. amyloliquefaciens* contra un aislado de *S. sclerotiorum*, durante el ensayo detectaron la ausencia de formación de esclerocios. Además, realizaron ensayos en medio de cultivo al que se le adicionaron filtrados de *B. amyloliquefaciens* (cepa KucB001) de 3 y 7 días de edad, las mayores concentraciones del filtrado bacteriano mostraron 55 % de inhibición del crecimiento micelial con una producción de 9 a 7 esclerocios.

Por otro lado, los resultados de antagonismo *in vitro* con el aislado bacteriano D02 contra los aislados Sr1, Sr2 y Sr3 de *S. rolfisii* mostraron un porcentaje de inhibición 21.93, 24.99 y 28.51 % respectivamente. Chanutsa et al. (2014) reportan la capacidad de inhibición micelial de tres aislados bacterianos (KK1EBa-3, KK11EBa-3 y UD1EBa-2) contra un aislado de *S. rolfisii*, con un rango de inhibición de 45 a 60 %. El mayor porcentaje de inhibición se registró con el aislado KK11EBa-3, que inhibió el 60 %, y se identificó *Pseudomonas aeruginosa*. Resultados similares son reportados por Kishore et al. (2005), donde obtuvieron cinco aislados bacterianos GRS 175 (*Pseudomonas* sp.), GPS 21, GSE 18, GSE 19 y GSE 30 (*Pseudomonas aeruginosa*) con la capacidad de inhibir por completo el crecimiento micelial contra *S. rolfisii* en pruebas de actividad antagónica en cultivos filtrados libres de células con concentraciones de 50 % (v/v). Al mismo tiempo los aislados bacterianos se evaluaron contra un aislado de *R. solani*, solo las cepas

GPS 21, GSE 18, GSE 19 y GSE 30 mostraron inhibición del crecimiento micelial bajo concentraciones de 50 % (v/v).

8.3 Efecto antagónico *in planta* del asilado bacteriano D02 sobre los aislados de *S. sclerotiorum* y *R. solani*

Los porcentajes de incidencias obtenidos en los tratamientos Ss1 + D02 y Ss2 + D02 con respecto a los tratamientos controles Ss1 y Ss2, muestran diferencias estadísticas significativas. Sin embargo, Ss3 + D02 con 6.2 % y Ss3 con 37.5 % de incidencia, no muestran diferencias estadísticas entre sí. Esto se puede deber a una variabilidad en la capacidad de infección dada entre aislados diferentes de un mismo patógeno.

Los tratamientos Ss1 + D02, Ss2 + D02 y Ss3 + D02 mostraron porcentajes de severidad del 0 %, estos resultados muestran diferencias significativas con los tratamientos Ss1, Ss2 y Ss3, donde se registró porcentajes de severidad del 29.1, 33.3 y 25 respectivamente. Los porcentajes de severidad obtenidos en los tratamientos Ss1 + D02, Ss2 + D02 y Ss3 + D02 son similares a los reportados por Mohamed et al. (2021), donde obtuvieron 31.2, 33.1, 38.16 y 31.26 % de severidad utilizando a *P. fluorescens* (Pf2), *B. polymyxa* (Bp), *B. megaterium* (Bm1) y *B. subtilis* (Bs2) como bacterias antagónicas contra *S. sclerotiorum* en cultivo de papa.

La incidencia del patógeno en el tratamiento Rs3 fue de 94.3 % pero se redujo por efecto de la bacteria (Rs3+D02) hasta el 33.3 %. No obstante, no se observó diferencia en la severidad del patógeno en los tratamientos Rs3 y Rs3+D02.

Arcos y Zúñiga (2015), observaron en experimentos en parcelas infestadas por *R. solani*, una incidencia del 12.5 % y una severidad del 30 % en tubérculos de papa (Variedad Ccompis). Las cuales disminuyeron significativamente la severidad/incidencia a 5 % en ambas variables por el tratamiento con *B. amyloliquefaciens*. Esto difiere a lo observado en nuestros resultados.

8.4 Detección de mecanismos antagónicos y de crecimiento vegetal

Las RPCV se caracterizan por la capacidad de estimular el crecimiento de las plantas a través de mecanismos de tipo directo o indirecto. La producción de auxinas como el AIA es considerado como un mecanismo indirecto capaz de inducir deformaciones y aumento de pelos radiculares en la planta, lo que tiene como consecuencia una mayor captación de nutrientes en la misma, logrando la promoción del crecimiento y el rendimiento en los cultivos (Okon y Vanderleyden, 1997). El aislado bacteriano D02 produjo una concentración de $6.80 \pm 0.13 \mu\text{g/mL}$ de AIA, una de las auxinas comúnmente producidas por organismo endófitos o rizosféricos, implicada en la estimulación de la división celular, la diferenciación de células y tejidos, elongación celular y la formación de raíces laterales. (Okon y Vanderleyden, 1997)

La síntesis de AIA por bacterias rizosféricas varía dependiendo de las condiciones ambientales (Nieto-Jacobo *et al.*, 2017) Se ha observado que la concentración de AIA producido por diferentes cepas de *Bacillus* (BA97, BN17, BN20 y BR20) aislados de frijol es de 1.98-3.87 $\mu\text{g/mL}$. Estos aislados tuvieron la capacidad de promover el crecimiento vegetal de plantas de frijol y disminuir la severidad de *Macrophomina phaseolina* (Bojórquez-Armenta *et al.*, 2021). La presencia de AIA puede rediseñar la arquitectura de la raíz aumentando su masa y como consecuencia adquiere una mayor área para la colonización microbiana (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009; Nieto-Jacobo *et al.*, 2017). La estimulación del desarrollo radicular en las plantas por la síntesis AIA de microorganismos como RPCV podría estar relacionada con una protección indirecta contra patógenos (Bojórquez-Armenta *et al.*, 2021).

La producción de sideróforos es considerada como una estimulación indirecta, que tiene la capacidad de secuestrar el hierro disponible en el medio, lo que limita el crecimiento de microorganismos fitopatógenos (Dowling *et al.*, 1996; Aguado-Santacruz *et al.*, 2012). En esta investigación el aislado bacteriano D02 fue sometido a la prueba de producción de sideróforos en medio CAS, obteniendo un resultado positivo, sin embargo, es necesario realizar más estudios para su

cuantificación y la clasificación de las moléculas producidas. Santoyo et al. (2010) utilizaron la cepa bacteriana ZUM80 (*P. fluorescens*) aislada de rizosfera de papa en pruebas de antagonismo *in vitro* en medio King B Agar contra los patógenos *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. Y Magnus) Briosi y Cavara, *Colletotrichum gloesporioides* (Penz.) Penz. Y Sacc y *Phytophthora cinnamomi* Rands, se utilizó la cepa mutante ZUM80 Sid⁻ (incapaz de sintetizar sideróforos) que fue construida a partir de la cepa parental ZUM80. Los porcentajes máximos de inhibición por la cepa ZUM80 inoculada 24 horas de anterioridad a los patógenos fueron de 76, 72 y 70 %, respectivamente mientras que la cepa mutante ZUM80 Sid⁻ no logró disminuir el crecimiento de los patógenos. Por lo que es posible que la inhibición observada en el crecimiento de los patógenos esté también dada por a la capacidad de D02 para producir sideróforos.

Por otro lado, las propiedades fungistáticas de los compuestos volátiles bacterianos es un área en desarrollo (Velázquez-Becerra, 2010). Los rangos de porcentaje de inhibición por compuestos volátiles del asilado bacteriano D02 contra los aislados fúngicos de *S. sclerotiorum* fueron del 51.4 a 61.5 %, *S. rolfsii* mostro un rango de 74.8 a 80.1 % y *R. solani* de 38.3 a 53 %. Velázquez-Becerra et al. (2010) reportan una reducción de 30 % en el crecimiento de *Botrytis cinerea* cuando se expone a los COV de *Arthrobacter agilis* (Ali-Cohen, 1889). Koch et al., 1995 UMCV2 en pruebas de antagonismo por compuestos volátiles en placas divididas con respecto a testigo control. Resultados similares fueron obtenidos por Bojórquez-Armenta et al. (2021) empleando las mismas pruebas de antagonismo *in vitro*, utilizaron cuatro asilados bacterianos del género *Bacillus* contra el hongo fitopatógeno *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid agente causal de la podredumbre de carbón en frijol, observando porcentajes de inhibición de 37.5 al 75 %.

8.5 Identificación molecular del aislado bacteriano D02

El aislado bacteriano D02 obtenido de la rizosfera de papa se identificó como *Pseudomonas* sp. mediante análisis moleculares con base al gen 16S del ADN ribosomal. Se requiere de un análisis concatenado con distintos marcadores molecular para tratar de distinguir la especie. Sin embargo, se ha documentado ampliamente el aislamiento de especies del género *Pseudomonas* en la rizosfera de plantas de interés económico como ajo, arroz, col, frijol, tomate, trigo y papa, (Geels y Schippers, 1983; Bakthavatchalu *et al.* 2012; Martínez- Álvarez *et al.*, 2021). Diversos estudios concluyen que el género *Pseudomonas* presenta una mayor frecuencia y densidad de población en los aislamientos en plantas estudiadas (Hallmann y Berg, 2006; Zahid *et al.*, 2015; Sánchez-Bautista *et al.*, 2018).

Dentro del género *Pseudomonas* se han reportado diversas especies como *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. synxantha*, *P. putida* y *P. trivialis* con la capacidad de biocontrol contra diversos patógenos de cultivos de interés económico en condiciones *in vitro* e *in planta* (Ganeshan *et al.*, 2005; Scherwinski *et al.*, 2008; Yu y Lee, 2015; Sasirekha y Srividya *et al.*, 2016; Aoello *et al.*, 2019; Martínez-Álvarez *et al.*, 2020). En esta investigación el aislado D02 mostró inhibición micelial en pruebas de confrontación *in vitro* contra los hongos fitopatógenos *S. sclerotiorum*, *S. rolfsii* y *R. solani*.

Otro mecanismo de antagonismo del género *Pseudomonas* es la síntesis de compuestos volátiles. Trivedi *et al.* (2006) reportan a *P. corrugata* con la capacidad de producir compuestos volátiles antifúngicos inhibiendo el crecimiento micelial de *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl en un 58 % y *F. oxysporum* en 49 %. Khabbaz *et al.* (2015) obtuvieron resultados similares evaluando la cepa Pf 9A-14 (*P. fluorescens*) en pruebas de inhibición micelial por compuestos volátiles empleando el método de cámara sellada contra los agentes fitopatógenos *Phytophthora capsici* Leonian y *R. solani*. El aislado D02 en pruebas de antagonismos mediante compuestos volátiles empleando el método de placa dividida, redujo el crecimiento micelial de los aislados

de *S. sclerotiorum* (Ss1, Ss2 y Ss3), *S. rolfsii* (Sr1, Sr2 y Sr3) y *R. solani* (Rs1, Rs2 y Rs3).

Otra de las características reportadas en el género *Pseudomonas*, es la capacidad de producir sideróforos. Khabbaz et al. (2015) reportan a *P. fluorescens* Pf 9A-14 y *Pseudomonas* sp con capacidad para producir sideróforos. Estas características también por el aislado D02.

8.6 Identificación molecular de los aislados de *S. sclerotiorum*

Los aislados Ss1, Ss2 y Ss3 de *S. sclerotiorum* fueron identificados mediante comparación de secuencias de la región ITS. Diversos autores han reportado plantas de papa con lesiones acuosas, micelio largo y blanco, esclerocios irregulares de color negro (3.5 – 6.0 mm de diámetro) ubicados en el tallo o alrededor de la corona y la germinación de apotecios son síntomas característicos de moho blanco en cultivos de papa (Ojaghian, 2009; Kurt et al., 2017 Alam et al., 2021). Los aislados Ss1, Ss2 y Ss3, se colectaron en cultivos de papa en forma de esclerocios, durante las pruebas *in planta*, se observó la producción de apotecios y posteriormente los síntomas característicos de *S. sclerotiorum* en las plantas de papa.

Muhammad et al. (2021) realizaron identificación molecular en base comparaciones de secuencias en la región ITS empleando los cebadores ITS4 y ITS5 (White et al., 1990), como resultado obtuvieron un 99 % de identidad con respecto a secuencias de *S. sclerotiorum* (KT595415 y MT463540) obtenidas en el banco de genes del Centro Nacional de Información Biotecnológica (CNIB). Kurt et al. (2017) obtuvieron resultados similares en el aislamiento e identificación molecular de *S. sclerotiorum*, con un 100% homología con respecto a otras secuencias de *S. sclerotiorum* (KU375684) obtenidas del banco de genes del CNIB.

El alineamiento de los aislados Ss1, Ss2 y Ss3 mostró una agrupación bien definida con las secuencias *S. sclerotiorum* (CBS 499.50; MH856725, SS1; ON823210, SS4 ON830716 y SS5; ON831560) obtenidas y disponibles en el banco de genes del CINB.

9. CONCLUSIONES

Se formó una colección bacteriana de 54 aislados procedentes de la rizosfera de papa del Norte de Sinaloa.

El aislado bacteriano D02 identificado molecularmente como *Pseudomonas* sp. presenta la capacidad de producir sideróforos, AIA, compuestos volátiles y potencial antagónico *in vitro* contra tres aislados de *S. Sclerotiorum*, *S. rolfsii* y *R. solani*.

El aislado D02 se empleó en experimentos *in planta* contra los hongos fitopatógenos. Este aislado mostró las capacidades de biocontrol contra *S. sclerotiorum* y *R. solani*.

Los aislados Ss1, Ss2 y Ss3 de *S. sclerotiorum* fueron confirmados por técnicas de biología molecular.

10. BIBLIOGRAFIA

- Adams PB. y Ayers WA. 1979. Ecology of *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 69:896-899.
- Aguado-Santacruz GA, Moreno-Gómez B, Jiménez-Francisco B, García-Moya E y Preciado-Ortiz RE. 2012. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosidéforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Revista fitotecnia mexicana*, 35(1), 9-21.
- Agrios, GN. 2005. *Plant pathology*. 5th Edition. Academic Press. 922.
- Ahmad F, Ahmad I y Khan MS. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research* 163:173-81
- Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG, Morales FJ, Epstein PR y Daszak P. 2004. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends Ecol Evol* 19(10), 0–544. doi:10.1016/j.tree.2004.07.021
- Alam MW, Rehman A, Malik A, Mehboob S, Sarwar M, y Muhammad S. 2021. First report of white mould of potato caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in Pakistan. *Journal of Plant Pathology*, 103(2), 669-669.
- Apodaca-Sánchez MA. 2012. Principales enfermedades infecciosas del frijol en Sinaloa y su manejo. Jornada de transferencia de tecnología del cultivo del frijol. Memoria de Capacitación. Fundación Produce Sinaloa. Culiacán, México. 7-26 p.
- Arcos J y Zúñiga D. 2015. Efecto de rizobacterias en el control de *Rhizoctonia solani* en el cultivo de papa. *Ecología Aplicada*, 14(2), 95-101.
- Ayala-Armenta QA, Cortez-Mondaca E, Apodaca-Sánchez M Á, Leal-León VM, Valenzuela-Escoboza FA y Palacios-Mondaca CA. 2015. Efectividad de fungicidas convencionales y biorracionales sobre *Sclerotinia sclerotiorum* *in vitro*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 6(SPE11), 2149-2156. Doi: <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i11.784>

- Aycock R. 1966. Stem rot and other diseases caused by *Sclerotium rolfsii* or the status of Rolf's fungus after 70 years. North Carolina Agricultural Experiment Station Technical Bulletin. 174: 202 pp
- Banville GJ. 1989. Yield losses and damage to potato plants caused by *Rhizoctonia solani* Kuhn. American Potato Journal, 66(12), 821–834. doi:10.1007/bf02853963
- Balali GR, Neate SM, Scott ES, Whisson DJ y Wicks TJ. 1995. Grupo de anastomosis y patogenicidad de aislamientos de *Rhizoctonia solani* de cultivos de papa en el sur de Australia. patología vegetal, 44(6), 1050–1057. doi:10.1111/j.1365-3059.1995.tb02664.x
- Baldauf PM, Gray SM y Perry KL. 2006. Biological and serological properties of Potato virus Y isolates in northeastern United States potato. Plant Disease, 90(5), 559-566.
- Bakás L, Maté S, Vazquez R y Herlax V. 2013. Mecanismo de acción de la toxina alfa hemolisina de *Escherichia coli*. Acta bioquímica clínica latinoamericana, 47(2), 353-361.
- Bakthavatchalu S, Shivakumar S y Sullia SB. 2012. Identification of multi-trait PGPR isolates and evaluation of their potential as biocontrol agents. Acta Biologica Indica, 1(1), 61-67.
- Bashan Y y De-Bashan LE. 2005. Bacteria/plant growth-promotion. In: Hillel, D. (Ed.), Encyclopedia of Soils in the Environment. Elsevier, Oxford, pp. 103–104.
- Bateman DF y Beer SV. 1965. Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotium rolfsii*. Physiopathology 55:204-211.
- Brewer MT Y Larkin RP. 2005. Efficacy of several potential biocontrol organisms against *Rhizoctonia solani* on potato. Crop Protection, 24(11), 939–950. doi:10.1016/j.cropro.2005.01.012

- Billah KM. 2017. Pathogenicity of *Sclerotium rolfsii* on different host, and its overwintering survival; A mini review. International Journal of Advances in Agriculture Sciences, 2(1). El movimiento de larga distancia se produce mediante esclerótico en material vegetal o suelo durante envío.
- Bojórquez-Armenta YDJ, Mora-Romero GA, López-Meyer M, Maldonado-Mendoza IE, Castro-Martínez C, Romero-Urías CDLA y Martínez-Álvarez JC. 2021. Evaluation of *Bacillus* spp. isolates as potential biocontrol agents against charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* on common bean. Journal of General Plant Pathology, 87(6), 377-386.
- Boland GJ y Hall R. 1988. Epidemiology of Sclerotinia stem rot of soybean in Ontario. Phytopathology 78:1241-1245.
- Campa-Negrillo A, Pascual-González A, Ferreira-Fernández JJ, SERIDA. 2009. El moho blanco: una enfermedad común en el cultivo de Faba Granja Asturiana. Tecnología Agroalimentaria N° 6. pp. 7-9.
- Carling DE y Leiner RH. 1986. Isolation and characterization of *Rhizoctonia solani* and binucleata *R. solani*-like fungi from aerial stems and subterranean organs of potato plants. Phytopathology, 76(7), 725-729.
- Carling DE, Leiner RH y Westphale PC. 1989. Symptoms, signs and yield reduction associated with Rhizoctonia disease of potato induced by tuberborne inoculum of *Rhizoctonia solani* AG-3. American Potato Journal, 66(11), 693–701. doi:10.1007/bf02896825
- Calvo-Vélez P, Reymundo-Meneses L y Zúñiga-Dávila D. 2008. Estudio de las poblaciones microbianas de la rizosfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. *Ecología Aplicada*, 7(1-2), 141-148.
- Camire ME, Kubow S, Donnelly DJ. 2009. Potatoes and human health. Crit Rev Food Sci Nutr 49:823–840
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408390903041996?scroll=top&needAccess=true>

- Centro internacional de la papa (CIP). 2021. Papa. <https://cipotato.org/potato/> (consulta, mayo 2021).
- Contreras-Cornejo HA, Macias-Rodríguez L, Cortes-Penagos C, Lopez-Bucio J. 2009. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in arabidopsis. *Plant physiology*, 149(3), 1579–1592. doi:10.1104/pp.108.130369
- Colak-Ates A. 2019. Effect of *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma harzianum* in the biological control of white mold disease (*Sclerotinia sclerotiorum*) in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Appl Ecol Environ Res*, 17(6), 15687-15701. Carling, D. E., Leiner,
- Chang SW y Kim SK. 2003. First report of *Sclerotinia* rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum* on some vegetable crops in Korea. *The Plant Pathology Journal*, 19(2), 79-84.
- Das NC, Dutta BK y Ray DC. 2014. Potential of some fungicides on the growth and development of *Sclerotium rolfsii* Sacc. *in vitro*. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 4(12), 1-5.
- Donmez MF, Uysal B, Demirci E, Ercisli S y Cakmakci R. 2015. Biological control of root rot disease caused by *Rhizoctonia solani* Kuhn on potato and bean using antagonist bacteria. *Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus*, 14(5), 29-40.
- Doyle JJ. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32(5): 1792–1797. doi:10.1093/nar/gkh340.
- Errampalli D, Saunders JM y Holley JD. 2001. Emergence of silver scurf (*Helminthosporium solani*) as an economically important disease of potato. *Plant pathology*, 50(2), 141-153.

- Félix-Gastélum R. 2021. Potato Diseases in Sinaloa, Mexico. Plant Pathology Seminar Series
- Fernández AJG. 2013. *Sclerotium rolfsii*, un patógeno de judía que produce daños de forma ocasional. Tecnología agroalimentaria: Boletín informativo del SERIDA, (11), 19-20.
- Fernando WGD, Nakkeeran S, Zhang Y, Y Savchuk S. 2007. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* species on canola petals. Crop protection, 26(2), 100-107.
- Ferreira SA y Boley RA. *Sclerotium rolfsii*, http://www.extento.hawaii.edu/Kbase/Crop/Type/s_rolfs.htm . (consulta, mayo 2021).
- Fiers M, Edel-Hermann V, Chatot C, Le Hingrat Y, Alabouvette C y Steinberg C. 2011. Potato soil-borne diseases. A review. Agronomy for Sustainable Development, 32(1), 93–132. doi:10.1007/s13593-011-0035-z
- Flores-Moctezuma HE, Montes-Belmont R, Rogel-Hernández MA y Martínez-Romero, ME. 2008. Diversidad Genética de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en México. *Revista mexicana de fitopatología*, 26(1), 7-14.
- Gachango E, Hanson LE, Rojas A, Hao JJ y Kirk WW. 2012. *Fusarium* spp. causing dry rot of seed potato tubers in Michigan and their sensitivity to fungicides. Plant Disease, 96(12), 1767-1774.
- Ganeshan G y Manoj-Kumar A. 2005. *Pseudomonas fluorescens*, a potential bacterial antagonist to control plant diseases. Journal of plant interactions, 1(3), 123-134. doi.org/10.1080/17429140600907043
- García R, García A y Delgado L. 1999. Distribución, incidencia y variabilidad de *Ralstonia solanacearum*, agente causal de la marchitez bacteriana de la papa en el estado Mérida. Bioagro, 11(1), 12-23.
- García RO, Kerns JP y Thiessen L. 2019. *Ralstonia solanacearum* species complex: a quick diagnostic guide. Plant Health Progress, 20(1), 7-13.

- Garibaldi A, Gilardi G y Gullino ML. 2006. First report of southern blight incited by *Sclerotium rolfsii* on potato (*Solanum tuberosum*) in northern Italy. *Plant disease*, 90(8), 1114-1114. Doi: <https://doi.org/10.1094/PD-90-1114C>
- Geels FP y Schippers B. 1983. Selection of antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. and their root colonization and persistence following treatment of seed potatoes. *Journal of Phytopathology*, 108(3-4), 193-206.
- Glick BR. 1995. The enhancement of plant growth by freeliving bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 41: 109-117.
- Gomila M, Peña A, Mulet M, Lalucat J y García-Valdés E. 2015. Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Front Microbiol.* 18(6):214. doi: 10.3389/fmicb.2015.00214.
- Greenfiel H y Southgate DA. 2009. Nueva luz sobre un tesoro enterrado: año Internacional de la Papa 2008-Reseña de fin de año (No. V330). FAO.
- Haghi Z, Mostowfizadeh–Ghalamfarsa R y Hamzeh-Zarghani H. 2020. Identification, distribution and functional diversity of Iranian isolates of *Pythium oligandrum*. *BioControl in Plant Protection*, 7(2), 91-112.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95–98. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-14998u1.29.
- Hernández-Castillo FD, Lira-Saldivar RH, Cruz-Chávez L, Gallegos-Morales G, Galindo-Cepeda ME, Padrón-Corral E y Hernández-Suárez M. 2008. Potencial antifúngico de cepas de *Bacillus* spp. y extracto de *Larrea tridentata* contra *Rhizoctonia solani* en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). *Phyton (Buenos Aires)*, 77, 241-252.
- Hoyos-Carvajal L, Chaparro P, Abramsky M, Chet I y Orduz S. 2008. Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones in vitro y de invernadero. *Agronomía Colombiana*, 26(3), 451-458.

- Hooker WJ. 1981. Virise. P International Potato Center. First edition. American Phytopathological Society. USA. 125p.
- Humber RA. 1997. Fungi. Manual of Techniques in Insect Pathology, 269–279. doi:10.1016/b978-012432555-5/50015-4
- Infante D, Martínez B, González N, y Reyes Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Revista de protección vegetal, 24(1), 14-21.
- Jager G, Velvis H, Lamers JG, Mulder A y Roosjen J. 1991. Control of *Rhizoctonia solani* in potato by biological, chemical and integrated measures. Potato Research, 34(3), 269–284. doi:10.1007/bf02360500
- Jatala P. 1986. Nematodos parásitos de la papa. Departamento do capacitación y comunicaciones, CIP. Boletín informativo técnica No.8. Lima, Perú. 19p.
- Jellis GJ y Taylor GS. 1977. El desarrollo de la caspa plateada (*Helminthosporium solani*) enfermedad de la papa. Annals of Applied Biology, 86 (1), 19-28. doi: 10.1111 / j.1744-7348.1977.tb01811.x
- Katan J. 1981. Solar Heating (Solarization) of Soil for Control of Soilborne Pests. Annual Review of Phytopathology, 19(1), 211–236. doi:10.1146/annurev.py.19.090181.
- Katan J, Greenberger H y Grinstein A. 1976. Solar heating by polyethylene mulching for the control of diseases caused by soil-borse pathogens. Phytopathology 66: 686-688.
- Khabbaz SE, Zhang L, Cáceres LA, Sumarah M, Wang A y Abbasi PA. 2015. Characterisation of antagonistic Bacillus and Pseudomonas strains for biocontrol potential and suppression of damping-off and root rot diseases. Annals of Applied Biology, 166(3), 456-471. doi:10.1111/aab.12196
- Khedher SB, Kilani-Feki O, Dammak, M, Jabnoun-Khiareddine H, Daami-Remadi M y Tounsi S. 2015. Efficacy of Bacillus subtilis V26 as a biological control

agent against *Rhizoctonia solani* on potato. *Comptes rendus biologiques*, 338(12), 784-792.

Kloepper JW, Schroth MN y Miller TD. 1980. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology*, 70(11), 1078-1082.

Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.

Kishore G Krishna, Pande S y Podile AR. 2005. Biological control of collar rot disease with broad-spectrum antifungal bacteria associated with groundnut. *Canadian Journal of Microbiology*, 51(2), 123–132. doi:10.1139/w04-119

Kurt Ş, Uysal A, Kara M, Soylu S y Soylu EM. 2017. Natural infection of potato by *Sclerotinia sclerotiorum* causing stem rot disease in Turkey. *Australasian Plant Disease Notes*, 12(1), 1-3.

López HA. 2001. Estrategias integradas para el control de enfermedades de las plantas. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 54(1 y 2), 1251-1273.

Madi L, Katan T, Katan J y Henis Y. 1997. Biological control of *Sclerotium rolfsii* and *Verticillium dahliae* by *Talaromyces flavus* is mediated by different mechanisms. *Phytopathology*, 87(10), 1054-1060.

Madhavi GB y Bhattiprolu SL. 2011. Integrated disease management of dry root rot of chilli incited by *Sclerotium rolfsii* (Sacc.). *International Journal of Plant, animal and environmental sciences*, 1(2), 31-37. Link: <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.1087.9267&rep=rep1&type=pdf>

Martínez-Álvarez JC, Camacho-Angulo F, Bojórquez-Armenta, YDJ, Sánchez-Soto B, Cordero-Ramírez JD, Romero-Urías CDLÁ, y Mora-Romero GA. 2021.

Inhibitory effect of antagonistic bacteria against *Sclerotium rolfsii*, causal agent of southern blight of common bean. *Revista mexicana de fitopatología*, 39(1), 207-218.

Méndez P y Inostroza J. 2009. Manual de papa para la Araucanía: Manejo y Plantación. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Ministerio de Agricultura Centro Regional Carillanca. Boletín # 194. Temuco, Chile. 166p.

Mohamed AB, Aly MMES y El-Sharkawy RM. 2021. Antifungal activity of bioagents and plant extracts against certain fungal diseases of potatoes. *Journal of Phytopathology and Pest Management*, 29-45.

Montenegro SP y Osario JA. 2019. Servicios ecosistémicos: Un enfoque introductorio con experiencias del occidente colombiano. Pp: 201-203. In : Moraes J, Prada Y, Padilla J, Montenegro SP, Fonseca MR, Mosquera RA, y Pulido SY (eds). *Control biológico*. Sello editorial UNAD. Colombia, Bogota, 269p.
doi: <https://doi.org/10.22490/9789586516358>

Mustafa Y. 2018. Nematodes affecting potato and sustainable practices for their management. Pp 107-118. In: Lima FS, Mattos VS, Silva ES, Carvalho MA, Teixeira RA, Silva JC and Correa VR (eds.). *Potato: From incas to all over the world*. Intech open. First edition. Croatia. 150p.

Nieto-Jacobo MF, Steyaert JM, Salazar-Badillo FB, Nguyen DV, Rostás M, Braithwaite M y Mendoza-Mendoza A. 2017. Environmental growth conditions of *Trichoderma spp.* affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. *Frontiers in plant science*, 102.

Negrillo AMC, González AP y Fernández JJF. 2009. El moho blanco: una enfermedad común en el cultivo de Faba Granja Asturiana. *Tecnología agroalimentaria: Boletín informativo del SERIDA*, (6), 7-9.

- Liu D, Anderson NA, Kinkel LL. 1995. Biological control of potato scab in the field with antagonistic *Streptomyces scabies*. *Phytopathology*, 85(7), 827-831.
- Lynch JM. 1990. The rhizosphere. Willey–Interscience, Chichester, Inglaterra.
- Lynch JM y de Leij F. 2012. Rhizosphere. In: eLS. John Wiley y Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000403.pub2
- Mullen J. 2001. Southern blight, Southern stem blight, White mold. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2001-0104-01.
- Niem J, Gundersen B y Inglis DA. 2013. Effects of Soil Flooding on the Survival of Two Potato Pathogens, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Verticillium dahliae*. *American Journal of Potato Research*, 90(6), 578–590. doi:10.1007/s12230-013-9332-1
- Ojaghian S, Qiu W y Zhang, L. 2020. Application of Bacterial Biocontrol Agents and Different Chemicals against Potato White Mold. *Journal of agricultural science and technology*, 22(6), 1613-1627.
- Ojaghian MR, Zhang JZ, Zhang F, Qiu W, Li XL, Xie GL y Zhu SJ. 2016. Early detection of white mold caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in potato fields using real-time PCR. *Mycological progress*, 15(9), 959–965. Doi:10.1007/s11557-016-1222-8
- Ojaghian MR. 2009. First report of *Sclerotinia sclerotiorum* on potato plants in Iran. *Australasian plant disease notes*, 4(1), 39-41. Doi: <https://doi.org/10.1071/DN09016>
- Pérez-Moreno L, Belmonte-Vargas JR, Núñez-Paleniús HG, Guzmán-Mendoza R y Mendoza-Celedón B. 2015. Sensibilidad *in vitro* de dos especies de *Sclerotinia* spp. y *Sclerotium cepivorum* a agentes de control biológico y fungicidas. *Revista mexicana de fitopatología*, 33(2), 256-267.
- Punja ZK y Damiani A. 1996. Comparative growth, morphology, and physiology of three *Sclerotium* species. *Mycologia*, 88(5), 694-706. DOI: <https://doi.org/10.1080/00275514.1996.12026706>

- Purdy L. 1979. *Sclerotinia sclerotiorum*: History, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. *Phytopathology*, 69(8), 875-880.
- Rambaut A. 2010. FigTree v1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Roca LF, Raya MC, Luque F, Agustí-Brisach C, Romero J y Trapero A. 2016. First report of *Sclerotium rolfsii* causing soft rot of potato tubers in Spain. *Plant disease*, 100(12), 2535-2535.
- Rojas-Solís D, Contreras-Pérez M y Santoyo G. 2013. Mecanismos de estimulación del crecimiento vegetal en bacterias del género *Bacillus*. *Biológicas*, 15(2), 36-41.
- Rodríguez-Campos E y Parga-Torres VM. 2008. Evaluación de fungicidas químicos y biológicos para el control de enfermedades en el cultivo de papa. *Campo Experimental Saltillo INIFAP.*, México. 68p.
- Reichert I y Palti J. 1967. Prediction of plant disease occurrence a pathogeographical approach. *Mycopathologia et mycologia applicata*, 32(4), 337-355.
- Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Wei HX, Paré PW y Kloepper JW. 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the national academy of sciences*, 100(8), 4927-4932.
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER). 2020. La papa un alimento con historia y cultura. <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/la-papa-un-alimento-con-historia-y-cultura> (Consulta, mayo 2021).
- Santoyo G, Orozco-Mosqueda MDC y Govindappa M. 2012. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Science and Technology*, 22(8), 855-872.

- Salkowski E. 1885. Ueber das verhalten der skatolcarbonsäure im organismus. *Bchm*, 9(1), 23–33. doi:10.1515/bchm1.1885.9.1.23
- Sasirekha B y Srividya S. 2016. Siderophore production by *Pseudomonas aeruginosa* FP6, a biocontrol strain for *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum gloeosporioides* causing diseases in chilli. *Agriculture and natural resources*, 50(4), 250-256.
- Scherwinski K, Grosch R y Berg G. 2008. Effect of bacterial antagonists on lettuce: active biocontrol of *Rhizoctonia solani* and negligible, short-term effects on nontarget microorganisms. *FEMS Microbiology ecology*, 64(1), 106-116.
- Schoch CL, Ciufu S, Domrachev M, Hotton CL, Kannan S, Khovanskaya R y Karsch-Mizrachi I. 2020. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database*, 2020. doi:10.1093/database/baaa062
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2019. La papa, el cuarto cultivo de mayor producción en el mundo. <https://www.gob.mx/siap/es/articulos/la-papa-el-cuarto-cultivo-de-mayor-produccion-en-el-mundo?idiom=es> (consulta, mayo 2021)
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2021. Avance de Siembras y Cosechas. https://nube.siap.gob.mx/avance_agricola/ (consulta, mayo 2021)
- Shi T, Reeves RH, Gilichinsky DA and Friedmann EI. 1997. Characterization of viable bacteria from Siberian permafrost by 16S rDNA sequencing. *Microbial ecology* 33:169-179. <https://doi.org/10.1007/s002489900019>.
- Spooner DM y Salas A. 2006. Structure, biosystematics, and genetic resources. pp. 1-39. En: Gopal, J. y S.M.P. Khurana (eds.). *Handbook of potato production, improvement, and postharvest management*. Haworth's Press, Inc., Binghampton, NY.

- Tamura K. 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution* 9:678-687.
- Tamura K, Stecher G y Kumar S. 2021. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- Trujillo I, Díaz A, Hernández A y Heydrich M. 2007. Antagonismo de cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia* contra hongos fitopatógenos del arroz y el maíz. *Revista de protección vegetal*, 22(1), 41-46.
- Tsrer L. 2010. Biology, epidemiology and management of *Rhizoctonia solani* on potato. *Journal of phytopathology*, 158(10), 649-658.
- Van den Boogert PHJF y Luttikholt AJG. 2004. Compatible Biological and Chemical Control Systems for *Rhizoctonia solani* in Potato. *European journal of plant pathology*, 110(2), 111–118. doi:10.1023/b:ejpp.0000015325.332
- Valencia E, Villegas J, Sánchez JM, Peña JJ y Farías R. 2005. Inhibición de *Fusarium oxysporum* por cepas mutantes de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 incapaces de producir sideróforos. *Terra latinoamericana*, 23(1), 81-88.
- Virgen-Calleros G, Olalde-Portugal V y Carling DE. 2000. Anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* on potato in Central Mexico and potential for biological and chemical control. *American journal of potato research*, 77(4), 219-224. DOI <https://doi.org/10.1007/BF02855789>
- Wang Y, Brown HN, Crowley DE y Szaniszló PJ. 1993 Evidence for direct utilization of ferrioxamine B in axenically-grown cucumber. *Plant cell environ.* 16:579–585.

- White TJ, Bruns T, Lee SJWT y Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.
- Wilson CL, Wisniewski ME, Biles CL, McLaughlin R, Chalutz E y Droby, S. 1991. Biological control of post-harvest diseases of fruits and vegetables: alternatives to synthetic fungicides. *Crop protection*, 10(3), 172-177.
- Woodhall JW, Lees AK, Edwards SG y Jenkinson P. 2008. Infection of potato by *Rhizoctonia solani*: effect of anastomosis group. *Plant pathology*, 57(5), 897-905.
- Yu SM y Lee YH. 2015. Genes involved in nutrient competition by *Pseudomonas putida* JBC17 to suppress green mold in postharvest satsuma mandarin. *Journal of basic microbiology*, 55(7), 898-906.

11. ANEXOS

Anexo 1. Agar nutritivo

Ingredientes por litro:

Peptona	5 g
Extracto de carne	3 g
Agar.....	15 g
Agua destilada.....	1 000 mL

Preparación:

Se disuelven 23 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada, se deja remojar de 10 a 15 minutos, se calienta agitando frecuentemente y se hierve durante un minuto. Se esteriliza a 14.7 lb de presión durante 20 min, se deja enfriar a 40-45 °C y se bacía en cajas Petri de 6 y 9 cm de diámetro, dependiendo la necesidad.

Anexo 2. LB-Agar-(LENNOX)

Ingredientes por litro:

Agar bacteriológico	15 g
Triptona.....	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio	5 g
Agua destilada.....	1 000 mL

Preparación:

Se disuelven 35 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada, se mezcla, se calienta agitando frecuentemente y se hierve durante un minuto. Se esteriliza a 14.7 lb de presión durante 20 min, se deja enfriar a 40-45 °C y se vacía en cajas Petri de 6 y 9 cm de diámetro, dependiendo la necesidad.

Anexo 3. Papa Dextrosa Agar (PDA)-BD Bioxon®

Ingredientes por litro:

Agar bacteriológico	15 g
Almidón de Papa	200 g
Dextrosa	20 g
Agua destilada.....	1 000 mL

Preparación:

Se disuelven 39 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada, se deja remojar de 10 a 15 minutos, se calienta agitando frecuentemente y se hierve durante un minuto. Se esteriliza a 14.7 lb de presión durante 20 min, se deja enfriar a 40-45 °C y se bacía en cajas Petri de 6 y 9 cm de diámetro, dependiendo la necesidad.

Anexo 4. Agar Pikovskaya

Ingredientes por litro:

Agar bacteriológico	5 g
Fosfato de calcio	5 g
Sulfato de amonio	5 g
Cloruro de potasio	0.2 g
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.1 g
Sulfato de manganeso dihidratado	0.0001 g
Sulfato ferroso heptahidratado	0.0001 g
Glucosa.....	10 g
Agua destilada.....	1000 mL

Preparación:

Se disuelven 35 g todos los componentes en un litro de agua destilada, se mezcla, se calienta agitando frecuentemente y se hierve durante un minuto. Se esteriliza a 14.7 lb de presión durante 20 min, se deja enfriar a 40-45 °C y se vacía en cajas Petri de 9 cm de diámetro.

Anexo 5. Medio O´CAS

Ingredientes para 200 mL:

Agarosa	2 g
Piperazina-N,N'-bis(ácido2-etanosulfónico) (PIPES).....	6.048 g
Ácido clorhídrico (HCl)10 mM	10 mL
Cromo Azurol S (CAS).....	30 mg
Cloruro férrico.....	2.7 mg
Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA).....	36 mg
Agua destilada.....	200 mL

Preparación:

Se esteriliza a 14.7 lb de presión durante 20 min, se deja enfriar a 40-45 °C y se vacía en cajas Petri de 6 y 9 cm de diámetro, dependiendo la necesidad.

Se realizaron dos soluciones:

1) La solución de PIPES (6.048 g de PIPES-Sigma, Cat. P6757, en 180 mL de H₂O, pH 5.8)

2) La solución de colorante azul, esta solución es una mezcla de tres soluciones diferentes:

Solución A: 30 mg de CAS (Pfaltz & Bauer, Cat. C21430) en 25 mL de H₂O;

Solución B: 2.7 mg de cloruro férrico (Faga Lab, Cat. 2143) en 10 mL de ácido clorhídrico 10 mM (J. T. Baker, Cat. 9535-02);

Solución C: 36 mg de HDTMA (Sigma, Cat. H6269) en 40 mL de H₂O. Las tres soluciones se mezclan en las siguientes proporciones: a los 25 mL de la solución A, se le añaden 4.5 mL de la solución B y 40 mL de la solución C para un volumen final de 69.5 mL). Ambas soluciones se esterilizaron a 121 °C, 14.7 lb de presión por 20 min. Posteriormente, a la solución de PIPES se le agregó 20 mL de la solución de

colorante azul, finalmente se añadió agarosa al 1 % (p/v) (Nara Biotec, Cat. NR-90125) como agente gelificante y se calentó hasta disolverla.