

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN**  
**PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL**  
**UNIDAD SINALOA**



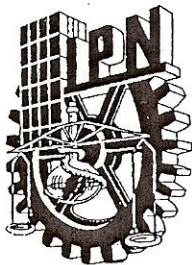
Efectividad de aislados microbianos  
como agentes de biocontrol de *Sclerotinia*  
*sclerotiorum* en frijol

**T E S I S**

Que para obtener el grado de:  
Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente

Presenta:  
Lucila Guadalupe Sotomayor García

Guasave, Sinaloa, octubre de 2011



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de GUASAVE, SINALOA el día 20 del mes SEPTIEMBRE del año 2011, el (la) que suscribe LUCILA GUADALUPE SOTOMAYOR GARCÍA alumno (a) del Programa de MAESTRÍA EN RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE con número de registro B091715, adscrito a, CIIDIR-SINALOA manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de DRA. MELINA LÓPEZ MEYER y cede los derechos del trabajo intitulado EFFECTIVIDAD DE AISLADOS MICROBIANOS COMO AGENTES DE BIOCONTROL DE *Sclerotinia sclerotiorum* EN FRIJOL, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección lucy\_5-8@hotmail.com Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

*Lucila GPe S. G.*  
Lucila Guadalupe Sotomayor García

Nombre y firma



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

GUASAVE, SINALOA a 20 de SEPTIEMBRE del **2011**

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-SINALOA en su sesión ORDINARIA No. 8 celebrada el día 15 del mes de AGOSTO conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

**SOTOMAYOR**

Apellido paterno

**GARCÍA**

Apellido materno

**LUCILA GUADALUPE**

Nombre (s)

Con registro: 

B	0	9	1	7	1	5
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:

**EFFECTIVIDAD DE AISLADOS MICROBIANOS COMO AGENTES DE BIOCONTROL DE *Sclerotinia sclerotiorum* EN FRIJOL**

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

**ENSAYOS DE EFFECTIVIDAD DE LOS AISLADOS EN TEJIDO FLORAL Y HOJA.**

**EFFECTO DE LOS AISLADOS SOBRE LA GERMINACIÓN DE ESCLEROCIOS EN SUELO.**

**EFFECTO DE LOS AISLADOS EN CAMPO DE CULTIVO DE FRIJOL.**

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:

**DRA. MELINA LÓPEZ MEYER Y M.C. JESÚS RICARDO CAMACHO BÁEZ**

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en:

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA**

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

Dra. Melina López Meyer

Aspirante

**Lucila GPe S. G.**

Lucila Guadalupe Sotomayor García

M.C. Jesús Ricardo Camacho Báez

Presidente del colegio

Dr. Jorge Montiel Montoya



**CIIDIR - IPN**  
UNIDAD SINALOA  
DIRECCION





# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de GUASAVE, SINALOA siendo las 12:30 horas del día 20 del mes de SEPTIEMBRE del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-SINALOA para examinar la tesis titulada:

**EFFECTIVIDAD DE AISLADOS MICROBIANOS COMO AGENTES DE BIOCONTROL DE *Sclerotinia sclerotiorum* EN FRIJOL**

Presentada por el alumno:

**SOTOMAYOR**  
Apellido paterno

**GARCÍA**  
Apellido materno

**LUCILA GUADALUPE**  
Nombres (s)

Con registro: 

B	0	9	1	7	1	5
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

**MAESTRÍA EN RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. Melina López Meyer

M.C. Jesús Ricardo Camacho Báez

Dr. Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza

Dra. Claudia Castro Martínez

Dr. Cesar Marcial Escobedo Bonilla

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Jorge Montiel Montoya



**CIIDIR - IPN**  
UNIDAD SINALOA  
DIRECCION

El trabajo de tesis se desarrolló en el Departamento de Biotecnología Agrícola del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Sinaloa del Instituto Politécnico Nacional (IPN) bajo la dirección de la Dra. Melina López Meyer y el Maestro Jesús Ricardo Camacho Báez. El presente trabajo fue apoyado económicamente a través proyectos del CECYT-SIN y SIP-IPN. La alumna Lucila Guadalupe Sotomayor García agradece a CONACYT por la beca de maestría (registro 332310), así como a PIFI-IPN por el apoyo otorgado.

“Soy de los que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.”

**Marie Curie**

## DEDICATORIA

A mis padres:

**Lucila García y Pablo Sotomayor**

Su apoyo, amor  
y paciencia  
son el motor de mi  
existencia

Gracias

## **AGRADECIMIENTOS**

Hoy expreso mi agradecimiento a todas aquellas personas que me brindaron su colaboración, sus conocimientos, su ayuda incondicional y por sobre todo su amistad durante la realización de esta investigación. Este es el esfuerzo de un gran equipo de trabajo, a cada uno de ellos: Gracias.

Primero agradezco a Dios que me puso los medios para entrar a la Maestría; me dio la fortaleza espiritual y física y fue su voluntad que yo alcanzara esta meta.

A mi papá quien siempre está pendiente de encomendarme en sus oraciones y de pedir por mí, para que cada día sea mejor, no solo en lo que hago como trabajo, sino de ser mejor como persona.

A mi mamá por siempre estar ahí apoyándome, por enseñarme que no hay límites, que lo que me proponga lo puedo lograr y que solo depende de mí.

A mis hermanos, especialmente a mi hermana mayor Alejandra por tu apoyo y consejos siempre, al resto de mis hermanos por ayudarme e impulsarme para llegar a la meta gracias Pablo, Jesús y Valentín mi hermano menor. Gracias también a mi hermana Kany que aunque no esté con nosotros me echa la mano desde arriba.

Mi enorme y sincero agradecimiento a mis directores de tesis, de todo corazón gracias Dra. Melina López Meyer por todo el tiempo que me ha brindado (casi 6 años, jaja), por sus sugerencias e ideas de las que tanto provecho he sacado, por guiarme, por el respaldo, la amistad y por todo el apoyo otorgado en algunos momentos difíciles, gracias Dra. por ser una gran persona.

Mi más respetuoso agradecimiento al M.C. Jesús Ricardo Camacho Báez por su valiosa asesoría en mi tesis, apoyo, amistad en todo momento, y el apoyo



económico de la beca PIFI para la realización de mi tesis, pero sobre todo gracias por aguantarme.

A mi comité revisor al Dr. Ignacio Maldonado Mendoza por sus atinadas sugerencias durante mi tesis, por su invaluable apoyo, la confianza otorgada, pero sobre todo mil gracias por permitirme ser parte una vez más de su grupo de trabajo.

A la Dra. Claudia Castro Martínez por la gran aportación de su conocimiento en parte importante de mi tesis, por su disposición siempre para contribuir en el trabajo de tesis, por la confianza y amistad otorgada, y sobre todo aceptar formar parte de mi comité en la última etapa de mi tesis.

Al Dr. César Escobedo Bonilla por su valiosa aportación y sugerencias en los análisis estadísticos, gracias por la ayuda brindada en todo momento, por tenerme paciencia y siempre estar dispuesto a proporcionarme su valioso conocimiento.

Agradezco también a un miembro de mi comité que formó parte importante durante la realización de este trabajo al Dr. Javier Orduña Rojas<sup>†</sup> un científico que se fue al cielo, gracias por haber formado parte de mi comité y sus incansables enseñanzas.

A mis preciadas amigas que estuvieron formando parte de esta etapa, a Raquel López, Judith Almaraz, Fátima Camacho, Edalí Quintero, y Paola Valenzuela gracias por sus consejos, por escucharme, por aguantarme, por ayudarme en mis experimentos, ser cómplices en muchas situaciones y por hacer de esta Maestría algo más divertido y emocionante.

A mis amigos que de alguna u otra manera formaron pieza importante en el transcurso de dicha etapa a mi amiga Bertha Leal, porque a pesar de que no estuvimos cerca siempre estuviste al pendiente acordándote de mi; gracias por tu

amistad, al resto de mis queridos amigos Lupita Flores, Lynnette Luque, Daniel Torres (casi mi hermano) y Juan José Pérez.

A mis compañeros de los laboratorios Planta-Microorganismo y Ecología Molecular de la Rizosfera: a la M.C Odet López por ser parte importante de este proyecto, proporcionar el aislado OX32 para la prueba de campo, ayudarnos mutuamente en los experimentos y ser compañera cómplice, a la M.C. Claudia M. Douriet por ayudarme en el experimento en campo y ensayos en flor cuando más lo necesitaba, a la M.C. Arlene Mora compañera de laboratorio, gracias por tu apoyo en el experimento de campo y asesoría de cuanta cosa se me ocurría preguntarte, a mi compañero M.C. Hugo Galindo por su apoyo en el paquete SAS, a los estudiantes tesistas de licenciatura Isela Rangel y Hugo Michel por su apoyo valioso en algunos experimentos y por último, pero no menos importante el resto de mis compañeros y amigos: al M.C. Luis Daniel R., M.C. Juan Carlos M., Alicia F., Alejandra G., M.C. Damián Cordero (proporcionar los aislados 105 y 150), Alejandro Figueroa (apoyo en la técnica de WGA), M.C. Karla M., Isela L., Glenda L., Dra. María Elena, Alejandra M. y Martín L. Gracias a Fany, Andrés, Eymer, Jesús, Monse, Dra. Gaby, Dra. Maribel y Dr. Sergio (gracias LAF, por recibirme siempre).

Gracias también a los 26 compañeros que formaron parte de la generación 2009-2011 fue un placer compartir esta etapa con ustedes.

Mi agradecimiento a las personas que me apoyaron en el experimento en campo, agradezco a los trabajadores del CIIDIR Don Eustaquio y René, a los estudiantes de licenciatura del Departamento de Nemátodos.

A algunos de los administrativos de este Centro de Investigación, amablemente agradezco a la Lic. Dorín Ortiz Félix, al Lic. Roberto Urías y a Celestino Vargas por su tenacidad, agilidad y paciencia en todo trámite durante mi tesis.

Se agradece enormemente al M.C. Álvaro Paz Trueba quien prestó el Campo Experimental Miguel Leyson para la realización de la prueba en campo, así como material y maquinaria proporcionada para las labores del cultivo.

Agradezco muy especialmente al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional del IPN unidad Sinaloa y al departamento de Biotecnología Agrícola por la oportunidad brindada para cursar la Maestría, así como para la realización de este trabajo de tesis, y el apoyo recibido durante los largos y fructíferos períodos que he desarrollado en ellos mi labor investigadora.

Se agradece también el importante apoyo económico del CONACYT, así como también el apoyo PIFI, por la beca otorgada durante la Maestría, la cual es pieza importante para que un estudiante logre realizar una Maestría.

A todos: ¡muchas gracias!

<b>RESUMEN</b> .....	IV
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	V
<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	VII
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	3
2.1 Frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) .....	3
2.1.1 El cultivo de frijol y su importancia. ....	3
2.1.2 producción de frijol. ....	3
2.1.3 Características agronómicas del cultivo. ....	4
2.2 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . ....	5
2.2.1 Descripción general de <i>S. sclerotiorum</i> . ....	5
2.2.2 Morfología de <i>S. sclerotiorum</i> . ....	6
2.2.3 Esclerocios. ....	6
2.2.4 Reproducción de apotecios. ....	6
2.2.4 Sistemática de <i>S. sclerotiorum</i> . ....	7
2.2.5 Patogenicidad. ....	8
2.2.7 Ciclo de infección y sintomatología. ....	9
2.3 Métodos de control del Moho Blanco. ....	11
2.3.1 Control físico. ....	11
2.3.2 Control mecánico. ....	11
2.3.3 Control químico. ....	12
2.3.4 Control biológico. ....	12
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	15
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	16
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	17
5.1 Objetivo general. ....	17
5.2 Objetivos específicos .....	17

<b>6. METODOLOGÍA</b> .....	18
6.1 Estrategia general de trabajo .....	18
6.2 Resiembra de los aislados .....	19
6.2.1 Cinética de crecimiento de los aislados .....	19
6.2.2 Cuantificación de UFC/ml de los aislados .....	20
6.3 Desinfección de esclerocios .....	20
6.3.1 Producción de apotecios .....	20
6.3.2 Cuantificación de ascosporas .....	21
6.4 Pruebas en tejido floral .....	21
6.4.1 Cuantificación de la infección en tejido floral <i>in vitro</i> .....	22
6.5 Pruebas de antagonismo de micelio en hojas de frijol <i>in vitro</i> .....	23
6.6 Pruebas de antagonismo de esclerocios en suelo <i>in vitro</i> .....	24
6.5.1 Experimento 1 .....	24
6.5.2 Experimento 2 .....	26
6.6. Análisis físico-químicos de los suelos .....	26
6.8 Fase experimental en cultivo de frijol en campo .....	27
6.8.1 Selección de la unidad de estudio .....	28
6.8.2 Análisis físico-químicos del suelo del cultivo de frijol .....	28
6.8.3 Preparación del terreno, diseño experimental y método de siembra .....	28
6.8.4 Selección de semilla .....	29
6.8.5 Marcaje de parcelas experimentales .....	29
6.8.6 Labores de cultivo .....	30
6.8.7 Aplicación de los aislados antagonistas .....	31
6.8.8 Medición de daños en plantas .....	33
6.8.9 Medición de rendimiento .....	34

6.8.10 Medición del porcentaje de humedad en granos. ....	34
6.8.11 Análisis estadístico. ....	34
6.8 Fase experimental en cultivo de frijol en campo. ....	42
6.5 Pruebas de antagonismo de esclerocios en suelo in vitro. ....	45
<b>7. RESULTADOS. ....</b>	<b>35</b>
7.1 Cinética de crecimiento bacteriano. ....	35
7.2 Cuantificación de UFC/ml de los aislados ....	36
7.3 Ensayos en tejido floral. ....	37
7.4 Efecto de los aislados antagonistas sobre la infección miceliogénica en hojas escindidas de frijol. ....	40
7.4.1 Experimento dosis-respuesta. ....	40
7.5 Efecto de los aislados en suelos. ....	43
7.5.1 Experimento 1. ....	43
7.5.2 Experimento 2. ....	44
7.6 Propiedades físico-químicas de los suelos probados in vitro. ....	46
7.7 Ensayo del efecto de los aislados a nivel de campo. ....	47
7.7.1 Recolección de muestras de suelo del cultivo experimental. ....	47
7.7.2 Propiedades físico-químicas del suelo del cultivo de frijol. ....	48
7.7.3 Porcentaje de germinación de plantas. ....	49
7.7.4 Efecto de los aislados en el desarrollo de las plantas de frijol. ....	49
7.7.5 Efecto de los aislados en la incidencia y severidad de la enfermedad. ....	50
7.7.6 Cosecha del frijol. ....	52
7.7.7 Medición de humedad y rendimiento de granos de frijol. .	52

<b>8. DISCUSIÓN.</b> .....	54
<b>9. CONCLUSIONES.</b> .....	60
<b>10. LITERATURA CITADA.</b> .....	61
<b>11. ANEXOS.</b> .....	69
<b>RECOMENDACIONES.</b> .....	73

## **INDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Estructura de un apotecio mostrando las ascas donde se depositan las ascosporas. ....	7
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida de <i>S. sclerotiorum</i> en frijol. ....	11
<b>Figura 3.</b> Estrategia general de trabajo. ....	18
<b>Figura 4.</b> Diseño del experimento en el campo de cultivo de frijol. ....	30
<b>Figura 5.</b> Marcaje del terreno experimental. ....	30
<b>Figura 6.</b> Aplicación de los aislados antagonistas. ....	33
<b>Figura 7.</b> a) Evaluación de la incidencia y severidad de moho blanco en las plantas de frijol. b) Planta con nivel 3 de severidad a los 82 días y c) la misma planta a los 109 días con 7 de severidad. ....	34
<b>Figura 8.</b> Cinética de crecimiento de los aislados antagonistas 105 y 150 por absorbancia a 595 nm. ....	35
<b>Figura 9.</b> Curva de concentración en UFC/ml del aislado 105 durante el ciclo de crecimiento. ....	36
<b>Figura 10.</b> Curva de concentración en UFC/ml del aislado 150. ....	37
<b>Figura 11.</b> Unidades arbitrarias de fluorescencia a 495 nm de homogenados de flores tratadas con antagonistas y ascosporas de <i>S. sclerotiorum</i> a	39



diferentes horas post infección. . . . .	
<b>Figura 12.</b> Efecto del aislado 105 (a) y el control de agua (b) sobre hojas infectadas con tejido micelial. . . . .	41
<b>Figura 13.</b> Promedio de esclerocios germinados miceliogénicamente. . . . .	45
<b>Figura 14.</b> Ensayo a nivel laboratorio de esclerocios en suelos agrícolas contenidos en recipientes. . . . .	46
<b>Figura 15.</b> Severidad de las plantas, medida de acuerdo a la escala establecida por Yang, (2009) . . . . .	51

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Tratamientos probados en los experimentos de flor por el método de cuantificación de la infección con WGA-488. . . . .	22
<b>Tabla 2.</b> Tratamientos probados en los ensayos en hojas de frijol. . . . .	23
<b>Tabla 3.</b> Tratamientos probados en el experimento 1 de antagonismo de los aislados 105, y 150 en tres diferentes suelos. Suelo 1: Campo Sr Enrique Norzagaray, Suelo 2: Campo experimental Miguel Leyson, Suelo 3: Campo INIFAP-CEVAF. . . . .	25
<b>Tabla 4.</b> Tratamientos probados en el experimento 2 de antagonismo de los aislados 105, 150 y OX32 en tres diferentes suelos . . . . .	26
<b>Tabla 5.</b> Tratamientos utilizados en campo. . . . .	31
<b>Tabla 6.</b> Promedio de los valores de fluorescencia a 495 nm de homogenados de flores tratadas con aislados bacterianos potencialmente antagonistas. . . . .	38
<b>Tabla 7.</b> Efecto de los aislados 105 y 150 sobre la infección miceliogénica en hojas desprendidas de frijol a diferentes concentraciones. . . . .	41
<b>Tabla 8.</b> Efecto de los aislados 105 y 150 sobre la infección miceliogénica en hojas desprendidas de frijol a diferentes concentraciones. . . . .	42

<b>Tabla 9.</b> Efecto de los aislados sobre esclerocios germinados carpotógicamente (producción de apotecios) . . . . .	44
<b>Tabla 10.</b> Análisis físico-químicos de los tres suelos agrícolas utilizados en el ensayo de germinación de esclerocios. . . . .	47
<b>Tabla 11.</b> Coordenadas geográficas de los seis puntos de muestreo. . . . .	48
<b>Tabla 12.</b> Resultados de los análisis físico-químicos del suelo experimental del cultivo. . . . .	48
<b>Tabla 13.</b> Promedio del número de vainas y flores durante la etapa del cultivo. . . . .	49
<b>Tabla 14.</b> Análisis estadístico del efecto de los aislados sobre la incidencia y severidad de moho blanco en las plantas de frijol en campo. . . . .	50
<b>Tabla 15.</b> Análisis estadístico del efecto de los aislados sobre la incidencia y severidad de moho blanco en las plantas de frijol en campo. . . . .	50
<b>Tabla 16.</b> Rendimiento de frijol obtenido de cada parcela útil experimental y porcentaje de humedad en granos de frijol. . . . .	53

## RESUMEN

El cultivo de frijol en México ocupa el segundo lugar en importancia después del maíz. Este cultivo es susceptible de ser atacado por diversas enfermedades causadas ya sea por hongos, virus o bacterias, lo cual causa mermas importantes en la productividad agrícola. *Sclerotinia sclerotiorum* es un hongo del suelo que causa la enfermedad conocida como moho blanco en frijol y se caracteriza por germinar micelio y carpogénicamente. De manera convencional, este hongo es combatido con fungicidas sintéticos; sin embargo, estrategias alternativas, tales como el uso de microorganismos antagonistas puede resultar beneficioso a largo plazo ya que reduciría el riesgo de desarrollo de resistencia al patógeno, así como el efecto sobre el ambiente y la salud humana. Trabajos preliminares en el laboratorio de Interacción microorganismo-planta del CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa permitieron identificar tres aislados microbianos nativos (105, 150 y OX32) con propiedades antagonistas a *S. sclerotiorum* bajo condiciones *in vitro*. En el presente trabajo se evaluó el efecto de estos aislados antagonistas sobre la infección por *S. sclerotiorum* de hojas desprendidas y en flores de frijol, así como en la germinación carpogénica de esclerocios. Los resultados indican que el aislado OX32 inhibe la infección por ascosporas en flores de frijol y la germinación miceliogénica de esclerocios en suelo; los aislados 105 y 150 inhibieron el crecimiento micelial en hojas de frijol y la producción de apotecios en suelo de los esclerocios tratados. Con base en estos antecedentes, el objetivo de esta tesis fue probar el efecto de los aislados microbianos seleccionados en la incidencia de moho blanco en un cultivo de frijol bajo condiciones en campo. Sin embargo, en el bioensayo en campo realizado no se logró evaluar de manera adecuada la eficacia de los aislados sobre la enfermedad de moho blanco en las plantas de frijol bajo condiciones de campo debido a que la enfermedad se manifestó en niveles de incidencia muy bajos, por lo que estas pruebas deberán ser llevadas a cabo en trabajos posteriores. El tratamiento basado en la aplicación de antagonistas nativos en campos agrícolas con incidencia de moho blanco podría llegar a ser una estrategia útil para inhibir la producción de apotecios con potencial de ser aplicado para controlar la dispersión del patógeno y por lo tanto de la enfermedad en la región.

## ABSTRACT

Common bean is the second crop in importance in Mexico. This crop is susceptible to be attacked by various plant pathogens such as fungi, viruses or bacteria, which can cause significant losses in agricultural productivity. *Sclerotinia sclerotiorum* is a soil borne fungus that causes the disease known as white mold in common bean, and can germinate myceliogenic and carpogenically, depending on the environmental conditions. Conventionally, this fungus is controlled with synthetic fungicides. Alternative strategies, such as the use of antagonistic microorganisms may be beneficial in the long term since the risks of developing resistance to the pathogen is reduced, as well as the negative effects on the environment and human health. Preliminary work in our laboratory identified three native microbial isolates (105, 150 and OX32) which showed antagonist properties to *S. sclerotiorum in vitro* conditions. In this study, we evaluated the effect of these antagonists on the infection of *S. sclerotiorum* in common bean detached leaves and flower, as well as carpogenic germination of sclerotia. The results indicate that OX32 isolate inhibited infection by ascospores in common bean flowers and myceliogenic germination of sclerotia in soil, 105 and 150 isolates inhibited mycelial growth in bean leaves and the production of apothecia from sclerotia in treated soils. Based on this work, one of the objectives of the present study was to test the effect of selected microbial isolates on the incidence of white mold in bean crop in field conditions. However, it was not possible to adequately assess the effectiveness of the different isolates on the incidence of white mold disease under field conditions since the disease was poorly manifested during the bioassay. Additional work will be needed to know how effective the bacteria isolates are in the field. The use of native antagonists could become a useful strategy to control *S. sclerotiorum* spreading.

## GLOSARIO

**Absorbancia:** cantidad de luz que absorbe una muestra a cierta longitud de onda.

**Antagonista:** microorganismo que tiene la capacidad de ejercer un efecto de control biológico sobre un patógeno de interés.

**Apotecio:** cuerpo fructífero que implica la existencia de la fase sexual del hongo, dentro de los cuales se encuentra el inóculo primario (ascosporas).

**Asca:** células en forma de saco que contiene las ascosporas.

**Ascospora:** esporas sexuales, se producen en las ascas.

**Aspersión:** esparcimiento de agua u otro líquido en forma de pequeñas gotas.

**Benomilo:** producto químico comercial con efecto fungicida para el control de enfermedades en planta.

**Biocolonizer:** producto comercial de biocontrol a base de *Bacillus subtilis*.

**Carpogénicamente:** reproducción sexual del hongo por ascosporas.

**Diáuxico:** tipo de crecimiento microbiano bifásico donde dos sustratos diferentes pueden ser utilizados como fuente de carbono.

**Esclerocio:** estructura de resistencia y fuente de inóculo del hongo, son de color negro, micelio agrupado, compactado y endurecido con capas gruesas de melanina que pueden permanecer inactivos en el suelo por años.

**Hemolíticas:** son las bacterias que producen hemólisis en un medio de cultivo que contenga sangre. Si son hemolíticas se dividen en alfa y beta hemolíticas; estas producen una hemólisis parcial o completa, respectivamente.

**Hifas:** son elementos filamentosos cilíndricos característicos de la mayoría de los hongos.

**Incidencia:** es el número de casos nuevos de una enfermedad en una población determinada y en un periodo determinado.

**Infección:** es el proceso en el que el patógeno se pone en contacto con las células del hospedador de las que posteriormente va a alimentarse.

**Inoculación:** es el proceso mediante el cual un patógeno y su hospedante entran en contacto.

**Inóculo:** es cualquier parte del patógeno que puede producir infección.

**Micelio:** conjunto o masa de hifas.

**Miceliogénicamente:** reproducción asexual del hongo por micelio.

**Moho blanco:** es una enfermedad endémica del frijol en el norte de Sinaloa, causada por el hongo *Sclerotinia sclerotiorum*, y cuya incidencia y severidad varían en cada ciclo agrícola, en función de la humedad invernal.

**Necrótrofo:** organismo que se alimenta de tejidos u organismos muertos.

**Parcela:** pequeña porción o parte de un terreno.

**Quitina:** es uno de los componentes principales de las paredes celulares de los hongos, de los artrópodos y algunos otros animales.

**Rizosfera:** es una parte del suelo inmediata a las raíces donde tiene lugar una interacción dinámica de la planta con los microorganismos y múltiples interacciones entre ambos.

**Severidad:** el grado de daño ocasionado por algún patógeno sobre la planta.

**Síntomas:** conjunto de cambios observables que se manifiestan en la apariencia de las plantas infectadas.

**UFC/ml:** Unidades Formadoras de Colonias por mililitro.

**WGA:** aglutinina del germen del trigo, ésta es una lectina que reconoce las subunidades de quitina en la pared de los hongos. Cuando se acopla a fluoróforos como por ejemplo, Alexa flúor 488 nm, puede ser usada como un marcador para teñir fluorescentemente las paredes de los hongos.



## 1. INTRODUCCIÓN

Sinaloa es una de las entidades agrícolas más importantes del país, la actividad económica se sustenta principalmente en su agricultura; el estado cuenta con una superficie agrícola de 1, 469, 443 hectáreas, representando el 25% de su superficie (INEGI, 2009). Su alta productividad le permite participar en los mercados internacionales como exportador de leguminosas, gramíneas y hortalizas. El frijol en nuestro país es el segundo cultivo básico de importancia, pertenece a la familia de las leguminosas o fabáceas y constituye una rica fuente de proteínas, hidratos de carbono, vitaminas y un alto contenido de fibra, por ello es considerado uno de los alimentos básicos en la dieta no solamente de los sinaloenses sino también de los mexicanos, de ahí la importancia de su cultivo. El frijol es un cultivo muy susceptible de ser atacado por diversas enfermedades ya sea de hongos, virus y bacterias, lo cual causa mermas importantes en la productividad agrícola. *Sclerotinia sclerotiorum* es un hongo del suelo que causa la enfermedad conocida como moho blanco en frijol y garbanzo, aunque es capaz de infectar otros cultivos hortalizas y plantas florales. Esta enfermedad se caracteriza por pudriciones húmedas cubiertas por un micelio blanco algodonoso. El patógeno produce esclerocios los cuales son estructuras de resistencia que pueden permanecer en reposo por varios años en el suelo y en las siguientes temporadas sirven como fuente de infección para los nuevos cultivos susceptibles, establecidos en otoño-invierno.

*Sclerotinia sclerotiorum* se caracteriza por germinar micelio- y carpogénicamente de acuerdo a las condiciones ambientales. Mantener la producción agrícola sin deterioro del medio ambiente y de la salud humana garantizaría la sostenibilidad de la actividad agrícola tanto de nuestro estado como del país. De manera convencional, este hongo es combatido con fungicidas sintéticos; sin embargo, estrategias alternativas, tales como el uso de microorganismos antagonistas puede resultar beneficioso a largo plazo ya que reduciría el riesgo de desarrollo de resistencia al patógeno, así como el efecto sobre el ambiente y la salud humana.

En algunos cultivos se ha logrado controlar eficientemente la enfermedad causada por *Sclerotinia* mediante el uso de algunos fungicidas antes y durante la

etapa de susceptibilidad del patógeno. Sin embargo, la utilización repetida de pesticidas sintéticos eventualmente trae como consecuencias el desarrollo de resistencia en el patógeno y de contaminación de los suelos con el correspondiente riesgo a la salud humana. Por lo tanto, estrategias en las que se utilizan microorganismos para el control de patógenos merecen ser exploradas. Existen reportes en distintas regiones del mundo en los que se han documentado más de 30 especies de hongos, bacterias, insectos y otros organismos que parasitan a *Sclerotinia* o inhiben su crecimiento (Knudse *et al*; 1991; Jones y Stewart, 1999; Melo *et al*; 2006). Sin embargo, la utilización de microorganismos no nativos puede resultar inefectiva, ya que éstos no necesariamente podrán adaptarse a las condiciones naturales de la región en donde serán utilizados.

Trabajos preliminares en el laboratorio de Interacción microorganismo-planta del CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa han permitido identificar tres aislados microbianos nativos con propiedades antagonistas a *S. sclerotiorum* bajo condiciones *in vitro*, partiendo los dos aislados de *Bacillus subtilis* (105 y 150) de un banco disponible de microorganismos obtenidos de la rizosfera de plantas de tomate en cultivo de suelos agrícolas de Guasave, Sinaloa (Maldonado *et al.*, 2006). El tercer aislado incluido en este trabajo corresponde a un aislado (OX32) que se obtuvo de la rizosfera de frijol (López-Rodríguez, 2010).

En el presente trabajo, se evaluó el efecto de estos aislados antagonistas sobre la infección por *S. sclerotiorum* de hojas desprendidas y en flores de frijol, así como en la germinación carpogénica de esclerocios. Los resultados indican que los aislados inhibieron la producción de apotecios en los esclerocios tratados. Con base en estos antecedentes, en este trabajo se propuso probar el efecto de los aislados microbianos seleccionados en la incidencia de moho blanco en un cultivo de frijol en condiciones en campo, así como estudiar el efecto de los antagonistas seleccionados en la diferenciación carpo- y micelio-génica de esclerocios. La identificación de una estrategia que inhiba la germinación de esclerocios podría representar una manera de controlar la dispersión del patógeno y por lo tanto de la enfermedad en cultivos agrícolas de la región.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 El frijol (*Phaseolus vulgaris*)

#### 2.1.1 El cultivo de frijol y su importancia

El frijol es una leguminosa originaria de América y su utilización en el consumo humano de la época prehispánica data de más de 5, 000 años. En la actualidad el frijol es la leguminosa más cultivada a nivel mundial y participa con el 57% de la oferta mundial de las leguminosas. En México, el frijol representa toda una tradición productiva y de consumo, constituye la dieta básica del pueblo mexicano por su alto contenido de proteínas, almidones y grasas por lo tanto su cultivo es de gran importancia y lo hace ser un cultivo que no puede sustituirse por el consumo de otro alimento (SAGARPA, 2006).

México es el quinto productor de frijol en el mundo desde el año 2001, cuando superó a EUA, con una producción promedio en ese período de 1.2 millones de toneladas. Del 2003 a la fecha México tiene una participación porcentual del 7 por ciento a nivel mundial en cuanto a superficie cultivada (ha). En México, este cultivo cumple diversas funciones alimentarias y socioeconómicas que le han permitido trascender hasta la actualidad. Es un cultivo estratégico, a nivel nacional, 570 mil personas se dedican y viven de ella, con un promedio de cinco hectáreas por agricultor y destinan cerca del 20% de la cosecha para autoconsumo (SAGARPA, 2006).

#### 2.1.2 Producción de frijol

En el ciclo agrícola otoño-invierno 2010-2011, la producción nacional de frijol fue de 196, 000 toneladas siendo 200, 000 hectáreas la superficie cosechada. En el ciclo otoño-invierno 2008-2009, el estado de Sinaloa el cual cuenta con 106, 281.03 hectáreas de la producción nacional obtuvo una cosecha de 55, 209.28 hectáreas de dicha superficie (INEGI, 2009).

La producción de frijol puede verse afectada por enfermedades, principalmente encontramos el moho blanco provocado por el hongo *S. sclerotiorum*. La enfermedad se manifiesta cuando las condiciones del clima son óptimas para su

desarrollo; el rendimiento del frijol presenta pérdidas las cuales pueden ser elevadas cuando las condiciones favorables para el desarrollo del patógeno se presentan. La productividad del cultivo de frijol en opción de la variedad de frijol *Azufrado Higuera*, se ve afectada por diversos factores que limitan su producción, entre los que se encuentran las enfermedades como moho blanco (Salinas, 1994).

### **2.1.3 Características agronómicas del Cultivo de frijol**

México, como parte de Mesoamérica es considerado como uno de los centros de origen más importantes del mundo de varios tipos de frijoles del género *Phaseolus*, entre ellos el que más destaca por su valor comercial es el *Phaseolus vulgaris*. Existen antecedentes de que esta planta se viene cultivando desde hace aproximadamente 8 mil años. En México se producen diferentes variedades de frijol, las cuales corresponden a los diferentes hábitos de consumo existentes en nuestro país. La mayor parte de la producción nacional (entre 69 y 70%) se localiza en el noroeste del país. En esta zona se emplean las variedades azufradas, pintas y negras. La demanda de producción de frijol de las variedades tipo azufrado se ha ido diversificando en los últimos años sobre todo en la zona norte (Sinaloa) donde se consumen estas variedades. Las principales características agronómicas de estas variedades sugeridas para el noroeste de Sinaloa (INIFAP-CIRNO-CEVAF, 2003) son de hábito de crecimiento de mata (determinado), es decir las flores desarrollan una inflorescencia de racimo terminal, los botones florales son blancos o rosados. El ciclo vegetativo del frijol tanto en su forma silvestre como cultivada es anual, en la de variedad *Azufrado Higuera* su ciclo vegetativo es de 105 días, iniciando su etapa de floración a los 38 días del ciclo. Sin embargo, su fenología aunque están determinadas genéticamente en cada variedad se ven afectadas por las condiciones del medio ambiente tales como temperatura, humedad, duración e intensidad de la luz por mencionar las más importantes y por lo tanto estas condiciones las hacen ser susceptibles o tolerantes a enfermedades.

## **2.2 *Sclerotinia sclerotiorum***

### **2.2.1 Descripción general de *Sclerotinia sclerotiorum***

El moho blanco es una de las enfermedades más devastadoras que ataca a diversos cultivos como algunas leguminosas de gran importancia para nuestra región, como lo es el frijol. El agente causal de esta enfermedad es el hongo *S. sclerotiorum*, un patógeno poco específico ya que posee un amplio rango de hospederos. Se encuentra distribuido en todo el mundo, aunque su incidencia es mayor en zonas templadas del hemisferio norte. También causa problemas en algunas regiones desérticas o tropicales en las épocas frías. En México, el moho blanco del frijol se ha reportado en el Estado de México, Sinaloa, Sonora, Nayarit y Veracruz.

En el estado de Sinaloa, el moho blanco es una enfermedad endémica, cuya incidencia y severidad varía en cada ciclo agrícola dependiendo de la humedad invernal. El moho blanco puede llegar a disminuir la producción de frijol hasta un 70%, de ahí que se le considere la enfermedad fungosa más importante de este cultivo. Esta enfermedad llega a afectar a todas las variedades de frijol, aunque las de guía y semi-guía son más dañadas que las de porte erecto (Apodaca-Sánchez, 2010). El principal síntoma característico y evidente ocasionado por *S. sclerotiorum* es la aparición, sobre la planta infectada, de un micelio velloso y blanco en el que en poco tiempo se desarrollan unas estructuras de resistencia conocidos como esclerocios que poseen micelio tabicado. Los esclerocios pueden germinar de dos maneras, miceliogénicamente produciendo micelio o carpogénicamente produciendo apotecios con ascas donde se encuentran depositadas las ascosporas. Este hongo no produce esporas asexuales o conidios (Agrios, 1997).

*Sclerotinia sclerotiorum* infecta a los huéspedes susceptibles en un rango de temperatura de 0 a 25° C, con un rango óptimo de crecimiento de 15 a 20° C. En medio con agar el crecimiento se produce a un rango de temperatura de 0° a 35° C (Chupp y Sherf, 1960). El pH de crecimiento de dicho patógeno se produce en un rango de 2.3 a 7.5. Muchos estudios de nutrición estiman que las fuentes de crecimiento de *S. sclerotiorum* se ven favorecidas principalmente por fuentes de carbono y nitrógeno como algunos carbohidratos tales como glucosa, fructosa,

galactosa, arabinosa, maltosa, sacarosa entre otros y algunas fuentes de nitrógeno como lo son asparagina, prolina, ácido glutámico, arginina, sales, nitratos, urea entre otros compuestos. Se ha demostrado que *S. sclerotiorum* sobrevive en hábitats naturales en forma de esclerocios por un largo tiempo (Purdy, 1979) y éstos se encuentran en estado dormante por un largo período. Enzimas pectinolíticas y celulolíticas han sido estudiadas por su relación en la patogénesis del hongo, componentes celulares y asociados a las enzimas tales como glucanasas han sido consideradas por su relación en la iniciación de producción de apotecios (Agrios, 2005).

## **2.2.2 Morfología de *Sclerotinia sclerotiorum***

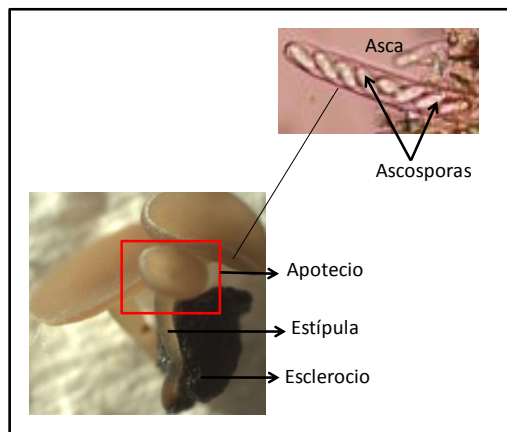
### **2.2.3 Esclerocios**

El hongo *S. sclerotiorum* está constituido por diversas estructuras, las cuales difieren entre sí en sus características morfológicas, fisiológicas y patológicas. *Sclerotinia sclerotiorum* al infectar a la planta hospedera, produce hifas que son de color blanco en su estado inicial pero posteriormente el micelio se compacta formando estructuras que se tornan color marrón oscuro a negras, conformando así estas estructuras conocidas como esclerocios. Estos esclerocios son de consistencia muy dura debido al endurecimiento superficial de su capa de melanina, son de forma irregular, generalmente más alargados que esféricos, aplanados y el tamaño de su diámetro varía, puede ser de 2 a 10 mm (Schwartz *et al*; 1988). Estas estructuras permanecen viables en el suelo por períodos de hasta 10 años, lo que hace a este patógeno muy difícil de erradicar (Agrios, 2005).

### **2.2.3 Reproducción de apotecios**

La germinación de los esclerocios comienza con la formación de las estructuras conocidas como estípulas o tallos apoteciales que son de color pardo, las cuales se desarrollan engrosando la estípula y ocasionando en la punta de ésta una estructura en forma de disco o trompeta conocida como apotecio que alcanzan la superficie del suelo, los apotecios miden en promedio de 3 a 6 mm de diámetro. Las

estípulas no requieren de luz para su desarrollo pues se encuentran debajo de la superficie del suelo, cuando se han desarrollado las estípulas y salen a la luz alcanzan una longitud promedio y rara vez alcanzan hasta 5 cm (Schwartz *et al*; 1988). Cada apotecio contiene miles de ascas donde se desarrollan las ascosporas, cada asca contiene 8 ascosporas, éstas tienen forma ovoide y miden entre 4 y 10 micras de ancho y 9 a 16 micras de largo rodeadas de una capa protectora de exina e intina las cuales sirven de resistencia a las condiciones adversas en estado latente. Las ascosporas necesitan de una fuente de energía exógena, por ejemplo, que provenga de plantas senescentes de la planta para que puedan germinar; en frijol esta fuente de energía casi siempre son los pétalos que se desprenden de las flores ya fecundadas.



**Figura 1.** Estructura de un apotecio mostrando las ascas donde se depositan las ascosporas (Sotomayor-García, 2008).

#### 2.2.4 Sistemática de *Sclerotinia sclerotiorum*

El fitopatógeno *S. sclerotiorum* pertenece a la clase Ascomiceta, orden Helotiales, familia *Sclerotiniaceae*, género *Sclerotinia* y especie *sclerotiorum* (Lib. de Bary, 1884). La taxonomía de esta especie fue basada en el tamaño y características generales de los esclerocios, rangos de hospederos, dimensiones de las ascosporas y es considerado como un ascomiceto cosmopolita (Willettts y Wong, 1980). Su amplio rango de hospederos lo hace ser uno de los patógenos ubicuos más agresivos para cultivos de interés económico. *Sclerotinia sclerotiorum* ha demostrado



su patogenicidad en 408 especies y 42 subespecies principalmente presentes en la subclase *dicotiledoneae* de las angiospermas (Boland y Hall, 1994). *Sclerotinia sclerotiorum* es capaz de infectar un amplio rango de hospedantes entre los que se encuentran cultivos importantes en Sinaloa como hortalizas y leguminosas como garbanzo y principalmente frijol (Purdy, 1979). Las enfermedades causadas por *Sclerotinia* se conocen bajo una amplia variedad de nombres, y las más comunes de ellas, junto con algunas de las plantas hospedantes más severamente afectadas son las siguientes: pudrición algodonosa, moho blanco o pudrición blanda aguanosa del frijol, col, zanahoria, berenjena, cacahuete, papa, alhelí, tabaco y cítricos, entre otros; pudriciones del tallo y maderamen del pepino, calabaza, frijol, alcachofa, espárrago, crisantemo, dalia, delfinio, peonia, papa, tomate, soya y camote; pudrición de la corona o marchitez de la aguileña, antirrino o boca de dragón, tizón de las inflorescencias del narciso, camelia, nudo rosa del pimiento rojo, cáncer del tallo de la malva real, pudriciones de la raíz y corona del trébol, y muchas otras (Agrios, 2005).

### **2.2.5 Patogenicidad**

El grado de patogenicidad de *Sclerotinia sclerotiorum* está en relación a la producción de ácido oxálico el cual es un compuesto importante, tanto en la patogenicidad como en el desarrollo del hongo (Godoy *et al.* 1990) y también en relación con la expresión de enzimas que degradan la pared celular, y causan lesiones que se expanden (Elsevier, 2005). Este hongo produce y secreta concentraciones milimolares de ácido oxálico en su entorno (Cessna *et al.*, 2000).

El mecanismo específico del ácido oxálico durante la infección no es muy claro, sin embargo todavía se propone que su papel se centra en tres modos de acción: Primero, la secreción del ácido oxálico causa un descenso apoplástico del pH lo cual favorece la actividad de varias enzimas del hongo secretadas al invadir los tejidos de las plantas como lo son las poligalacturonasas. Estas actividades liberan moléculas como oligo-galacturónidos y péptidos que ayudan en la expresión de una segunda actividad de enzimas degradativas que llevan a la degradación del resto del tejido de la planta (Elsevier, 2005). Segundo, el ácido oxálico puede ser directamente tóxico a

la planta hospedera debilitándola. Tercero, la quelación del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) de la pared celular por el anión oxalato comprometiendo las respuestas de defensa de la planta que dependen del ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y de igual forma la planta se debilita.

Se ha sugerido que diversas sustancias tales como ácidos fenólicos y polifenoloxidasas producidas por el hongo poseen efectos morfogenéticos en la producción de esclerocios de *S. Sclerotiorum* (Willetts, 1972; Wong y Willetts, 1974; Marukawa *et al.*, 1975). La intensidad de la enfermedad está relacionada con la cantidad de esclerocios viables en suelo y con las condiciones ambientales que determinan el proceso de diferenciación de los apotecios durante el desarrollo de los cultivos especialmente durante el período de floración (Cook *et al.*, 1977; Saito, 1977; Boland y Hall, 1987).

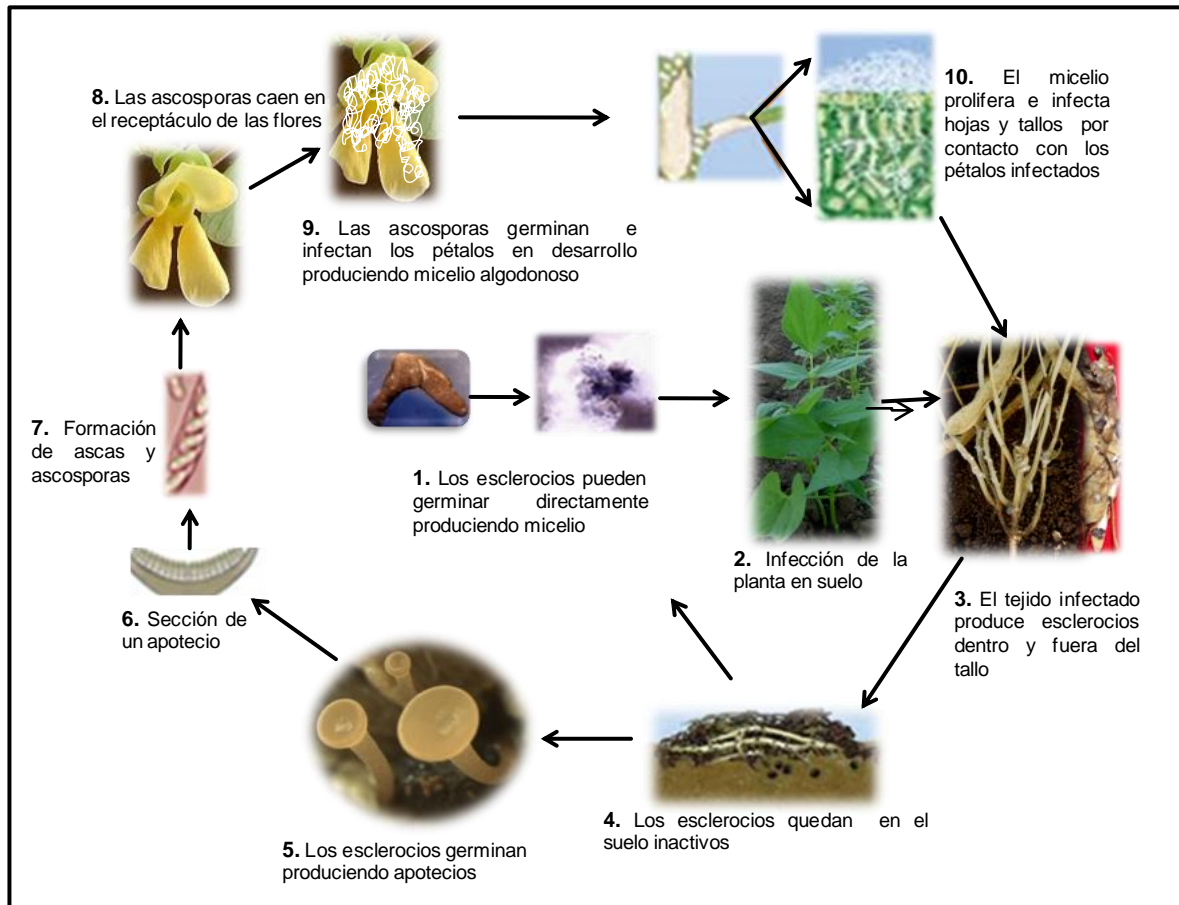
### **2.2.6 Ciclo de infección y sintomatología**

En frijol, las infecciones ocurren comúnmente cuando el follaje ya está denso, etapa en la que la humedad relativa es más alta, a causa de la lluvia, rocío, neblina o del agua de riego (Salinas-Pérez, 2011). El hongo *S. sclerotiorum* permanece en forma de micelio en plantas vivas o muertas y en forma de esclerocios sobre o en el interior de tejidos infectados, o que han caído en el suelo. Cuando las raíces entran en contacto con los esclerocios, estos germinan y pudren a las raíces de la planta, posteriormente la infección continúa y en la parte interna del tallo se forman esclerocios, las plantas se marchitan y mueren. Estas estructuras de resistencia pueden ser diseminadas de un campo a otro a través de maquinaria agrícola, en donde los esclerocios pueden permanecer infectivos por hasta 10 años.

Los esclerocios se encuentran en estado dormante en el suelo y cuando están en período de preacondicionamiento es cuando inicia el ciclo biológico del hongo, que por lo general ocurre durante la época de invierno o cuando aun no se ha establecido el cultivo. Una vez acondicionados, los esclerocios pueden germinar carpogénicamente (sexualmente) al encontrar las condiciones ambientales aptas tales como humedad elevada, luz y baja temperatura, lo cual da como resultado la formación de apotecios, los cuales emergen a la superficie del suelo. Los apotecios dan lugar a la formación de ascosporas, por lo que cada apotecio puede liberar más

de dos millones de ascosporas, las cuales pueden dispersarse a lo largo de una semana si las condiciones de temperatura se encuentran en un rango de 10°–20° C, de lo contrario no se producen ascosporas (Agrios, 2005). Las ascosporas germinan de 3 a 6 horas después de ser liberadas y depositarse sobre tejido floral, en climas templados y humedades elevadas.

Las ascosporas también pueden colonizar los tejidos que presenten lesiones necróticas causadas por algún otro patógeno, antes del período de floración de la planta ya que el tejido orgánico en descomposición les proporciona la energía necesaria para su germinación. Después de colonizar un órgano senescente de la planta, el hongo patógeno puede invadir el tejido vegetativo sano del hospedero, mediante la presión que ejerce sobre la cutícula el extremo de hifas denominadas apresorios. Entre la cutícula y las capas de la epidermis se forman una vesículas grandes que desarrollarán después hifas infectivas, las cuales al ramificarse inter- e intra-celularmente causan pudrición húmeda y blanda. Por último, la enfermedad avanza continuamente en la planta y puede llegar a provocar su muerte. Durante la cosecha del tejido afectado, se desprenden esclerocios los cuales caen al suelo completándose así el ciclo de vida del patógeno (Figura 2).



**Figura 2.** Ciclo de vida de *S. sclerotiorum* en frijol.

## 2.3 Métodos de control

### 2.3.1 Control físico

Un ejemplo del control físico para la enfermedad es la solarización. Principalmente el método está basado en el calentamiento del suelo a temperaturas entre 36° y 50°C a los 30 cm de profundidad del suelo (Braicovich, 2004).

### 2.3.2 Control mecánico

El control mecánico incluye la rotación de cultivos. La recomendación principal consiste en hacer rotaciones con cultivos no susceptibles tales como maíz y trigo (Garza *et al.*, 2002) Sin embargo, el amplio rango de hospedantes tanto silvestres como cultivados hace que el control mecánico no pueda ser la única estrategia de control contra este patógeno debido a la persistencia o a la supervivencia de

esclerocios en el suelo durante largos períodos de tiempo (Li *et al.*, 2003), mismos que pueden llegar a ser períodos de aproximadamente 10 años (Agrios, 2005). Por esto, se recomienda evitar sembrar cultivos altamente susceptibles tales como girasol y colza durante la rotación (Ridao, 2006).

### **2.3.3 Control químico**

El tratamiento con productos químicos es, a la fecha, la estrategia más utilizada para el control de moho blanco, por lo que no se puede negar su valor para el control de esta enfermedad. Los tratamientos químicos incluyen ingredientes activos tales como metan-sodio, benomilo, clorotalonilo, iprodiona, vinclozolina, dicloran o metil tiofanato, los cuales reducen de manera importante la proliferación del hongo en muchos cultivos. Sin embargo, dichos productos aumentan los costos de producción, generan residuos tóxicos que perturban el equilibrio ecológico y pueden generar resistencia de los patógenos.

Gossen (2001) reporta por primera vez la observación de resistencia al fungicida benomilo en *S. sclerotiorum*. De igual manera, se han reportado otros compuestos químicos a los cuales se les atribuye desarrollo de resistencia en *S. sclerotiorum*, estos químicos son bencimidazol y carbendazim (MBC). Dichos fungicidas, fueron ampliamente utilizados para controlar esta enfermedad durante la década de los 80's en China, pero el control de la enfermedad falló y se dejaron de utilizar (Zhang *et al.*, 2003).

El azufre es un elemento químico que se usa como fungicida y en la manufactura de fosfatos fertilizantes en la agricultura. Este químico es aplicado en una gran variedad de cultivos agrícolas del estado de Sinaloa principalmente como fungicida, y es utilizado para el control de *S. sclerotiorum* en algunas regiones.

### **2.3.4 Control biológico**

El control biológico surge como una alternativa para reducir el uso de los productos químicos y contrarrestar los efectos negativos al medio ambiente (Cundom *et al.*, 1999). Dos estrategias se pueden utilizar para el control de las enfermedades

de *Sclerotinia* con agentes de biocontrol, uno es a través de afectar la viabilidad de los esclerocios y la otra a través de la inhibición de la infección de las ascosporas del patógeno (Fokkema, 1993). Varios estudios han reportado microorganismos, tanto hongos como bacterias, con capacidad antagónica a este patógeno. Los microorganismos antagonistas más extensamente estudiados hasta la fecha son especies de *Trichoderma* (Melo, 2006; Santos y Dhingra, 1982) *Coniothyrium minitans* (Trutman, 1980), *Sporidesmium sclerotivorum* (Adams, 1990) y *Talaromyces flavus* (McLaren, 1986). La capacidad de este antagonismo se basa en la habilidad que tienen estos microorganismos para micoparasitar esclerocios y son atractivos para usarse como biofungicidas comerciales (Cook, 1983).

Itamar y colaboradores (2006) señalan que *Aspergillus terreus* puede considerarse como un excelente agente de biocontrol. Conidios de *A. terreus* fueron inoculados en esclerocios de *S. sclerotiorum* causando la mortalidad de un 100% de los mismos debido a que este hongo penetra en las células del hospedero, formando un apresorio causando así desintegración del tejido medular del esclerocio.

Otros estudios han identificado algunas bacterias como agentes de biocontrol contra *S. sclerotiorum* (Zhang, 2004). Se ha demostrado que bacterias del género *Erwinia spp.* y *Bacillus spp.* inhiben el crecimiento de *Sclerotinia in vitro, in vivo* y en campo, y particularmente en frijol (Godoy *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 1993; Yuen *et al.*, 1991, 1994; Tu, 1997). El pre-tratamiento de plantas de frijol con *E. herbicola* (*Pantoea agglomerans*) reduce severamente la muerte de *S. sclerotiorum* creciendo en cámaras climáticas a una temperatura de 24°C (Godoy *et al.*, 1990).

Estudios realizados por Savchuk, (2002) identificaron *in vitro* a *Pseudomonas chlororaphis* y *Pseudomonas sp.* como inhibidores muy efectivos del crecimiento micelial y germinación de esclerocios y ascosporas de *S. sclerotiorum*. En los estudios realizados en campo, se demostró que *Bacillus amyloliquefaciens* es un agente efectivo de biocontrol contra *Sclerotinia* (Zhang, 2004; Fernando, 2006). En otros ensayos realizados con *B. amyloliquefaciens* y *Trichoderma harzianum* demostraron que estas especies no solamente protegen a las plantas de la infección de *S. sclerotiorum* si no que también parecen aumentar el crecimiento de dichas plantas (Abdullah, 2008). Por otro lado, se demostró que la inducción de enzimas

líticas producidas por *P. chlororaphis* actúan en la inhibición del crecimiento micelial del hongo *in vitro* (Fernando, 2006).

La idea del presente trabajo fue probar el efecto de organismos aislados de suelos de esta región que también han resultado con potencial antagonista contra *S. sclerotiorum* en previos experimentos en condiciones *in vitro* (Sotomayor-García, 2008 y López-Rodríguez, 2010). En el trabajo de Sotomayor-García se seleccionaron e identificaron aislados bacterianos a partir de un banco de microorganismos aislados de suelos de la rizosfera de tomate (Maldonado *et al.*, 2006) los cuales resultaron antagonistas al crecimiento micelial de esclerocios de *S. sclerotiorum*. De un grupo de 114 microorganismos monitoreados, 17 mostraron un efecto antagonista, de los cuales 10 de ellos resultaron no hemolíticos, es decir no mostraron actividad lítica en eritrocitos. Los 10 aislados fueron identificados como bacterias gram positivas. La identificación molecular del ADNr 16S de dos de los aislados (105 y 150) resultaron ser altamente homólogos a *Bacillus subtilis* (Sotomayor-García, 2008). El aislado adicional OX32 que se incluyó en alguno de los experimentos del presente trabajo resultó ser *Pseudomonas putida* de acuerdo a su identificación molecular y fue seleccionada por presentar efecto biocontrol *in vitro* contra *S. sclerotiorum*. La característica principal de esta bacteria es que degrada ácido oxálico. El ácido oxálico provoca un descenso del pH en los tejidos infectados ocasionando que una variedad de enzimas fúngicas se activen e interfieran con el funcionamiento de las células estomatales (células guarda) y durante la infección del hongo se provoque marchitez en la planta (Cessna, 2000). El aislado seleccionado de *P. putida* (OX32) es capaz de crecer en la vecindad del patógeno y alcanzar el nivel de inóculo bacteriano suficiente para ejercer el efecto de antagonismo y así controlar la infección por *Sclerotinia sclerotiorum* (López-Rodríguez, 2010).

En el presente trabajo se estudiaron los tres microorganismos seleccionados por sus capacidades antagónicas contra *S. sclerotiorum*. Estos tres microorganismos son nativos de suelos de la región, lo cual representa una ventaja ya que están adaptados a las condiciones climáticas y edafológicas de donde se pretenden utilizar, en contraste con cepas aisladas en otras regiones.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El patógeno *S. sclerotiorum* causa la enfermedad conocida como moho blanco en frijol, la cual llega a ser devastadora para este cultivo. Los esclerocios producidos por *S. sclerotiorum* permanecen viables en el suelo durante largos períodos, hasta encontrar las condiciones óptimas para que éstos se reproduzcan micelio- y carpo- génicamente por lo que logran afectar al cultivo en gran medida, es por ello que se requiere de prácticas que logren controlar la incidencia de la enfermedad causada por el hongo. Esta enfermedad se ha logrado controlar mediante el uso de algunos fungicidas antes y durante la etapa de susceptibilidad del patógeno. Sin embargo, la utilización repetida de pesticidas sintéticos podría traer como consecuencia el desarrollo de resistencia en el patógeno y también causar contaminación de los suelos con efectos de riesgo a la salud humana. En los últimos años, el uso de microorganismos antagonistas utilizados como agentes de biocontrol, ha demostrado ser una alternativa factible frente al control tradicional de fitopatógenos con productos químicos, con la idea de contrarrestar sus efectos negativos en el medio ambiente y la salud humana. La selección de microorganismos nativos antagonistas a *S. sclerotiorum* puede ser una estrategia útil para el desarrollo de un producto biofungicida efectivo en esta región, ya que estos microorganismos se encuentran adaptados a las condiciones edafológicas y climáticas propias de esta zona del país.



#### **4. HIPÓTESIS**

Los tres aislados (105, 150 y OX32) microbianos nativos inhiben la germinación de ascosporas en tejido floral, de micelio en tejido foliar, y la germinación de esclerocios de *S. sclerotiorum* en suelo bajo condiciones de laboratorio, así como el desarrollo de moho blanco en frijol en campo.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de aislados microbianos nativos en la germinación de ascosporas en tejido floral, de micelio en tejido foliar, y en la germinación de esclerocios de *S. sclerotiorum* en suelo bajo condiciones de laboratorio, así como en la incidencia y severidad de moho blanco bajo condiciones de campo en frijol.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

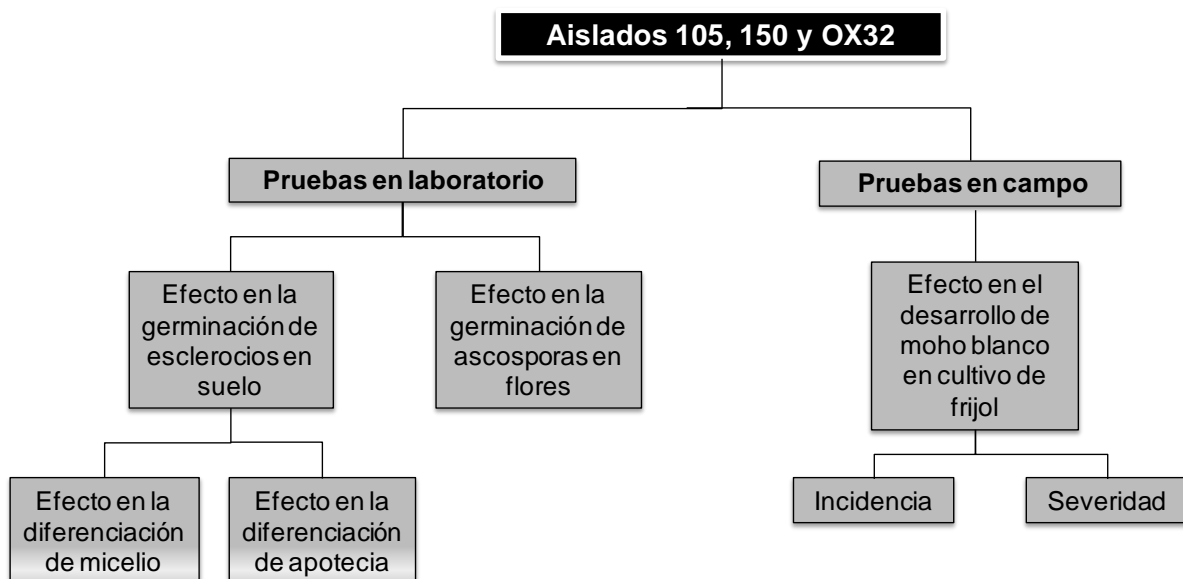
1. Evaluar el efecto de aislados microbianos nativos en la germinación de ascosporas sobre tejido floral de frijol bajo condiciones de laboratorio.
2. Evaluar el efecto de aislados microbianos nativos en la infección de micelio de *S. sclerotiorum* sobre tejido foliar de frijol bajo condiciones de laboratorio.
3. Evaluar el efecto de aislados microbianos nativos en la germinación micelio- y carpogénica de esclerocios de *S. sclerotiorum* en suelo bajo condiciones de laboratorio.
4. Evaluar el efecto de aislados microbianos nativos en la incidencia y severidad de moho blanco en frijol bajo condiciones de campo.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Estrategia general de trabajo

A partir de los aislados seleccionados 105,150 y OX32 se realizaron pruebas *in vitro* en laboratorio y por otro lado se realizaron pruebas en campo. Las pruebas en laboratorio consistieron en conocer el efecto de los aislados en la germinación de esclerocios en suelo, evaluando el número de esclerocios que produjeron apotecios o micelio, por otra parte se realizaron pruebas en tejido floral de frijol para conocer el efecto de dichos aislados en la germinación de ascosporas en flor.

Las pruebas en campo se llevaron a cabo en un campo experimental con incidencia de moho blanco y se realizaron con la finalidad de conocer el efecto de los aislados en el desarrollo de moho blanco en un cultivo de frijol evaluando incidencia y severidad.



**Figura 3.** Estrategia general de trabajo.

## 6.2 Resiembra de los aislados

Los aislados bacterianos 105, 150 (Sotomayor-García, 2008) y OX32 (López-Rodríguez, 2010) fueron seleccionados de suelos de la región y se encuentran criopreservados en glicerol al 15% a -70°C. Los aislados 105 y 150 fueron resembrados en cajas petri con medio LB sólido (Luria Broth Agar) (SIGMA No. cat L3022) sin antibiótico e incubados a 37°C por 48 horas antes de ser utilizados en las pruebas de antagonismo. Los aislados 105 y 150 se seleccionaron de un banco disponible de microorganismos obtenidos de la rizosfera de plantas de cultivo de suelos agrícolas de Guasave, Sinaloa (Cordero, 2008) y fueron seleccionados como antagonistas microbianos contra la germinación de *S. sclerotiorum* en base a ensayos preliminares *in vitro*, en suelo y en tejido vegetal (Sotomayor-García, 2008). Los aislados 105 y 150 seleccionados fueron identificados molecularmente en base a la secuencia de la región 16S del ADNr mostrando un 92% y 97% de homología con *Bacillus subtilis* respectivamente (Sotomayor-García, 2008).

Para las pruebas en campo y en uno de los experimentos con suelo se utilizó un aislado adicional denominado OX32, mismo que fue identificado molecularmente como *Pseudomonas putida*, y fue seleccionado a partir de una colección de microorganismos de suelos de la rizosfera de frijol e identificado como un antagonista efectivo contra *S. sclerotiorum in vitro* (López-Rodríguez, 2010). OX32 fue también seleccionado por su habilidad para crecer en oxalato de calcio como única fuente de carbono y se encuentra de igual forma criopreservado en glicerol en medio TSA (Trypticase de Soya Agar). Dicho aislado fue resembrado en cajas Petri con medio TSA e incubado a 28°C por un período de 12 horas.

### 6.2.1 Cinética de crecimiento bacteriano de los aislados

Se inoculó una colonia bacteriana de los aislados 105 y 150 en tubos de 15 ml (Falcon, marca CLP catalogo 2553) con 5 ml de medio LB líquido y se incubó a 37°C por 16 horas a 250 rpm. Posteriormente se resembró 50 µl del cultivo celular en matraces Erlenmeyer de 250 ml de volumen con 50 ml de medio LB líquido a 37°C y agitación por 48 horas. Durante dicho período de crecimiento se tomaron lecturas de

fluorescencia de las muestras de cada aislado cada dos horas en un detector multimodal DTX880 (AF488WGS) a una longitud de onda de 495 nm.

### **6.2.2 Cuantificación de UFC/ml de bacterias antagonistas**

La cuantificación de las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) se llevó a cabo por el método de densidad óptica y diluciones seriadas en placas de LB. El primer paso fue sembrar una asada del cultivo bacteriano sólido en 5 ml de LB líquido, incubando a 37°C por 16 horas con agitación a 250 rpm. Posteriormente se realizó una resiembra en líquido de dichos aislados inoculando 50 µl del cultivo en 50 ml de LB líquido bajo las mismas condiciones de crecimiento. Se tomaron 200 µl para colocarse en placas de 96 celdas y se tomaron lectura en el multimodal a 595 nm. Se realizaron diluciones seriales  $10^{-1}$  –  $10^{-7}$ . Se realizaron tres réplicas por dilución. Las cajas sembradas fueron incubadas a 37°C por 16 horas para cuantificar número de unidades formadoras de colonias por ml.

### **6.3 Desinfección de esclerocios**

Para realizar las pruebas se partió de esclerocios de *S. sclerotiorum* recolectados en campo. Los esclerocios fueron desinfectados en su superficie con hipoclorito de sodio al 5% por 5 minutos y enjuagados varias veces en agua destilada estéril y posteriormente secados en papel absorbente. Esclerocios individuales se sembraron en Agar Papa Dextrosa (PDA por sus siglas en inglés) e incubados a 19°C por dos semanas para la obtención de micelio. Antes de que el micelio alcanzara los bordes de la caja de petri, discos de micelio fueron transferidos al centro de nuevas cajas de petri con PDA para obtener el tejido fúngico necesario en los experimentos.

#### **6.3.1 Producción de apotecios**

El desarrollo de apotecios para la producción de ascosporas se llevó a cabo siguiendo la técnica propuesta por Hillard (2009). La técnica consiste en un proceso de pre-tratamiento de los esclerocios para inducir la germinación carpogénica.

Esclerocios previamente desinfectados se envuelven en tela de gasa dentro de un recipiente de plástico con un sistema de aireación y agua destilada a una temperatura de 4°C durante un mes, posteriormente los esclerocios pre-acondicionados se transfirieron a cajas Petri con arena estéril durante tres semanas para la recuperación de las ascosporas.

### **6.3.2 Cuantificación de ascosporas**

Las ascosporas colectadas a partir de apotecios se cuantificaron microscópicamente en una cámara de Neubauer para determinar la concentración en la suspensión con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración en la suspensión (ascosporas / ml)} = 10,000 (x/4)$$

en donde “x” = total de células cuantificadas en los 4 cuadrantes

Utilizando esta metodología se lograron coleccionar 150,000 ascosporas viables por ml. Se realizó una dilución para obtener una concentración de 50 ascosporas por ml las cuales fueron inoculadas en pétalos individuales, después de inocular los aislados.

### **6.4 Pruebas en tejido floral de frijol**

Los aislados 105, 150 y OX32 se probaron en flores escindidas de plantas de campos de frijol. La prueba consistió en cultivar cada aislado bacteriano en LB líquido tal como se describió en la sección 6.2.1 de la cinética bacteriana. Las flores se lavaron con agua destilada estéril procurando no dañar el tejido. Las cámaras húmedas fueron construidas en recipientes de plástico de 8 cm de altura. Dichas cámaras contenían discos de papel absorbente humedecidos con agua destilada estéril, sobre el papel fue colocado un trozo de papel aluminio en el cual se colocó una flor de frijol y la cual se asperjó con 1 ml de la suspensión bacteriana a una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC/ml. 24 horas posteriores a la inoculación con los aislados bacterianos, a cada flor se le inocularon 50 ascosporas de *S. sclerotiorum*. Cada recipiente fue cubierto con plástico transparente y ligas para mantener la humedad, éstos fueron incubados a 19°C por un período de 0, 12, 24 y 62 horas

post-infección. La proliferación del hongo sobre el tejido floral fue determinado mediante la técnica cuantitativa con WGA-Alexaflúor 488 nm (ver sección 6.7.1). Los tratamientos aplicados en este experimento se enlistan en la Tabla 4.

**Tabla 1.** Tratamientos probados en los experimentos de flor por el método de cuantificación de la infección con WGA-488.

Número	Tratamiento	Fuente de inóculo
1	Aislado 105	ascosporas
2	Aislado 150	ascosporas
3	Aislado OX32	ascosporas
4	Biocolonizer (prod. Comercial)	ascosporas
5	Benomilo (fungicida)	ascosporas
6	Control de agua (positivo)	ascosporas
7	Control de agua (testigo)	sin ascosporas

Se utilizó un diseño completamente al azar con 10 repeticiones por tratamiento y tiempo de cosecha. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05%.

#### 6.4.1 Cuantificación de la infección de *S. sclerotiorum* en tejido floral

En el presente trabajo se montó un método cuantitativo para determinar la infección de *S. sclerotiorum* en tejido floral a partir de ascosporas. Se maceró el tejido floral en 500 µl de buffer PBS (Phosphate Buffer Saline, por sus siglas en inglés), se centrifugó por 5 minutos a 13,000 rpm, se retiró el sobrenadante y se agregó PBS hasta llevar a un volumen de 500 µl, posteriormente se agregó 1 µl de WGA-Alexafluor 488 nm (o aglutinina de germen de trigo, la cual se une de manera específica a la quitina de la pared celular del hongo y está acoplada a un fluoróforo (Alexafluor) que emite fluorescencia en un rango de 488-650 nm de longitud de onda cuando se excita a una longitud de onda de 488 nm) a una concentración de 1µg/µl, y se incubó a 4°C por 16 horas. Posteriormente se centrifugó la suspensión por 5 minutos a 13,000 rpm decantando el sobrenadante y resuspendiendo en buffer PBS para el lavado de la pastilla en tres ocasiones. Finalmente, la pastilla obtenida se

resuspendió en 500 µl de PBS. Se colocaron 300 y 200 µl de la solución obtenida en cajas de 96 pozos para su posterior lectura en el detector multimodal DTX880 (AF488WGS).

### 6.5 Pruebas de antagonismo en hojas de frijol

Se probó el efecto antagónico al crecimiento micelial de *S. sclerotiorum* de los aislados 105 y 150 en frijol. Se usaron treinta hojas de plantas de frijol de aproximadamente la misma etapa fenológica estas fueron escindidas y enjuagadas en agua destilada estéril. El experimento se hizo en cámaras húmedas, colocando papel absorbente estéril humedecido con agua destilada estéril para crear un ambiente de saturación de humedad, se colocó un portaobjetos previamente esterilizado en el centro de la caja; los cultivos bacterianos se crecieron en medio LB como se describió anteriormente y se asperjaron sobre las hojas utilizando un atomizador. Las hojas fueron posteriormente colocadas sobre el portaobjetos dentro de la cámara húmeda (Tabla 1). Las cajas fueron selladas con parafilm e incubadas por 24 horas a 19°C. A las 24 horas se inocularon las hojas con discos de micelio de 0.5 cm de *S. sclerotiorum*. Se monitoreó el crecimiento del halo de infección de *S. sclerotiorum* sobre las hojas cada 12 horas. Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05% en el software estadístico SAS para observar diferencias entre los tratamientos. Las pruebas de antagonismo en hojas de frijol del aislado OX32 fueron realizadas en otro trabajo paralelo y se hará referencia a ello en la sección de resultados.

**Tabla 2.** Tratamientos probados en los ensayos en hojas de frijol.

Número	Tratamiento	Fuente de inóculo
1	Aislado 105	micelio
2	Aislado 150	micelio
3	Mezcla 105 y 150	micelio
4	Benomilo (fungicida)	micelio
5	Control de agua	micelio



## 6.6 Pruebas de antagonismo de esclerocios en suelo *in vitro*.

### 6.6.1 Experimento 1

Para probar el efecto de los aislados bacterianos 105 y 150 en la germinación miceliogénica y carpogénica de *S. sclerotiorum* en suelos agrícolas de cultivo de frijol, se recolectaron submuestras de suelos de los campos experimentales agrícolas Miguel Leyson, CIIDIR-Sinaloa e INIFAP-CEVAF, en cinco distintos puntos de las parcelas. Las submuestras se mezclaron para formar una muestra única por suelo. Las partículas de suelo fueron separadas con un tamiz de 2 mm para obtener partículas de suelo más fino y eliminar terrones o basura. Los aislados 105 y 150 mantenidos en medio LB sólido se cultivaron en 5 ml de LB líquido a 250 rpm por 16 horas a 37°C. Posteriormente se tomaron 50 µl del cultivo líquido y se sembraron en 50 ml de LB líquido. Cada esclerocio se colocó en un recipiente de plástico de 3 cm de altura (aproximadamente de 30 ml de volumen) conteniendo cada uno de los tres tipos de suelo húmedo y fueron asperjados con 1 ml de suspensión bacteriana a una concentración de 10 millones de UFC/ml y posteriormente cubiertos con plástico transparente. Se realizó un diseño completamente al azar con 20 repeticiones. Los tratamientos aplicados en este experimento se enlistan en la Tabla 2.

**Tabla 3.** Tratamientos probados en el experimento 1 de antagonismo de los aislados 105, y 150 en tres diferentes suelos. Suelo 1: Campo Sr Enrique Norzagaray, Suelo 2: Campo experimental Miguel Leyson, Suelo 3: Campo INIFAP-CEVAF.

<b>Número</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Suelo</b>	<b>Fuente de inóculo</b>
1	Aislado 105	1	esclerocio
2	Aislado 150	1	esclerocio
3	Mezcla 105 y 150	1	esclerocio
4	Benomilo (fungicida)	1	esclerocio
5	Control de agua	1	esclerocio
6	Aislado 105	2	esclerocio
7	Aislado 150	2	esclerocio
8	Mezcla 105 y 150	2	esclerocio
9	Benomilo (fungicida)	2	esclerocio
10	Control de agua	2	esclerocio
11	Aislado 105	3	esclerocio
12	Aislado 150	3	esclerocio
13	Mezcla 105 y 150	3	esclerocio
14	Benomilo (fungicida)	3	esclerocio
15	Control de agua	3	esclerocio

Cada tratamiento fue probado en tres diferentes suelos agrícolas de la región. El suelo 1 fue colectado en un terreno particular dedicado al cultivo de frijol del Sr. Enrique Norzagaray ubicado cerca a las instalaciones de CIIDIR-Sinaloa a las afueras de la ciudad de Guasave, Sinaloa. El suelo 2 se colectó del campo experimental de INIFAP-CEVAF ubicado en la sindicatura de Juan José Ríos, en el municipio de Guasave, Sinaloa. El suelo 3 fue colectado en el campo experimental Miguel Leyson ubicado en el poblado La Esmeralda, Guasave, Sinaloa. En dicho campo se siembra frijol en rotación con cultivos como maíz y sorgo. Cabe mencionar que en dicho campo se ha observado incidencias importantes de moho blanco durante los últimos años. Los esclerocios asperjados con los aislados bacterianos y mantenidos en los tres diferentes tipos de suelo se incubaron en condiciones controladas de temperatura a 19°C en un cuarto de cultivo durante cuatro semanas bajo condiciones de luz blanca. Se llevaron a cabo observaciones y registros del crecimiento del hongo cada dos días para monitorear el comportamiento del hongo frente a cada aislado bacteriano. El monitoreo consistió en cuantificar el número de

apotecios que produjo cada esclerocio. Los datos obtenidos fueron sometidos a una prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y al no resultar datos normales se aplicó un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis y una prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05% para buscar diferencias significativas entre los tratamientos.

### 6.6.2 Experimento 2

Los tres suelos fueron probados nuevamente en un segundo experimento con esclerocios recolectados en el campo experimental INIFAP probando los aislados 105 y 150. En este experimento se incluyó el aislado OX32 en el análisis, seleccionado en un trabajo paralelo (López-Rodríguez, 2010). En este experimento se realizó el mismo proceso del montaje que para el experimento 1. Cada aislado fue crecido como lo descrito anteriormente y se inocularon  $1 \times 10^7$  UFC a cada esclerocio por aspersión; el volumen de inóculo fue de 1 ml. Los tratamientos aplicados en este experimento se enlistan en la Tabla 3.

**Tabla 4.** Tratamientos probados en el experimento 2 de antagonismo de los aislados 105, 150 y OX32 en tres diferentes suelos. Suelo 1: Campo Sr Enrique Norzagaray, Suelo 2: Campo experimental Miguel Leyson, Suelo 3: Campo INIFAP-CEVAF.

Número	Tratamiento	Suelo	Fuente de inóculo
1	Aislado 105	1	esclerocio
2	Aislado 150	1	esclerocio
3	Aislado OX32	1	esclerocio
4	Benomilo (fungicida)	1	esclerocio
5	Control de agua	1	esclerocio
6	Aislado 105	2	esclerocio
7	Aislado 150	2	esclerocio
8	Aislado OX32	2	esclerocio
9	Benomilo (fungicida)	2	esclerocio
10	Control de agua	2	esclerocio
11	Aislado 105	3	esclerocio
12	Aislado 150	3	esclerocio
13	Aislado OX32	3	esclerocio
14	Benomilo (fungicida)	3	esclerocio
15	Control de agua	3	esclerocio

El diseño experimental que se realizó fue un diseño de bloques completos al azar (tres bloques) con 10 repeticiones cada uno, ya que en experimentos preliminares mostraron una alta variabilidad los esclerocios, se decidió aplicar dicho diseño experimental y por lo tanto aumentar el número de repeticiones por bloque. Los esclerocios asperjados con los aislados bacterianos se incubaron en condiciones controladas en un cuarto de cultivo a una temperatura de 20-21°C durante cinco semanas bajo condiciones de luz constante. Se llevaron a cabo observaciones y registros del crecimiento del hongo cada 8 días. El monitoreo consistió de igual forma en estimar el número de esclerocios que produjeron apotecios y/o el número de esclerocios que produjeron micelio en el suelo. A los datos se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05% utilizando el paquete estadístico SAS.

## **6.7 Análisis físico-químicos de los suelos**

Se analizaron en cuanto a pH, conductividad eléctrica, materia orgánica, textura y estructura a los tres suelos agrícolas probados en los experimentos de diferenciación miceliogénica y carpogénica de esclerocios *in vitro*. De los suelos recolectados para los experimentos una parte fue utilizada para el análisis físico-químico de suelo y fueron analizadas en el laboratorio de suelos del CIIDIR-Sinaloa.

## **6.8 Fase experimental en cultivo de frijol en campo**

### **6.8.1 Selección de la unidad de estudio**

Los aislados 105 y 150 identificados como *Bacillus subtilis* así como el aislado adicional de *Pseudomonas putida* (OX32) fueron probados en campo durante el ciclo agrícola otoño-invierno 2010-2011 en cultivos de frijol en el Campo Experimental Miguel Leyson localizado a 25° 29.972´ N y 108° 22.560´ W, seleccionado por ser un campo infestado con *S. sclerotiorum* ubicado en la región de Guasave, Sinaloa cercano al poblado La Esmeralda. Se evaluaron dichos aislados así como dos

métodos de aplicación del antagonista: 1) aspersión al suelo y 2) aspersión al tejido floral.

### **6.8.2 Análisis físico-químicos del suelo del cultivo de frijol**

Antes de iniciar con las labores de cultivo de la fase experimental en campo, suelo del campo agrícola experimental Miguel Leyson fue analizado en cuanto a pH, conductividad eléctrica, materia orgánica, textura y estructura. La toma de muestra consistió en un muestreo de suelo de 6 puntos distintos de la unidad de estudio, el suelo se mezcló y se dividió en cuatro partes. Una de estas partes fueron utilizadas para el análisis físico-químico de suelo y analizadas en el laboratorio de suelos del CIIDIR-Sinaloa.

### **6.8.3 Preparación del terreno, diseño experimental y método de siembra**

Las labores de preparación del suelo previas a la siembra consistieron en barbecho, rastreo, nivelación, marca y trazo de camas, aplicación de riego de asiento y riegos de auxilio, éstas se realizaron previamente a la siembra. La siembra se llevó a cabo el 14 de Octubre del 2010. El diseño experimental empleado fue un diseño de bloques completos al azar con 10 tratamientos y tres repeticiones. La unidad experimental se estableció en una superficie de 40 metros de ancho por 50 metros de largo (2000 m<sup>2</sup>), el cual fue dividido en 30 parcelas con tres camas sembradas en doble hilera; cada parcela consistió de una superficie de 10 x 3.2 m contemplando 6 hileras de siembra para cada tratamiento a una distancia entre surcos de 0.80 m. La siembra se llevó a cabo con una sembradora de precisión marca óptima calibrada para depositar una densidad de siembra de 15-18 semillas por metro de surco a hilera sencilla, con la finalidad de obtener de 12-16 plantas al final de su germinación, considerando que la semilla a emplear presentara un 85% de germinación.

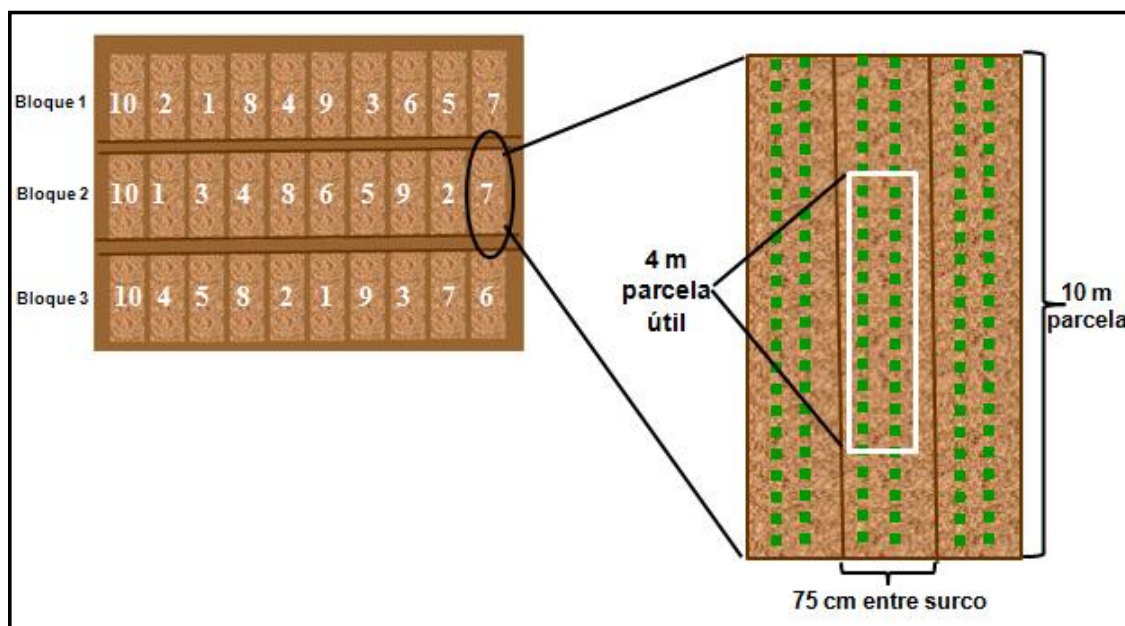
### **6.8.4 Selección de semilla**

La variedad de frijol que se utilizó para el cultivo fue *Azufrado Higuera* ya que es la que se siembra preferentemente en la región. La semilla se trató con el

fungicida comercial Vitavax® 300 (Carboxín: -5,6-dihidro-2-metil-N-fenil-1,4-oxatiin-3-carboximida y Captan: N-triclorometiltio-4-ciclohexeno-1,2-dicarboximida) cuya aplicación es de 600 cc por cada 100 kg de semilla antes de ser sembrada.

### 6.8.5 Marcaje de las parcelas experimentales

Posterior a la siembra, se llevó a cabo el marcaje de las parcelas experimentales en el cultivo de frijol el día 22 de Octubre de 2010 (8 días posteriores a la siembra). El marcaje consistió en dividir en tres bloques las unidades experimentales de cada tratamiento. Con un tractor de trabajo mediano y canalera se marcaron los canales de riego a las orillas de cada bloque. Cada parcela consistió de una superficie de 10 m y constó de 3 camas cada una con dos hileras de siembra, de las cuales las dos hileras de la cama central fueron considerados como la parcela útil dentro de la cual se marcó con estucos y rafia un cuadrante de 4 metros que se considero como la parcela útil que fue evaluada en cuanto a incidencia y severidad (Figuras 4 y 5).



**Figura 4.** Diseño del experimento en el campo de cultivo de frijol. Los cuadros señalan los tratamientos distribuidos al azar en la superficie experimental, las líneas de colores indican la separación de las parcelas experimentales de cada tratamiento y sus tres repeticiones (bloques).



**Figura 5.** Marcaje del terreno experimental. (a) Tractor con implemento agrícola marcando los canales de riego, (b) unidad experimental marcada en bloques.

#### **6.8.6 Labores de cultivo**

Las labores de cultivo a efectuar consistieron en un deshierbe manual. Para mantener la humedad del suelo adecuada al cultivo, se requirió de un riego inicial antes de sembrar y de dos riegos de auxilio. El primer riego de auxilio se llevó a cabo el 25 de noviembre (42 días posteriores al cultivo) y el segundo riego el día 16 de diciembre (63 días posteriores al cultivo). A los 70 días (23 de Diciembre) de establecido el cultivo se realizó la aplicación del fungicida comercial Benoma-T a una dosis de 750 gr/ha; la aplicación se realizó a los tratamientos correspondientes del experimento.

#### **6.8.7 Aplicación de los aislados antagonistas**

Los tres aislados antagonistas a probar fueron 105, 150 y OX32. El aislado OX32 fue identificado como *Pseudomonas putida* y es capaz de metabolizar ácido oxálico como única fuente de carbono (López-Rodríguez, 2010). Los aislados 105 y 150 se cultivaron en tubos Falcon con 5 ml de medio LB líquido y posteriormente se inocularon 800 µl de este cultivo inicial en 800 ml de LB líquido. Ambos aislados se crecieron bajo las mismas condiciones por un periodo de 16 horas a 37°C con 250 rpm de agitación. Las condiciones de crecimiento para OX32 fueron 25°C por 12 horas con 250 rpm de agitación. En el experimento se incluyó el producto comercial

Biocolonizer (formulado y distribuido por Agroindustrias del Norte S.A. de C.V.) el cual está formulado en base a una suspensión de *Bacillus subtilis* con una concentración comercial de  $1 \times 10^8$  UFC/ml y el fungicida Benoma-T.

Los tratamientos aplicados en este experimento se enlistan en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Tratamientos utilizados en campo.

<b>Número</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Tipo de aspersión</b>
1	Aislado 105	suelo
2	Aislado 150	follaje
3	Aislado 105	suelo
4	Aislado 150	follaje
5	Aislado OX32	suelo
6	Aislado OX32	follaje
7	Fungicida Benoma-T	follaje
8	Biocolonizer (prod. Comercial)	suelo
9	Control de agua	suelo
10	Biocolonizer (prod. Comercial)	follaje

Los aislados 105, 150, OX32 y el control de agua fueron aplicados por aspersión al suelo. Se realizaron dos aplicaciones de los aislados seleccionados por su efectividad *in vitro* (105, 150 y OX32) posteriores a las dos y tres semanas del establecimiento del cultivo de frijol. La primera aplicación de los aislados 105, 150, OX32, Biocolonizer y un control de agua por aspersión al suelo se realizó el 29 de Octubre del 2010 (15 días de cultivo) y la segunda el 04 de noviembre del 2010 (20 días de cultivo). Se aplicaron  $5 \times 10^7$  UFC/m<sup>2</sup> de cada aislado partiendo de una concentración de  $2.89 \times 10^8$  UFC/ml para el aislado 105,  $2.45 \times 10^8$  UFC/ml para el aislado 150 y el aislado OX32 a una concentración de  $5.85 \times 10^8$  UFC/ml por lo que de acuerdo a los cálculos correspondientes para cada aislado se diluyó en un volumen final de 7.8 litros de agua purificada comercial a un pH de 7, aplicándolos con aspersora de mochila para cada uno de los tratamientos adaptada con una campana con la finalidad de lograr una distribución uniforme de la suspensión bacteriana en cada una de las parcelas de 45 m<sup>2</sup> de cada uno de los tratamientos. El volumen de agua empleado fue por previa calibración con la aspersora de mochila, resultando el volumen indicado para una aspersión uniforme en las parcelas. Las plantas tenían 10



cm de altura aproximadamente al momento de la primera aspersion. De igual manera se aplicó el producto comercial Biocolonizer a una concentración final de  $5 \times 10^7$  UFC/m<sup>2</sup> igual que la de nuestros aislados. La concentración original del producto es la considerada en la etiqueta del envase según el fabricante ( $1 \times 10^{10}$ ).

Además de aplicar las bacterias antagonistas al suelo de cada uno de los bloques con la idea de actuar sobre la germinación de los esclerocios presentes en el suelo, también se asperjaron los aislados antagonistas sobre las plantas de frijol en etapa de floración. Se aplicó la misma concentración que el experimento de aspersion al suelo y de igual manera se utilizó el mismo volumen de las suspensiones bacterianas. La primera aplicación sobre la planta se realizó a los 50 días (03 de diciembre de 2010) de establecido el cultivo (Figura 6b) y la segunda aplicación fue el 14 de diciembre de 2010 es decir a los 62 días del cultivo (Figura 6c). Se realizó un diseño de bloques completos al azar con 10 tratamientos y tres repeticiones.



**Figura 6.** Aplicación de los aislados antagonistas. Aspersion al suelo (a), primera aspersion foliar (b) y segunda aspersion foliar (c).

#### **6.8.8 Medición de daño en plantas (incidencia y severidad)**

Las plantas del experimento fueron monitoreadas en cuanto a la detección de *S. sclerotiorum* de manera más frecuente a partir de la floración y a partir de que la temperatura ambiental comenzó a disminuir y la humedad a aumentar. La inspección del experimento se realizó con una frecuencia semanal. Se evaluaron las plantas

ubicadas en la parcela útil (4 m) ubicada en el centro de la cama central. La incidencia de las plantas se evaluó a los 80 días posteriores a la siembra del frijol, ya que fue cuando se observaron las primeras plantas con síntomas de moho blanco principalmente en la parte basal del tallo y en hoja. La evaluación de la incidencia también se registró a los 92 y 109 días del cultivo del frijol (Figura 7). La evaluación consistió en medir el número total de plantas infectadas entre el número total de plantas de cada parcela, de tal manera de poder estimar el porcentaje de incidencia de la enfermedad de moho blanco. La severidad se calculó usando la siguiente escala descrita por Yang (2009): 0= no lesiones, 1= lesiones <5% lesión de hoja, 3= lesiones del 6-15% del tallo, 5= lesiones del 16-30% del tallo, 7= lesiones del 31-50% del tallo, 9= lesiones > al 50% del tallo. Los datos obtenidos de dicha escala fueron transformados con la fórmula  $\arcsen \sqrt{x/100}$  para lograr su distribución normal y aplicar el ANOVA de una vía.



**Figura 7.** a) Evaluación de la incidencia y severidad de moho blanco en las plantas de frijol. b) Planta con nivel 3 de severidad a los 82 días y c) la misma planta a los 109 días con 7 de severidad.

### **6.8.9 Medición de rendimiento**

El rendimiento en granos se calculó a partir del peso de grano cosechado manualmente en las dos hileras centrales de la región de la parcela útil por tratamiento y se calculó el promedio del rendimiento obtenido.

### **6.8.10 Medición del porcentaje de humedad en granos**

La humedad de los granos de frijol cosechados de cada parcela útil de cada tratamiento fueron evaluados con el determinador de humedad moisture Chek Plus™ SW 08120 marca John Deer de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

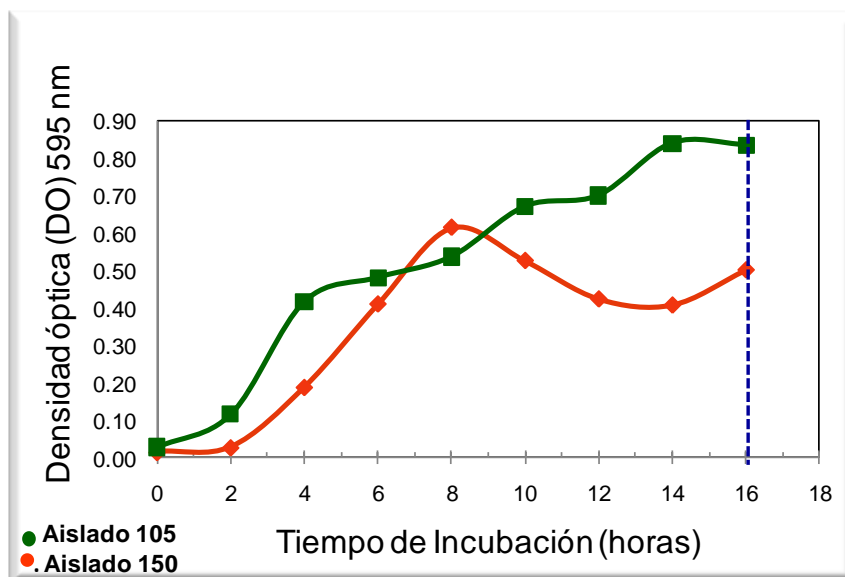
### **6.8.11 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos en las pruebas fueron procesados con el análisis de varianza (ANOVA) usando el programa estadístico SAS, con un nivel de significancia de 0.05% y una prueba de Tukey.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Cinética de crecimiento bacteriano de los aislados

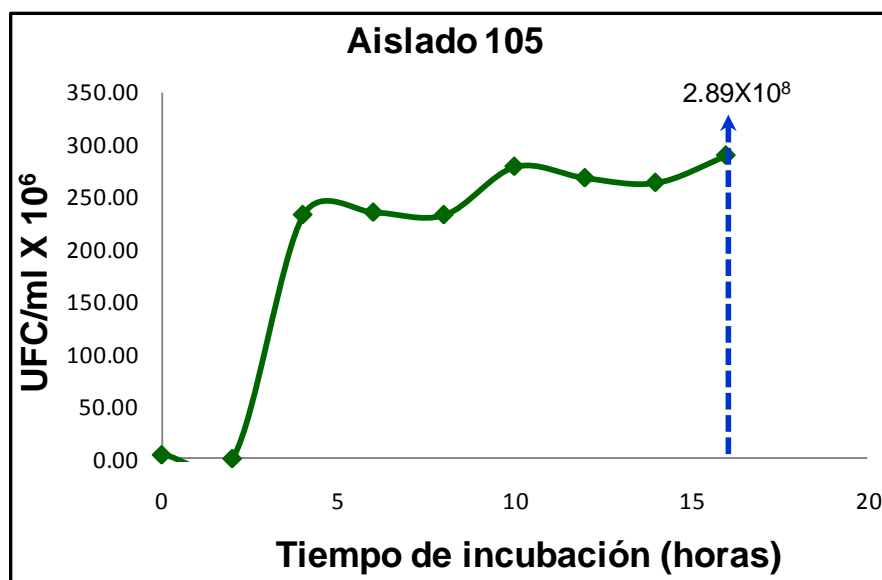
Se realizó una cinética de crecimiento para los aislados 105 y 150 durante 32 hrs. La cinética de crecimiento para el aislado OX32 ya ha sido reportada con anterioridad (López-Rodríguez, 2010). Las condiciones de crecimiento de los aislados se llevaron a cabo en medio de cultivo LB líquido. En la Figura 6 se presenta la absorbancia a 595 nm de los cultivos bacterianos con respecto al tiempo. Estos aislados presentaron distintos perfiles de crecimiento. Es decir, el aislado 105 presentó una ligera fase de latencia de aproximadamente 30 minutos, mientras que el aislado 150 fue de dos horas. El aislado 105 mostró su fase exponencial desde la primer hora hasta las 4 horas de cultivo, observándose una ligera fase estacionaria de las 4 a las 8 horas. Posteriormente se observó una segunda fase de crecimiento exponencial de las 8 a las 13 horas; y una nueva fase estacionaria de las 13 a 16 horas de cultivo. El aislado 150 tuvo una primera fase exponencial de 6 horas iniciándola a las 2 horas, a las 8 horas de cultivo mostró una fase de declinamiento en la curva, mostrando un ligero aumento de crecimiento de las 14 a las 16 horas (Figura 8).



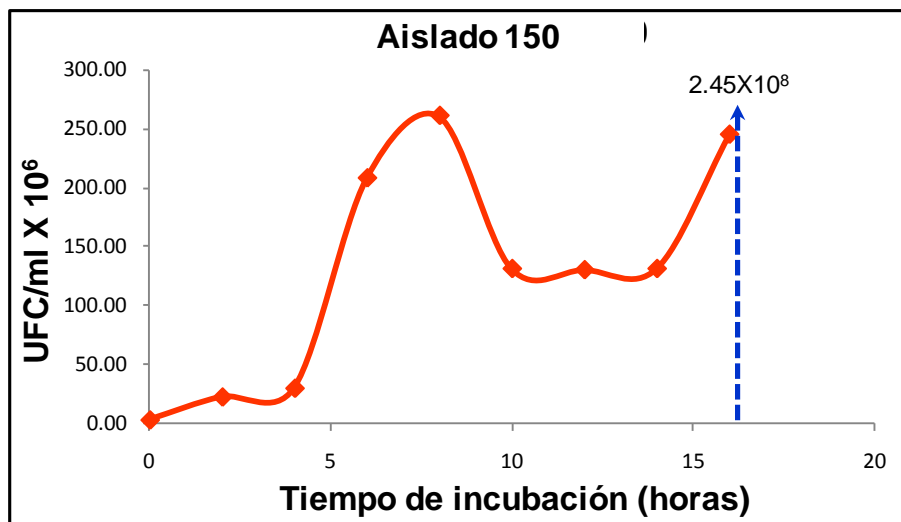
**Figura 8.** Cinética de crecimiento de los aislados antagonistas 105 y 150 por absorbancia a 595 nm. La línea punteada azul indica el tiempo en el que los cultivos fueron utilizados para las pruebas *in vitro* y en campo.

## 7.2 Cuantificación de UFC/ml de los aislados

La cuantificación de las UFC/ml en placas petri de los aislados 105 y 150 seleccionados y probados en los distintos ensayos mostraron una concentración de  $2.89 \times 10^8$  (105) y  $2.45 \times 10^8$  (150) UFC/ml a las 16 horas de cultivo respectivamente, tiempo en el que el cultivo fue utilizado en las pruebas tanto *in vitro* como de campo (Figuras 9 y 10).



**Figura 9.** Curva de concentración en UFC/ml del aislado 105 durante el ciclo de crecimiento. La línea punteada azul indica el tiempo en el que los cultivos fueron utilizados para las pruebas *in vitro* y en campo.



**Figura 10.** Curva de concentración en UFC/ml del aislado 150. La línea punteada azul indica el tiempo en el que los cultivos fueron utilizados para las pruebas *in vitro* y en campo.

### 7.3. Ensayos en tejido floral

Los aislados 105, 150 y OX32 seleccionados como antagonistas en estudios previos fueron utilizados en un experimento de infección con ascosporas de *S. sclerotiorum* en flores para determinar su posible papel como antagonistas al desarrollo del moho blanco.

Para la cuantificación del nivel de infección se implementó un método cuantitativo para determinar la proliferación de tejido fúngico a través del uso de la aglutinina de germen de trigo o WGA (por sus siglas en inglés Wheat germ agglutinin), la cual es una proteína tipo lectina la cual reconoce de manera específica la quitina de las paredes celulares fúngicas. La WGA está conjugada con el fluoróforo Alexa-fluor 488 nm. Las flores fueron infectadas con ascosporas por diferentes periodos de tiempo, cosechadas e incubadas con WGA-Alexa fluor 488 nm y la fluorescencia cuantificada. La cuantificación de infección a las 62 horas, es decir al finalizar el experimento, mostró diferencia significativa ( $p < 0.05\%$ ) para el tratamiento OX32 respecto al control positivo (con ascosporas del hongo y sin antagonista), lo que muestra que este aislado causa una disminución en la infección por ascosporas

de *S. sclerotiorum* ya que el promedio de infección fue significativamente menor comparado con el control positivo y con los tratamientos 105, 150 y con el fungicida Benomilo. El producto comercial Biocolonizer mostró inhibición de *S. sclerotiorum* con respecto al control positivo, a los aislados 105 y 150, pero no con respecto a OX32. Esto indica que OX32 tiene un efecto bioprotector en flores de frijol contra la infección de *S. sclerotiorum* a través de ascosporas y que es capaz de competir contra un producto comercial de alta demanda en la región como lo es el Biocolonizer (Tabla 6).

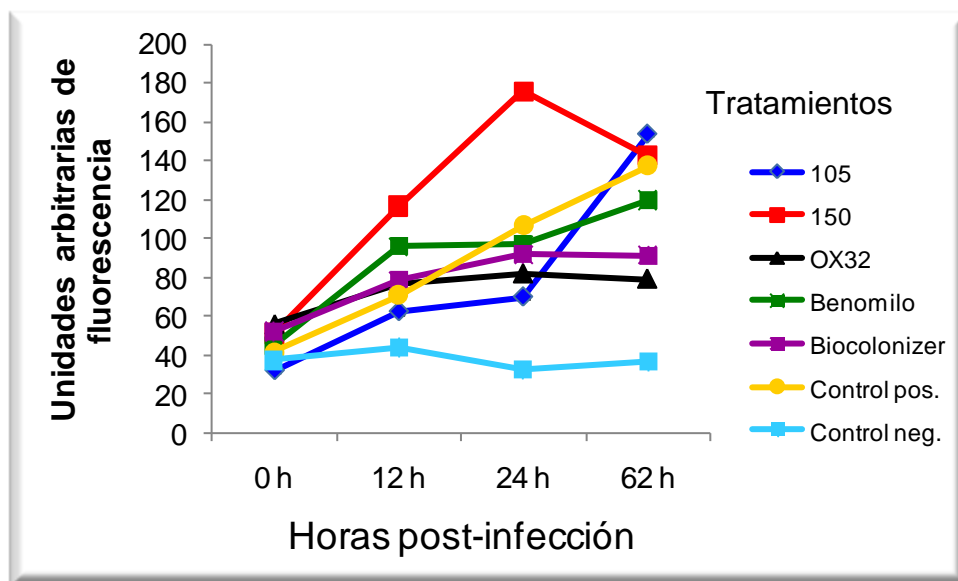
**Tabla 6.** Promedio de los valores de fluorescencia de homogenados de flores tratadas con aislados bacterianos potencialmente antagonistas, con un producto biológico comercial (Biocolonizer) y con el fungicida Benomilo, a *S. sclerotiorum*, infectadas por 62 horas con ascosporas e incubadas con WGA-Alexa flúor 488 nm. Control (+), homogenado de flores tratados con ascosporas sin antagonista; Control (-), homogenado de flores tratado sin ascosporas ni antagonistas. Las medias agrupadas con la misma letra en las diferentes barras no son diferentes de acuerdo a Tukey, 0.05%.

Tratamiento	Promedio de infección Fluorescencia 62 horas
105	*153.48 <sup>a</sup>
150	*142.44 <sup>ab</sup>
OX32	79.17 <sup>cd</sup>
Benomilo (fungicida)	119.76 <sup>abc</sup>
Biocolonizer (prod. Comercial)	91.21 <sup>cd</sup>
Control (+)	137.47 <sup>ab</sup>
Control (-)	36.52 <sup>d</sup>

\* Diferentes letras representan diferencias significativas (Tukey, 0.05%).



La figura 11 muestra el efecto de los siete tratamientos probados sobre la infección por ascosporas de *S. sclerotiorum* por cuantificación con WGA a las 0, 12, 24 y 62 horas posteriores a la infección. En ausencia de ascosporas (control negativo), las flores presentaron una fluorescencia basal entre 20 y 40 (línea azul claro), mientras que en el control positivo, es decir el tratamiento con ascosporas y sin antagonistas (línea amarilla), el aumento de fluorescencia fue constante a lo largo del experimento hasta llegar a las 130 unidades arbitrarias de fluorescencia. En este experimento, el aislado 150 tuvo un efecto promotor en la infección por *S. sclerotiorum* en flores. Hasta las 24 horas, los tratamientos con el aislado 105, OX32, Biocolonizer y Benomilo no mostraron diferencia con el control positivo, sin embargo, a las 62 horas, el aislado OX32 y el producto comercial Biocolonizer tuvieron un efecto protector contra *S. sclerotiorum* al presentar menor proliferación del hongo con respecto al control positivo de manera significativa (Figura 11 y Tabla 5). Es interesante observar que el fungicida benomilo no tuvo un efecto protector contra la germinación de ascosporas en este experimento.



**Figura 11.** Unidades arbitrarias de fluorescencia de homogenados de flores tratadas con antagonistas y ascosporas de *S. sclerotiorum* a diferentes horas post infección. Control pos. (+), homogenado de flores tratados con ascosporas sin antagonista; Control neg. (-), homogenado de flores tratado sin ascosporas ni antagonistas.



## **7.4 Efecto de los aislados antagonistas sobre la infección miceliogénica en hojas escindidas de frijol**

### **7.4.1 Experimento dosis-respuesta**

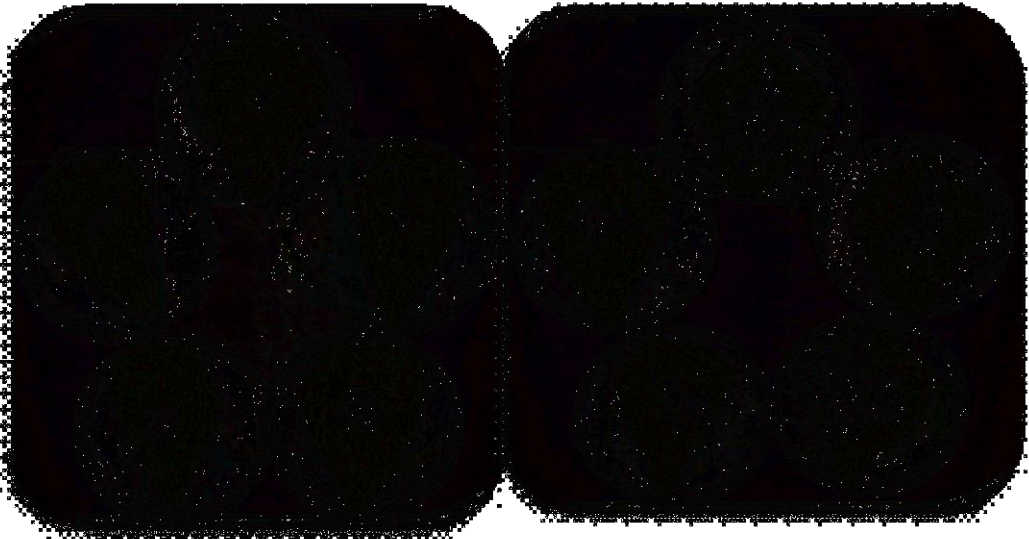
Se probó el efecto antagónico al crecimiento micelial de *S. sclerotiorum* de los aislados 105 y 150 en hojas de frijol colocadas en cámaras húmedas. Experimentos análogos con OX32 fueron llevados a cabo en un trabajo previo (López-Rodríguez, 2010). Para analizar el efecto de *B. subtilis* en la proliferación de micelio, hojas de frijol escindidas fueron asperjadas con diluciones de los aislados 105 y 150 (a partir de una suspensión de máxima concentración de  $2.89 \times 10^8$  UFC/ml y  $2.45 \times 10^8$  UFC/ml, respectivamente). Con el objetivo de probar algún efecto sinérgico entre los aislados 105 y 150, se probó también una mezcla de ambos en una relación 1:1. Se evaluó el diámetro de la lesión del disco micelial del hongo sobre las hojas escindidas. Cabe mencionar que previo a este experimento se realizó una prueba donde se sembraron los aislados 105 y 150 en una caja con LB sólido para evaluar el efecto sinérgico de ambos aislados y usarlos en combinación. Los aislados 105, 150 y la mezcla utilizados en su máxima concentración (aprox.  $2.50 \times 10^8$ ) redujeron el nivel de daño producido por el micelio del hongo con respecto al control sin bacteria (control agua) de manera significativa, y no fueron diferentes al fungicida benomilo (Tabla 7 y Figura 12).

**Tabla 7.** Efecto de los aislados 105 y 150 sobre la infección miceliogénica en hojas desprendidas de frijol a diferentes concentraciones. La tabla muestra los promedios del diámetro de la lesión (cm) producido por el micelio del hongo en las hojas.

<b>Tratamiento</b>	<b>Concentración inoculada X10<sup>6</sup></b>
105	*0.97 <sup>cde</sup>
150	*0.83 <sup>de</sup>
Mezcla 105 y 150	*0.77 <sup>e</sup>
Benomilo (fungicida)	*0.40 <sup>e</sup>
Control agua	2.20 <sup>ab</sup>

\*Las medias agrupadas con diferente letra en las diferentes columnas son diferentes respecto al control con agua de acuerdo a Tukey, 0.05%.

En un segundo experimento, hojas de frijol fueron asperjadas con los aislados 105 y 150 a distintas concentraciones. Nuevamente se observó diferencia estadísticamente significativa en la concentración de los dos aislados a concentraciones de  $2.89 \times 10^8$  y  $2.45 \times 10^8$  UFC/ml para los aislados 105 y 150, respectivamente, y también mostraron diferencia significativa la mezcla y el benomilo respecto al control con agua. No se observó diferencia significativa de ningún aislado a menores concentración ( $2.89 \times 10^7$  y  $2.45 \times 10^7$  UFC/ml, para los aislados 105 y 150 respectivamente) y solo el fungicida mostró diferencia significativa respecto al control de agua (Tabla 8). Estos resultados indican que los aislados 105, 150 y la mezcla de ambos tienen un efecto inhibitorio a la infección micelial del hongo dependiente de la concentración.



**Figura 12.** Efecto del aislado 105 (a) y el control de agua (b) sobre hojas infectadas con tejido micelial. La flecha roja señala el disco de micelio del hongo y el círculo irregular amarillo indica la necrosis (diámetro color café alrededor del disco) provocada por el hongo sobre el tejido foliar.

**Tabla 8.** Efecto de los aislados 105 y 150 sobre la infección miceliogénica en hojas desprendidas de frijol a diferentes concentraciones.

Tratamiento	Concentración inoculada	
	X10 <sup>8</sup>	X10 <sup>6</sup>
105 (2.89X)	*1.23 <sup>bcd</sup>	1.42 <sup>ab</sup>
150 (2.45X)	*0.54 <sup>bcd</sup>	1.02 <sup>abcd</sup>
Mezcla 105 y 150	*0.72 <sup>bcd</sup>	0.86 <sup>abcd</sup>
Benomilo	*0.35 <sup>cd</sup>	*0.35 <sup>cd</sup>
Control agua	1.78 <sup>a</sup>	1.78 <sup>a</sup>

\*Las medias agrupadas con diferente letra en las diferentes columnas son diferentes respecto al control agua de acuerdo a Tukey, 0.05%.

#### 7.4 Efecto de los aislados en suelo en condiciones *in vitro*

##### 7.5.1 Experimento 1

Para analizar el efecto potencial antagonista contra la germinación de esclerocios en suelo, 20 esclerocios fueron asperjados con cada uno de los aislados 105, 150 y la mezcla de ambos (ya que presentan efecto sinérgico), colocados sobre tres diferentes suelos agrícolas de la región y se registró el número de apotecios por esclerocio. La Tabla 8 muestra las diferencias significativas encontradas en cada tratamiento y su comparación respecto al control de agua. Los datos fueron analizados con un análisis estadístico no paramétrico (Kruskal-Wallis) debido a que no resultaron normales para un análisis de varianza (ANOVA). Este análisis compara esencialmente los rangos promedios observados para las muestras, con los esperados bajo la  $H_0$ . (Hipótesis nula) y es el equivalente a un análisis de varianza de una vía. El número de apotecios producidos en cada esclerocio tratado con las bacterias 105, 150, el fungicida y el control de agua se presentan en el anexo 1. Al llevar a cabo el análisis estadístico se encontró que en el suelo 1 no hubo diferencia significativa entre los tratamientos, de tal manera que los aislados 105, 150 y la mezcla no afectan la producción de apotecios de esclerocios en dicho suelo. En el suelo 2, los aislados 105, 150 y benomilo mostraron diferencias significativas respecto al control de agua y a la mezcla, de igual forma hubo diferencia significativa entre ellos. La mezcla de los aislados no mostró un efecto sinérgico de inhibición a la germinación carpogénica en el suelo 2 ya que se comportó de manera similar que el control de agua (Tabla 9). En el suelo 3 el aislado 105, 150, benomilo y mezcla mostraron diferencia significativa con el control de agua. Se demuestra que el aislado 105 posee un mejor efecto protector en la germinación carpogénica de esclerocios de *S. sclerotiorum* que el resto de los tratamientos y sobre todo del control ya que se muestra mas alejado.

**Tabla 9.** Efecto de los aislados sobre esclerocios germinados carpogénicamente (producción de apotecios). Se analizaron 20 esclerocios por tratamiento en tres distintos suelos agrícolas de la región. Suelo 1: Sr. Enrique Norzagaray, suelo 2: INIFAP-CEVAF, suelo 3: Campo experimental Miguel Leyson.

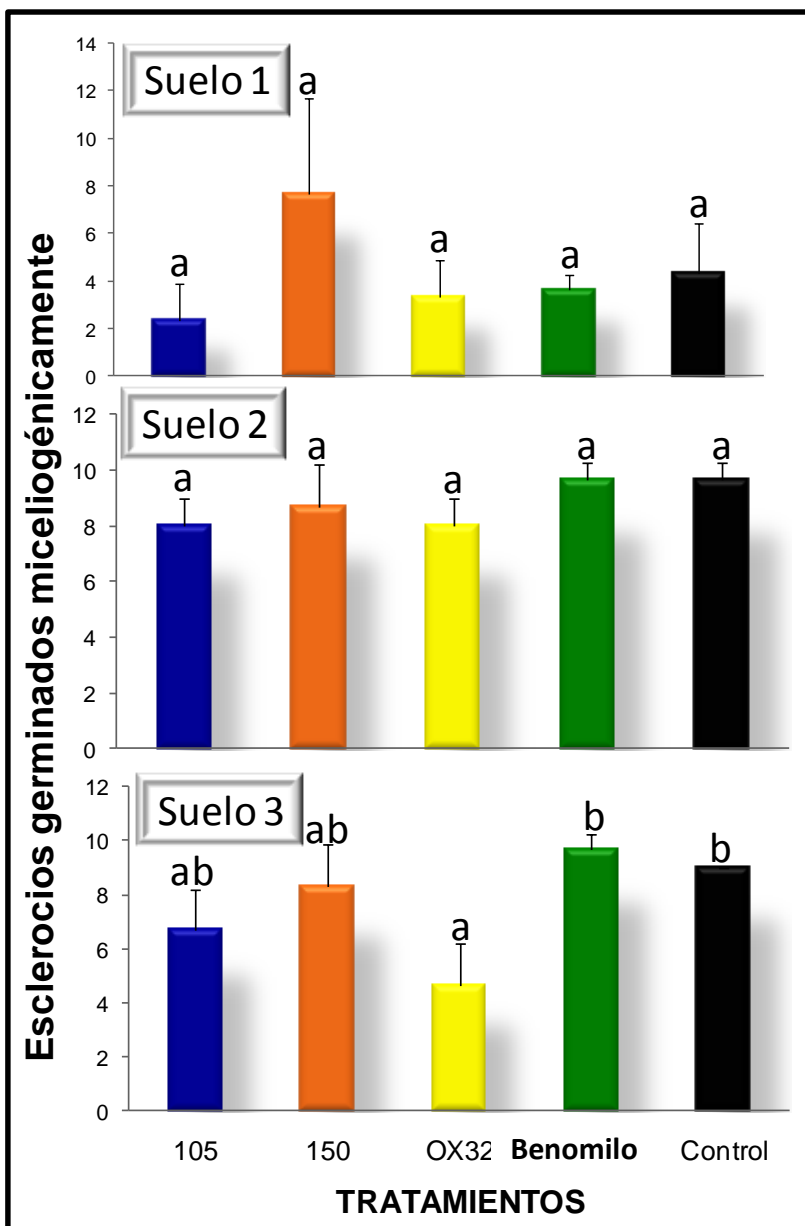
<b>Efecto en la producción de apotecios de esclerocios en suelo</b>					
<b><u>Suelo 1</u></b>					
Tratamientos	105	150	Benomilo (fungicida)	Mezcla (105-150)	Control
No hubo diferencia en el análisis Kruskal-Wallis Por lo tanto no se aplicó prueba Tukey					
<b><u>Suelo 2</u></b>					
Tratamientos	<b>105</b> <b>d</b>	<b>150</b> <b>c</b>	<b>Benomilo (fungicida)</b> <b>b</b>	<b>Mezcla (105-150)</b> <b>a</b>	<b>Control</b>
<b><u>Suelo 3</u></b>					
Tratamientos	<b>105</b> <b>d</b>	<b>150</b> <b>c</b>	<b>Benomilo (fungicida)</b> <b>c</b>	<b>Mezcla (105-150)</b> <b>b</b>	<b>Control</b> <b>a</b>

Las letras en negrita indican diferencias significativas entre los tratamientos en los suelos, tratamientos que presentan la misma letra y la misma línea no son estadísticamente diferentes entre sí. Tratamientos agrupados con letra distinta representan diferencia significativa.

### 7.5.2 Experimento 2

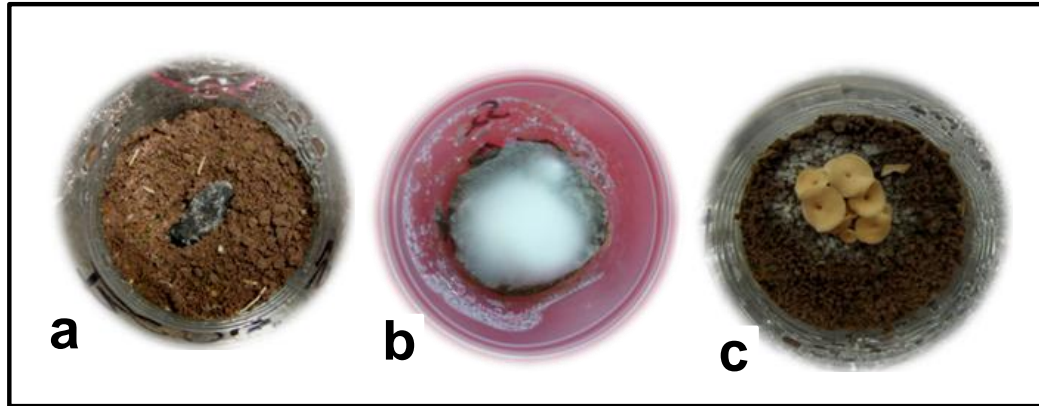
Se realizó un segundo experimento de suelo para corroborar los resultados anteriores, se probaron los aislados 105, 150 y el aislado adicional OX32 en los tres tipos de suelos agrícolas estudiados en el primer experimento. Debido a que en el primer experimento se observó variabilidad en los esclerocios, se decidió utilizar 10 réplicas por tratamiento. En este experimento los esclerocios mostraron producción miceliogénica (producción de micelio) y no carpogénica (producción de apotecios), por lo tanto para conocer el efecto de los aislados se evaluó el número de esclerocios que produjeron micelio y se calculó el promedio por tratamiento por cada

una de las repeticiones de cada bloque. Solamente el aislado OX32 del suelo 3 mostró diferencia estadísticamente significativa respecto al control de agua, lo cual indica que dicho aislado posee un efecto de protección a la germinación micelial de esclerocios en suelo (Figura 13 y 14), pero este efecto es dependiente del suelo empleado.



**Figura 13.** Promedio de esclerocios germinados miceliogénicamente. Se analizaron 10 esclerocios por tratamiento en tres distintos suelos agrícolas de la región. Suelo 1:

Sr. Enrique Norzagaray, suelo 2: INIFAP-CEVAF, suelo 3: Campo experimental Miguel Leyson.



**Figura 14.** Ensayo a nivel laboratorio de esclerocios en suelos agrícolas contenidos en recipientes. (a) esclerocio sin germinar, (b) esclerocio germinado miceliogénicamente, (c) esclerocio germinado carpogénicamente (apotecios).

### 7.5.1 Propiedades físico-químicas de los suelos probados *in vitro*

En el laboratorio de nutrición vegetal de CIIDIR-Sinaloa se realizaron los análisis físico-químicos correspondientes a los tres suelos probados en los ensayos *in vitro*. Los resultados indicaron que los tres suelos (suelo 1, 2 y 3) tienen alto contenido en potasio, calcio, magnesio, cobre y zinc, son bajos en materia orgánica y muy bajos en salinidad. Los suelos 1 y 3 son neutros, altos en manganeso y muy bajos en hierro, mientras que el suelo 2 es ligeramente básico, bajo en manganeso y con un alto contenido en hierro, el suelo 3 tiene alto contenido en sodio. La textura y estructura de los tres suelos es diferente, el suelo 1 es arcilloso-limoso, el suelo 2 es franco-arcilloso y el suelo 3 es arcilloso (Tabla 10).

**Tabla 10.** Análisis físico-químicos de los tres suelos agrícolas utilizados en el ensayo de germinación de esclerocios.

Análisis	Suelo 1	Suelo 2	Suelo 3	Referencia
pH	7.1	7.5	7.1	6.6-7.3 neutro
CE mmhos	0.19	0.12	0.14	< 2.0 (salinidad despreciable)
% MO	1.04	1.11	1.35	<1.5 (bajo)
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (ppm)	36	38	20	No para nitrato
P medido por Olsen (mg/kg)	29.7	41.17	20.58	<10 (bajo)
K (Cmol/kg)	3.58	2.39	3.01	0.9-1.75 (alto)
Ca (Cmol/100g)	20.74	19.35	22.96	14-20 (alto)
Mg (Cmol/kg)	9.5	4.9	10.59	>4.0 (muy alto)
Na (Cmol/kg)	1.3	1.3	1.73	1.0-1.5 (alto)
Fe (ppm)	7.2	20.72	7.2	>9 (adecuado)
Cu (ppm)	7.29	7.94	7.94	>1.3 (adecuado)
Zn (ppm)	2.04	1.96	2.38	>1.5 (adecuado)
Mn (ppm)	18.3	4.57	9.15	>8 (adecuado)
Textura	Arcilloso-limoso	Franco-arcilloso	Arcilloso	

## 7.6. Ensayo del efecto de los aislados a nivel de campo

### 7.6.1 Recolección de muestras de suelo del cultivo experimental

Antes de realizar las labores previas a la siembra del frijol en el campo experimental (Miguel Leyson) se colectaron muestras de suelo de distintos puntos de la unidad experimental del establecimiento del cultivo de frijol para el análisis físico-químico del suelo de cultivo. Se muestrearon 6 puntos y en cada punto se tomaron dos muestras de suelo a 30 cm de profundidad para el análisis físico-químico del suelo midiendo con una cinta métrica para la obtención de la capa de suelo. Se tomaron las coordenadas de cada punto muestreado sobre la superficie experimental y fueron las siguientes (Tabla 11):



**Tabla 11.** Coordenadas geográficas de los seis puntos de muestreo.

Puntos	Coordenadas	
	N	W
1	25° 29.972´	108° 22.560´
2	25° 29.982´	108° 22.538´
3	25° 29.989´	108° 22.553´
4	25° 29.994´	108° 22.539´
5	25° 30.003´	108° 22.560´
6	25° 30.003´	108° 22.539´

### 7.6.2 Propiedades físico-químicas del suelo del cultivo de frijol

El tipo de suelo en el que se estableció el experimento es de tipo arcilloso, con pH ácido de 5.8, pobre en materia orgánica (0.9%) y ligeramente salino (Tabla 12).

**Tabla 12.** Resultados de los análisis físico-químicos del suelo experimental del cultivo.

Análisis	Valor	Referencia
pH	5.8	6.6-7.3 neutro
CE mmhos	2	< 2.0 (salinidad despreciable)
% MO	0.9	<1.5 (bajo)
P medido por Olsen (mg/kg)	41.76	<10 (bajo)
K (Cmol/kg)	3.01	0.9-1.75 (alto)
Ca (Cmol/100g)	19.35	14-20 (alto)
Mg (Cmol/kg)	10.95	>4.0 (muy alto)
Na (Cmol/kg)	1.73	1.0-1.5 (alto)
Fe (ppm)	7.2	>9 (adecuado)
Cu (ppm)	4.89	>1.3 (adecuado)
Zn (ppm)	2.38	>1.5 (adecuado)
Mn (ppm)	9.15	>8 (adecuado)
Textura	Arcilloso	

### 7.6.3 Porcentaje de germinación de plantas

Se obtuvo un promedio general de 73.28% de germinación de lote de semillas utilizadas.

### 7.6.4 Efecto de los aislados en el desarrollo de las plantas de frijol

La altura de las plantas (Tabla 13) fue determinada a los 51 días después de la siembra y el análisis de los datos mostró diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05\%$ ) en el tratamiento 150 foliar con relación al tratamiento Biocolonizer foliar, cuyas alturas medias fueron 58 cm y 48.4 cm respectivamente, mostrando que el tratamiento 150 foliar tiene efecto positivo sobre el desarrollo de la planta con respecto al resto de los tratamientos y al control agua, mientras que biocolonizer foliar es el tratamiento en el que las plantas lograron menor altura respecto al resto de los tratamientos y al control en esta etapa del cultivo. Sin embargo, esto no se mantuvo a lo largo del cultivo, ya que a los 109 días no se encontraron diferencias significativas en los tratamientos para esta variable. Se observó que al comparar las medias de la variable de respuesta “número de vainas” a los 51 días, el aislado 105-suelo resultó significativamente diferente en relación al control agua, y no hubo diferencia significativa en la variable “número de flores” entre los tratamientos. A los 62 y 109 días no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos para estas variables (número de flores y vainas).

**Tabla 13.** Promedio del número de vainas y flores durante la etapa del cultivo.

Tratamiento	51 días			62 días		109 días
	Altura (cm)	Flores (No.)	Vainas (No.)	Flores (No.)	Vainas (No.)	Vainas (No.)
105 suelo	50.86 <sub>ab</sub>	7.44 <sub>ab</sub>	*4.67 <sub>b</sub>	0.67 <sub>a</sub>	6.56 <sub>a</sub>	130.67 <sub>a</sub>
105 foliar	51.6 <sub>ab</sub>	14 <sub>a</sub>	13.78 <sub>ab</sub>	1.11 <sub>a</sub>	6.22 <sub>a</sub>	121.33 <sub>a</sub>
150 suelo	51.13 <sub>ab</sub>	6.89 <sub>ab</sub>	9.11 <sub>ab</sub>	1.22 <sub>a</sub>	6.89 <sub>a</sub>	167 <sub>a</sub>
150 foliar	58 <sub>a</sub>	11.44 <sub>ab</sub>	15.11 <sub>ab</sub>	1.89 <sub>a</sub>	9.44 <sub>a</sub>	129.33 <sub>a</sub>
OX32 suelo	54.83 <sub>ab</sub>	9.89 <sub>ab</sub>	13.22 <sub>ab</sub>	2.89 <sub>a</sub>	7.22 <sub>a</sub>	136 <sub>a</sub>
OX32 foliar	54.67 <sub>ab</sub>	5.11 <sub>ab</sub>	12.89 <sub>ab</sub>	2.56 <sub>a</sub>	8.11 <sub>a</sub>	142 <sub>a</sub>
Benomilo (fungicida)	54.17 <sub>ab</sub>	4.89 <sub>ab</sub>	15 <sub>ab</sub>	1.67 <sub>a</sub>	12.33 <sub>a</sub>	145.33 <sub>a</sub>
Biocolonizer (prod. Comercial) suelo	47.98 <sub>b</sub>	7.11 <sub>ab</sub>	8.22 <sub>ab</sub>	0.67 <sub>a</sub>	6.56 <sub>a</sub>	122 <sub>a</sub>
Control agua	52.4 <sub>ab</sub>	9.78 <sub>ab</sub>	*18.78 <sub>a</sub>	1.67 <sub>a</sub>	7.56 <sub>a</sub>	129.33 <sub>a</sub>
Biocolonizer (prod. Comercial) foliar	48.4 <sub>b</sub>	4.0 <sub>a</sub>	5.56 <sub>b</sub>	3.11 <sub>a</sub>	11.0 <sub>a</sub>	130 <sub>a</sub>

\*Las medias agrupadas con diferente letra en las diferentes columnas son diferentes respecto al control agua de acuerdo a Tukey, 0.05%.

### 7.6.5 Efecto de los aislados en la incidencia y severidad de la enfermedad

En los registros de la enfermedad de moho blanco a los 82, 90 y 109 días después de sembrado el frijol no se presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05\%$ ) en la incidencia de la enfermedad; de igual manera no se encontraron diferencias significativas en la severidad de las plantas enfermas por moho blanco respecto al control de agua (Tabla 14, 15 y Figura 15).

**Tabla 14.** Análisis estadístico del efecto de los aislados sobre la incidencia y severidad de moho blanco en las plantas de frijol en campo. Datos separados por tipo de aplicación (aplicación en suelo).

Tratamiento	82 días		90 días		109 días	
	Incidencia (%)	Severidad (%)	Incidencia (%)	Severidad (%)	Incidencia (%)	Severidad (%)
Aislado 105 suelo	0.98 <sub>a</sub>	0.20 <sub>a</sub>	0.64 <sub>a</sub>	0.67 <sub>a</sub>	0.65 <sub>a</sub>	0.33 <sub>a</sub>
Aislado 150 suelo	1.49 <sub>a</sub>	0.50 <sub>a</sub>	1.19 <sub>a</sub>	0.61 <sub>a</sub>	0.21 <sub>a</sub>	0.33 <sub>a</sub>
Aislado OX32 suelo	0.89 <sub>a</sub>	0.20 <sub>a</sub>	0.30 <sub>a</sub>	0.33 <sub>a</sub>	0.30 <sub>a</sub>	0.33 <sub>a</sub>
Biocolonizer (prod. Comercial) suelo	1.01 <sub>a</sub>	0.30 <sub>a</sub>	1.35 <sub>a</sub>	0.28 <sub>a</sub>	0.67 <sub>a</sub>	0.33 <sub>a</sub>
Benomilo (fungicida)	0.61 <sub>a</sub>	0.46 <sub>a</sub>	1.53 <sub>a</sub>	0.59 <sub>a</sub>	0.32 <sub>a</sub>	0.33 <sub>a</sub>
Control agua	0.00 <sub>a</sub>	0.00 <sub>a</sub>	0.66 <sub>a</sub>	0.63 <sub>a</sub>	0.31 <sub>a</sub>	0.10 <sub>a</sub>

**Tabla 15.** Análisis estadístico del efecto de los aislados sobre la incidencia y severidad de moho blanco en las plantas de frijol en campo. Datos separados por tipo de aplicación (aplicación foliar).

Tratamiento	82 días		90 días		109 días	
	Incidencia (%)	Severidad (%)	Incidencia (%)	Severidad (%)	Incidencia (%)	Severidad (%)
Aislado 105 foliar	1.06 <sub>a</sub>	0.24 <sub>a</sub>	1.74 <sub>a</sub>	0.56 <sub>a</sub>	0.71 <sub>a</sub>	0.33 <sub>a</sub>
Aislado 150 foliar	1.31 <sub>a</sub>	0.30 <sub>a</sub>	1.29 <sub>a</sub>	0.25 <sub>a</sub>	1.31 <sub>a</sub>	0.67 <sub>a</sub>
Aislado OX32 foliar	0.30 <sub>a</sub>	0.20 <sub>a</sub>	0.69 <sub>a</sub>	0.33 <sub>a</sub>	0.00 <sub>a</sub>	0.00 <sub>a</sub>
Biocolonizer (prod. Comercial) foliar	2.05 <sub>a</sub>	0.70 <sub>a</sub>	1.48 <sub>a</sub>	1.00 <sub>a</sub>	1.49 <sub>a</sub>	0.69 <sub>a</sub>
Benomilo (fungicida)	0.61 <sub>a</sub>	0.46 <sub>a</sub>	1.53 <sub>a</sub>	0.59 <sub>a</sub>	0.32 <sub>a</sub>	0.33 <sub>a</sub>
Control agua	0.00 <sub>a</sub>	0.00 <sub>a</sub>	0.66 <sub>a</sub>	0.63 <sub>a</sub>	0.31 <sub>a</sub>	0.10 <sub>a</sub>

Las medias agrupadas con la misma letra en las diferentes columnas no son diferentes respecto al control agua de acuerdo a Tukey, 0.05%.





**Figura 15.** Severidad de las plantas, medida de acuerdo a la escala establecida por Yang, (2009). a) Planta de frijol del tratamiento 105 foliar a los 82 días con nivel 3 de severidad, b) Trat. 105 foliar a los 90 días con 9 de severidad, c) y d) Trat. Control agua a los 90 días con 9 de severidad, en el panel c se observa una vaina completamente infectada por el hongo junto al tallo de la planta infectando a esta; e) Trat. fungicida benomilo a los 82 días con 7 de severidad, f) Trat. fungicida benomilo a los 90 días con 9 de severidad, g) Trat. Biocolonizer foliar a los 82 días con 3 de severidad por infección solo en vaina, h) Trat. Biocolonizer foliar a los 90 días con 7 de severidad, i) Trat. Biocolonizer foliar a los 109 días con 9 de severidad observándose esclerocios dentro de la vaina y tallo. Los círculos en color rojo en las imágenes muestran los signos (esclerocios) y síntomas (micelio blanco algodonoso) característicos de la enfermedad de moho blanco sobre la planta infectada.

#### **7.6.6 Cosecha del frijol**

El cultivo de frijol fue cosechado a los 110 días; la cosecha de las plantas se realizó manualmente, las plantas de las parcelas útiles de cada tratamiento fueron cortadas y separadas por lotes para evitar que se mezclara un tratamiento con otro, posteriormente las plantas fueron trasladadas a las instalaciones del CIIDIR-Sinaloa para dejar secarse a temperatura ambiente durante 15 días. Transcurrido ese tiempo las vainas se mostraron completamente secas y fueron cosechados los granos de frijol manualmente, de los cuales se tomaron datos de peso y porcentaje de humedad.

#### **7.6.7 Medición de humedad y rendimiento de granos de frijol**

El rendimiento total del cultivo de frijol de las parcelas útiles de todos los tratamientos se muestra en la Tabla 16. No se encontró diferencia significativa en los tratamientos, éstos fueron estadísticamente iguales al control agua. El promedio de humedad en los granos de frijol fue de 10.07%, y no se observaron diferencias significativas en los tratamientos y el control agua para esta variable ya que todos los tratamientos presentaron porcentajes similares de humedad (Tabla 16).

**Tabla 16.** Rendimiento de frijol obtenido de cada parcela útil experimental y porcentaje de humedad en granos de frijol.

Tratamiento	15 días después de cosechado		
	Rendimiento (Kg)	Rendimiento (t ha <sup>-1</sup> )	Humedad (%)
Aislado 105 suelo	1.12 <sup>a</sup>	1.9 <sup>a</sup>	9.93 <sup>a</sup>
Aislado 105 foliar	1.05 <sup>a</sup>	1.8 <sup>a</sup>	9.97 <sup>a</sup>
Aislado 150 suelo	0.93 <sup>a</sup>	1.6 <sup>a</sup>	10.00 <sup>a</sup>
Aislado 150 foliar	1.07 <sup>a</sup>	1.8 <sup>a</sup>	10.03 <sup>a</sup>
Aislado OX32 suelo	1.07 <sup>a</sup>	1.7 <sup>a</sup>	10.00 <sup>a</sup>
Aislado OX32 foliar	1.05 <sup>a</sup>	1.8 <sup>a</sup>	10.17 <sup>a</sup>
Benomilo (fungicida)	1.10 <sup>a</sup>	1.9 <sup>a</sup>	10.23 <sup>a</sup>
Biocolonizer (prod. Comercial) suelo	1.13 <sup>a</sup>	1.8 <sup>a</sup>	10.10 <sup>a</sup>
Control agua	1.07 <sup>a</sup>	1.7 <sup>a</sup>	10.10 <sup>a</sup>
Biocolonizer (prod. Comercial) foliar	1.27 <sup>a</sup>	2.0 <sup>a</sup>	10.17 <sup>a</sup>

Las medias agrupadas con la misma letra en las diferentes columnas no son diferentes respecto al control agua de acuerdo a Tukey, 0.05%.

## 8. DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se probó la efectividad de aislados microbianos nativos de suelos de la región (105, 150, mezcla de ambos y OX32) en experimentos *in vitro* y en campo contra *S. sclerotiorum*. Para esto, se caracterizaron los aislados 105 y 150 en cuanto a su cinética de crecimiento, mientras que el aislado OX32 fue caracterizado previamente por López-Rodríguez (2010). De acuerdo a los resultados obtenidos en las cinéticas de crecimiento se observó que los aislados 105 y 150 crecen de manera diferencial. El aislado 105 presentó un crecimiento diáuxico, el cual es un tipo de crecimiento microbiano bifásico que tiene lugar cuando hay presente dos sustratos diferentes que pueden ser utilizados como fuente de carbono. En este tipo de crecimiento el metabolismo del organismo es selectivo para uno de los sustratos, ya que inicialmente se usa la fuente de carbono que permite un crecimiento más rápido, y cuando ésta se agota, se comienza a metabolizar el segundo sustrato. Sin embargo, en este trabajo no se realizaron experimentos adicionales para corroborar la naturaleza diáuxica del crecimiento microbiano.

El aislado 150 presentó un crecimiento distinto ya que después de la primera fase exponencial se observó la declinación del crecimiento en la curva. Es posible que esto pudiera haberse debido a que dicho microorganismo secrete una sustancia mucilaginoso y forme conglomerados en el medio de cultivo, lo que ocasione que el medio se clarifique y posiblemente sea la causa de que al tomar las lecturas de la absorbancia en cierta etapa del cultivo se observe una disminución en la misma (Figura 8). Esta conglomeración fue observada en nuestro experimento. Es posible que esto haya también afectado el conteo de UFC/ml en esta misma etapa del cultivo (Figura 10).

Inicialmente, se evaluó el efecto de los aislados antagonistas 105, 150 y OX32 sobre la infección causada por la germinación de las ascosporas sobre el tejido floral de frijol y los resultados indicaron que el aislado de OX32, previamente identificado como una cepa de *Pseudomonas putida* (López-Rodríguez, 2010), inhibe la infección causada por *S. sclerotiorum*. En este experimento también se mostró que el producto comercial Biocolonizer, mismo que está formulado a base de *Bacillus sp.*, tuvo un

efecto inhibitorio sobre la infección mediante ascosporas. Para llevar a cabo este experimento se implementó una estrategia cuantitativa, misma que no ha sido utilizada para la cuantificación de la proliferación micelial en *S. sclerotiorum*. El desarrollo de esta técnica para determinar la proliferación fúngica tiene varias ventajas tales como: 1) es una estimación cuantitativa de la infección en contraste con la estimación cualitativa utilizada para definir niveles de infección con este tipo de patógeno, 2) puede ser utilizada en pruebas con decenas o centenas de muestras, ya que el ensayo se realizó en placas de 96 pozos, 3) la técnica es rápida y puede ser parcialmente automatizada, 4) además de ser utilizada para determinar la infección por *S. sclerotiorum*, puede ser usada para otros patógenos fúngicos.

El hecho de que una cepa de *Pseudomonas putida* (OX32) resultara efectiva contra la infección por ascosporas de *S. sclerotiorum*, es consistente con otros estudios preliminares *in vitro* que han identificado a *Pseudomonas chlororaphis* PA-23 y *Pseudomonas sp.* DF41 como inhibidores efectivos del crecimiento micelial y de la germinación de ascosporas de *S. sclerotiorum* (Savchuck, 2002). Estas dos cepas bacterianas también han presentado eficacia en invernadero. En un experimento *in vitro* reportado por Fernando *et al.* (2002) se muestra que en pétalos de canola asperjados con PA-23, muy pocas ascosporas iniciaron la germinación después de las 24 y 48 horas post-infección, indicando que esa bacteria inhibe la germinación de ascosporas de *S. sclerotiorum* en tejido floral, tal como nuestras observaciones con *P. putida* en tejido floral de frijol y *S. sclerotiorum*.

Los aislados antagonistas 105, 150 y la mezcla de ambos fueron evaluados en cuanto a su capacidad de inhibir la infección producida miceliogénicamente por *S. sclerotiorum* en hojas desprendidas de frijol. Los aislados 105 y 150 resultaron ser eficaces a concentraciones de  $2.89 \times 10^8$  y  $2.45 \times 10^8$ , respectivamente, ya que en ambos experimentos (Tablas 7 y 8) se encontraron diferencias significativas de los tratamientos con respecto al control agua. Los aislados 105 y 150 fueron identificados en un estudio previo como *Bacillus subtilis* (Sotomayor-García, 2008). Existen diversos reportes en donde *Bacillus subtilis* y otras especies del género *Bacillus* han recibido mucha atención para el desarrollo de agentes de biocontrol, ya que se ha demostrado que estos microorganismos proveen un control efectivo



contra enfermedades causadas por hongos y bacterias en general. Bacterias del género *Bacillus* producen una gran cantidad de metabolitos antimicrobianos y antifúngicos. La bacteria produce compuestos antimicrobianos como zwittermicina A y kanosamina, lipopéptidos y la proteína antifúngica bacinubina (Liu *et al.*, 2007). Se ha reportado (Aunstrup *et al.*, 1972, Christianson *et al.*, 1994, Colin, 1989, Fujiwara y Yamamoto, 1987) que *Bacillus subtilis* es de las cepas más estudiadas en el área industrial por su potencial en la producción de enzimas proteolíticas alcalinas. Entre las más importantes están las de tipo serina, dentro de las que se encuentran las llamadas subtilisinas. Dado que la máxima producción de estas enzimas alcalinas se da durante la esporulación de la bacteria se deben realizar estudios sobre los principales factores que la afectan como alternativa al uso eficiente de este microorganismo en estudios *in vitro* o bien su eficacia en campo.

Se evaluaron también los dos aislados de *B. subtilis* 105 y 150 y el aislado de *P. putida* (OX32) en la germinación de esclerocios en tres diferentes suelos agrícolas de la región. Este experimento fue realizado en dos ocasiones. A pesar de que las condiciones fueron idénticas en cuanto a las condiciones en las que se incubaron los esclerocios y los suelos usados, los esclerocios se comportaron de manera diferente. En el primer experimento, los esclerocios produjeron preferentemente apotecios, es decir germinaron carpogénicamente, mientras que en el segundo experimento, los esclerocios germinaron miceliogénicamente. Aunque el comportamiento de los esclerocios fue diferente entre experimentos, fue posible determinar el efecto diferencial con respecto al control agua de las cepas OX32, 105 y 150, aunque su efectividad dependió del tipo de suelo. Cabe mencionar que los esclerocios utilizados en ambos experimentos provenían de fuentes distintas; los esclerocios del primer experimento fueron colectados inmediatamente después del ciclo de cultivo de frijol 2009-2010 y utilizados para el experimento un mes después de su colecta; el inóculo para el segundo experimento fue colectado de un cultivo agrícola de frijol del ciclo 2010-2011 y se usó dos días después de la colecta por lo que eran esclerocios jóvenes y no almacenados. Es posible entonces que la edad y almacenamiento de los esclerocios pueda ser un factor que determine la geminación miceliogénica o carpogénica. Esta hipótesis, sin embargo, permanece para ser corroborada

experimentalmente en estudios posteriores. Otra posible razón por la que la diferenciación de los esclerocios utilizados en ambos experimentos fue diferente pudo haber sido que los suelos utilizados en el segundo experimento fueron los mismos que los del primer experimento pero fueron almacenados bajo condiciones de laboratorio por un año antes de utilizarse. Los resultados obtenidos en los tres distintos tipos de suelo indican que el potencial antagonista de cada una de las cepas probadas depende del tipo de suelo en el que esté. Ya que no existe un factor físico-químico que sea, de manera evidente, el determinante para el desarrollo del antagonismo. Se considera que las diferencias en la composición de las comunidades microbianas y sus interacciones con el antagonista potencial es lo que determina la efectividad del mismo contra el patógeno y éstos pueden haber sido alterados durante el período de almacenamiento del suelo.

Como se mencionó anteriormente, ya que la efectividad de un antagonista podría depender del suelo donde se encuentre. Desde el punto de vista práctico, la aplicación en suelo no sería la más recomendable, mientras que la aplicación foliar podría arrojar resultados más consistentes. Los resultados del primer experimento indicaron que los aislados 105 y 150 inhibieron la producción de apotecios a partir de esclerocios en los suelos 2 y 3. En el segundo experimento, los aislados 105 y 150 no resultaron efectivos en la germinación miceliogénica de esclerocios en suelo; pero el aislado OX32 sí causó un efecto inhibitorio en la producción micelial sobre esclerocios en el suelo 3. En ambos experimentos ninguno de los tratamientos probados mostró algún efecto en el suelo 1. Los resultados de los análisis físico-químicos nos indican que los tres suelos tienen diferente textura y estructura, el suelo 2 y 3 presentan propiedades físico-químicas similares entre los dos suelos respecto al suelo 1. De acuerdo a los análisis físico-químicos, el suelo 1 difiere en cuanto a más K y más Mn en relación a los suelos 2 y 3.

De manera interesante, los aislados 105 y 150 resultaron efectivos para la inhibición de la germinación carpogénica en dos de los suelos probados (primer experimento), y no sobre la proliferación de tejido micelial (segundo experimento). Sin embargo, en los experimentos de infección en hoja, estos dos aislados mostraron ser efectivos como antagonistas al desarrollo de micelio (Tablas 6 y 7). Por lo tanto,

es posible que la acción inhibitoria de los aislados 105 y 150 (*Bacillus subtilis*) dependa del tejido infectado y del entorno microbiológico del mismo. La cepa OX32 (*P. putida*) resultó efectiva contra la germinación miceliogénica de esclerocios. Estos resultados complementan lo reportado por López-Rodríguez (2010), donde señala que el aislado OX32 mostró un efecto inhibitorio en la germinación de apotecios en el mismo suelo 3 utilizado en el presente trabajo. En base a los resultados obtenidos por López-Rodríguez (2010) y los del presente trabajo, el aislado OX32 resulta ser un microorganismo potencialmente eficaz tanto en la inhibición carpogénica como miceliogénica de esclerocios en suelo.

Las bacterias *Pseudomonas fluorescens* y las del género *Bacillus* son consideradas las más eficaces para controlar enfermedades foliares y de las raíces (Leucona, 1996). Dada la diversidad genética en el género *Bacillus*, tanto en el suelo como a su abundancia en la rizosfera, se considera a estos microorganismos como colonizadores eficaces (Leucona, 1996; Cordero-Ramírez, 2008). Una gran variedad de productos a base de *Bacillus* pueden encontrarse en el mercado, un ejemplo es el producto PROBACIL, el compuesto biológico presente en este producto es *Bacillus subtilis* cepa BEB-8bs el cual combate los agentes patógenos por su actividad antagónica la cual es debida a tres péptidos que se producen al final de la fase de crecimiento exponencial, posee un alto espectro de acción y su aplicación puede ser foliar, radicular e incluso en suelo (Jiménez-Delgadillo, 2001).

Aunque existe en la actualidad productos comerciales a base de microorganismos para el control de enfermedades, los productos a base de cepas no nativas introducidas a otros suelos pueden tener un efecto negativo sobre los suelos tratados con dichos productos, desplazando poblaciones de microorganismos importantes en el mantenimiento de los nichos ecológicos a nivel rizosfera, o bien funcionar solo de manera parcial por falta de previa adaptación a las diferencias en las condiciones edafogeográficas a las que se emplean.

Debido a las consecuencias nocivas que pueden ocasionar los métodos tradicionales de control químico para controlar enfermedades en plantas tales como perturbaciones en la salud humana y el medio ambiente, el control biológico

constituye una estrategia alternativa que vale la pena explorar para reducir los daños ocasionados por la enfermedad causada por el moho blanco en cultivos de frijol.

En este trabajo se propuso probar el efecto de los tres aislados antagonistas seleccionados en un cultivo de frijol en condiciones de campo en un suelo con antecedentes de infecciones previas de moho blanco y analizar el efecto de los aislados seleccionados en la incidencia y severidad de tal enfermedad. Estudios realizados por Fernando (2005), indicaron que dos cepas bacterianas del género *Bacillus* (BS6) y *Pseudomonas* (PA-23) resultaron eficaces en dos aplicaciones foliares en plantas de canola en 30% y 50% de estado de floración, mostrando un porcentaje de reducción significativo en la incidencia en tallo de las plantas infectadas por *S. sclerotiorum* en campo. Se ha mostrado la eficacia del control de un 50% con una cepa de *Bacillus* (NJ-18) y otras especies de *Bacillus* que han sido empleadas como agentes de biocontrol por su capacidad de formar endosporas como ya se mencionó. En experimentos con la cepa NJ-18 se obtuvo un control de hasta un 77% contra *S. sclerotiorum* en campo (Yang, 2009).

Por lo tanto en este trabajo, se probaron los aislados nativos de *Bacillus subtilis* 105 y 150 así como el aislado OX32 (*Pseudomonas putida*) para conocer su eficacia en el cultivo del frijol en campo y demostrar su potencial antagónico en campo y si éstos pueden llegar a ser productos de control biológico comercialmente disponibles en el sector agrícola. Esto permitiría contrarrestar el uso de fungicidas químicos que hoy en día inducen el surgimiento de mecanismos de resistencia en el patógeno y además poseen efectos negativos en el ambiente y la salud humana. Sin embargo, en el presente trabajo no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos probados ya que no se logró evaluar de manera adecuada la eficacia de los aislados sobre la enfermedad de moho blanco en las plantas de frijol bajo condiciones de campo debido a que la enfermedad se manifestó en niveles de incidencia muy bajos. Esto pudo haberse debido a que las condiciones ambientales ideales de temperatura y humedad para el desarrollo y proliferación de *S. sclerotiorum* no se presentaron durante la etapa experimental del cultivo de frijol, es decir, a pesar de haber realizado el ensayo en un sitio del campo experimental con incidencia recurrente de moho blanco, las condiciones ambientales presentes

durante el ciclo de cultivo estudiado no propiciaron la proliferación del hongo. Altas incidencias de la enfermedad de moho blanco por consecuencia de las condiciones climáticas se han reportado para el ciclo otoño-invierno 2006-2007, cuando la enfermedad de moho blanco en frijol tuvo un 75% de incidencia. Este alto porcentaje fue ocasionado por la presencia del fenómeno natural conocido como “El año de la niña” el cual provocó humedades relativas altas en el ambiente y por lo tanto las condiciones propicias para el desarrollo de la enfermedad. (Salinas-Pérez, 2011).

Es posible también que el arreglo topológico empleado particularmente en este experimento haya permitido una mejor aireación de los lotes y por lo tanto una menor incidencia de la enfermedad. Será necesario continuar en experimentos posteriores con las pruebas para determinar la efectividad de las cepas 105, 150 y OX32 en el control del moho blanco en frijol, para lo cual se recomienda aumentar la densidad de siembra y la intensidad y frecuencia de los riegos para aumentar la probabilidad del desarrollo de la enfermedad, así como también la utilización de una variedad de frijol susceptible al moho blanco tal como, por ejemplo, Pinto Saltillo. Otra posibilidad es aumentar la presión del patógeno recurriendo a infestación *in situ* de los suelos y de las plantas con el patógeno para evaluar la incidencia en el cultivo, una práctica cada vez más recurrente en estudios de esta naturaleza (Miedaner *et al.*, 2010, Löffler *et al.*, 2010 y Validov *et al.*, 2008).

El tratamiento basado en la aplicación de antagonistas nativos en campos agrícolas con incidencia de moho blanco podría llegar a ser una estrategia útil para inhibir la producción de apotecios y representa una manera potencial de controlar la dispersión del patógeno y por lo tanto de la enfermedad en la región.

## 9. CONCLUSIONES

- El aislado OX32 inhibió la infección por ascosporas de *S. sclerotiorum* en flores de frijol y la germinación miceliogénica de esclerocios en algunos tipos de suelo.
- Los aislados 105 y 150 inhiben el crecimiento micelial en hojas de frijol y pueden inhibir la germinación carpogénica de esclerocios en suelo.
- El efecto de los aislados en la germinación de esclerocios depende del tipo de suelo agrícola utilizado.
- No fue posible determinar el efecto de los aislados bacterianos sobre la incidencia y severidad de la enfermedad de moho blanco en campo, ya que la enfermedad se manifestó en niveles muy bajos
- Debido a los resultados obtenidos en condiciones de laboratorio, las cepas bacterianas 105, 150 y OX32 son candidatas para ser probadas de nuevo en cultivos de frijol como antagonistas a *S. sclerotiorum*.

## 10. LITERATURA CITADA

- Abdullah, M. T., Ali, y Suleman, P. 2008. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. Elsevier. Kuwait. 1354–1359.
- Adams, P. B. y Fravel, D. R. 1990. Economical biological control of *Sclerotinia* lettuce drops by *Sporidesmium sclerotivorum*. *Phytopathology*. 80: 1120-1124.
- Agrios, G.N.1997. *Plant Pathology*. 4<sup>th</sup> Edition. Academic Press. 635.
- Agrios, G.N.2005. *Plant Pathology*. 5<sup>th</sup> Edition. Academic Press. 922.
- Arias, L. A., Tautiva, L. A., Piedrahíta, W. y Chaves, B. 2007. Evaluación de tres métodos de control del Moho blanco (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary) en lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Agronomía Colombiana* 131-14.
- Aunstrup, K. 1972. Alkaline proteases produced by *Bacillus*. Patente US 03674643, 1972.
- Braicovich, B. 2004. Solarización. Estación Experimental Agropecuaria Bordenave. Buenos Aires, Argentina. 80.
- Boland, G. J. y Hall, R. 1987. Epidemiology of White mold of White bean in Ontario. *Ca. of Plant Pathology* 9:218-22.
- Boland, G. J. y Hall, R. 1994. Index of plants hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology*. 16: 93-100.

- Cessna, S. G., Sears, V. E., Dickman, M. B., Low, P. S., 2000. Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. *The Plant Cell*. 12: 2191–2199.
- Chupp, C. y Sherf, A. F. 1960. *Vegetable diseases and their control*. Ronald Press, New York. 43-5.
- Christianson, T. 1994. Alkaline proteases variants whit increases stability. US Patent. 5340735.
- Cordero, R. J. D. 2008. Microorganismos de la rizosfera de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) como antagonistas de *Fusarium oxysporum* f. sp *radicis-lycopersici*. Tesis de Maestría. CIIDIR-Sinaloa, IPN.
- Colin, H. R. *Bacilus*. 1989. New York: Plenum Press, ISBN 0-306-43137-8.
- Cook, G. E., Steadman, J. R. y Boosallis. 1977. Survival of *Whetzelinia sclerotiorum* and initial infection of dry edible beans in Westerns Nebraska. *Phytopathology*. 65: 250-255.
- Cook, R. J. y Baker, K. F. 1983. *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. St. Paul. American Phytopathological Society. 539.
- Cundom, M. A., Mazza, G., Silvia, M., Mazzanti, C., Gutiérrez, A. M. A., Susana A., y Coutinho, M. 1999. Actividad Antagónica *in vitro* de Hongos Saprófitos sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. Cátedra de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE Sargento Cabral. 2131.



- Donellan, J. E. 1964. Chemically defined, synthetic media for sporulation and for germination and growth of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriology. 87 (2).
- Elsevier, B. 2005. *Sclerotinia sclerotiorum*: When “be or not to be” a pathogen. Federation of European Microbiological Societies (FEMS). Microbiol. Lett. 251(2), 177-184.
- Fokkema, N. J. 1993. Opportunities and problems of control of foliar diseases with microorganisms. Pestic. Sci. 31: 411–416.
- Fernando D. W. G., Nakkeeran S. y Zhang S. S. 2006. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus species* on canola petals. Science direct. Crop Protection. 26: 100–107.
- Fujiwara, N. y Yamamoto, K. 1987. Production of alkaline protease in a low-cost medium by Alkalophilic *Bacillus sp.* J. Ferment. Technol. 63 (3).
- Garza, G., J. A., Neuman, S., Vyn, T.J. y Boland, G.J. 2002. Influence of crop rotation and tillage on production of apothecia by *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Pathology. 24: 137–143.
- Gossen, B. D., Rimmer, S. R. y Holley, J. D. 2001. First Report of Resistance to Benomyl Fungicide in *Sclerotinia sclerotiorum*. Agriculture and Agri-Food Canada, Saskatoon. Vol 85. 11: 1206.
- Godoy, G., Steadman, J. R. y Yuen, G. 1990. Bean blossom bacteria have potential for biological control of white mold disease caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. Annu. Rep. Bean. Improv. Coop. 33: 45–46.

- Godoy, G., Steadman J. R, Dickman, M. B, y Dam, R. (1990). Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiology. Mol. Plant Pathol.* 37: 179–191.
- Itamar, S. M., Jane L. F. y Rosely S. N. 2006. Antagonism of *Aspergillus terreus* to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Brazilian Journal of Microbiology.* 37: 417-419.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2009.
- Jiménez, D. R., Virgen, C. G., Tabares, F. S. y Olalde, P. V. 2001. Bacterias promotoras del crecimiento de plantas: agro-biotecnología. *Avance y Perspectiva* vol. 20. 395-400.
- Jones E. E. y Stewart, A. 2000. Selection of mycoparasites of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* isolated from New Zealand soils. *New Zealand journal of Crop and Horticultural Science.* 28:105-114.
- Knudse, G. R., Eschen, D. J., Dandurand, L. M. y Bin, L. 1991. Potential of biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* through colonization of sclerotia by *Trichoderma hardzianum*. *Plant Disease.* 5: 466-470.
- Lecuona, R. E. 1996. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Argentina. 338 p.
- Liu, Y.F., Chen, Z.Y., Ng, T.B., Zhang, J., Zhou, M.G., Song, F.P., Lu, F., Liu, Y.Z., 2007. Bacisubin, an antifungal protein with ribonuclease and hemagglutinating activities from *Bacillus subtilis* strain B-916. *Peptides* 28, 553–559.

- Löffler, M., Kessel, B., Ouzunova, M. y Miedaner, T. 2010. Covariation between line and testcross performance for reduced mycotoxin concentrations in European maize after silk channel inoculation of two *Fusarium* species. Springer-Verlag. 122:925–934.
- López, R. O. D. 2010. Microorganismos que utilizan oxalato de calcio como antagonistas potenciales a *Sclerotinia sclerotiorum* en frijol. Tesis de Maestría. CIIDIR-Sinaloa, IPN.
- McLaren, D. L., Huang, H. C. y Rimmer, S. R. 1986. Hyperparasitism of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Talaromyces flavus*. Canadian J. Plant Pathology. 8: 43-48.
- Melo, I. S., Faull, J. L. y Nascimento, R. S. 2006. Antagonism of *Aspegillus terreus* to *Sclerotinia sclerotiorum*. Brazialian journal of Microbiology. 37: 417-419.
- Miedaner, T., Bolduan, C. y Melchinger, A. E., 2010. Aggressiveness and mycotoxin production of eight isolates each of *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides* for ear rot on susceptible and resistant early maize inbred lines. Springer. 127:113–123.
- Purdy, L. H. 1979. *Sclerotinia sclerotiorum*. History, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. Phytopathology 69: 875-880.
- Ridao, A. C., 2006. Importancia y manejo de la pudrición húmeda del tallo de soja por *Sclerotinia*. Visión Rural Año XIII N° 64.
- Saito, I. 1977. Studies on the maturation and germination of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary, a causal fungus of bean stem rot. Hokkaido prefecture. Central Agricultural Experimental Station. Bulletin No 26.

- Santos, A. F. y Dhingra, D. D. 1982. Pathogenicity of *Trichoderma spp.* on the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. Canadian J. Bot., 60: 472- 475.
- Salinas, P. R. A. y Rodríguez, C. F. G. 2008. Impacto del mejoramiento genético del frijol en Sinaloa: variedad “azufrado higuera”. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias Centro de Investigación Regional del Noroeste Campo Experimental Valle del Fuerte.
- Salinas, P. R. A. 2011. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias Centro de Investigación Regional del Noroeste Campo Experimental Valle del Fuerte. Comunicación personal.
- Savchuk, S. C., 2002. Evaluation of biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* on canola (*Brassica napus*) in the lab, in the greenhouse, and in the field. Tesis de grado de Maestría en Ciencias, University de Manitoba. 49–83.
- Schwartz, H. F., Pastor, C. M. A., Valencia, G., y Bejarano, O. L. 1988. El moho blanco del frijol y su manejo. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Co. 35.
- Sotomayor, G. L. G. 2008. Selección e identificación de antagonistas microbianos contra esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum*. Tesis de Licenciatura. CIIDIR-Sinaloa, IPN.
- Validov, S. Z., Kamilova, F., y Lugtenberg, B. J. J. 2008. *Pseudomonas putida* strain PCL1760 controls tomato foot and root rot in stonewool under industrial conditions in a certified greenhouse. Elsevier. 6-11.

Willetts, H. J y J. A. L. Wong, 1980. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. Trifoliorum*, and *S. Minor* with emphasis on specific nomenclature. The Botanical Review. 46: 101-165.

Yang, D., Wang, Bo., Wang, J., Chen, y., Zhou, M. 2009. Activity and efficacy of *Bacillus subtilis* strain NJ-18 against rice sheath blight and *Sclerotinia* stem rot of rape. Elsevier. China. 61-65.

Zhang, X. L., Sun, X. M., Zhang, G. F., 2003. Preliminary report on the monitoring of the resistance of *sclerotinia libertinia* to carbendazim and its internal management. Pesticide Science and Administration 24:18–22.

Zhang, Y. 2004. Biocontrol of *Sclerotinia* stem rot of canola by bacterial antagonists and study of biocontrol mechanisms involved. Tesis de grado de Maestría en Ciencias. Universidad de Mantioba Cánada. 137.

### **Sitios de internet**

<http://www.inegi.gob.mx/inegi/default.aspx>

<http://www.sib.gov.ar/taxonomia/genero/sclerotinia>

## ANEXOS

**Anexo 1.** Número de apotecios que produjo cada esclerocio tratado en los 3 suelos.

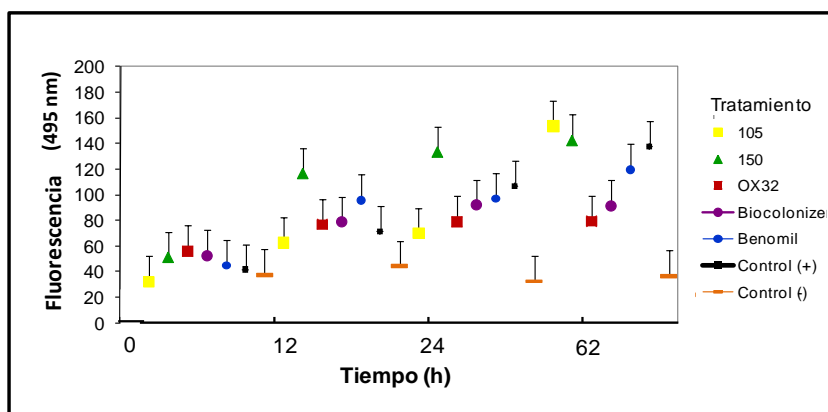
Esclerocio #	suelo 1				
	Tratamientos			Benomil	Control
	105	150	Mezcla (105-150)		
1	3	0	0	10	4
2	4	3	1	4	0
3	0	0	0	7	12
4	0	4	7	8	0
5	0	0	4	4	15
6	0	4	0	0	13
7	0	0	0	0	7
8	5	0	0	0	0
9	1	0	2	6	4
10	6	16	5	0	6
11	2	0	0	3	0
12	4	0	5	5	2
13	0	0	8	9	7
14	0	7	0	0	0
15	0	0	0	11	14
16	0	15	0	5	4
17	0	0	5	5	4
18	0	4	3	0	0
19	7	10	8	4	0
20	0	14	3	0	0

Esclerocio #	suelo 2				
	Tratamientos			Benomil	Control
	105	150	Mezcla (105-150)		
1	5	0	7	0	3
2	5	0	0	3	13
3	0	0	7	0	4
4	0	0	5	2	10
5	0	6	13	8	0
6	2	9	4	6	3
7	0	4	16	1	0
8	2	0	25	7	9
9	0	2	1	4	6
10	2	0	3	12	4
11	0	0	2	0	4
12	0	4	11	5	0
13	0	0	4	9	11
14	0	7	6	0	0
15	0	6	4	0	7
16	3	4	4	4	5
17	2	3	0	0	13
18	0	8	0	7	2
19	0	2	1	0	4
20	0	0	3	14	8

Esclerocio #	suelo 3				
	Tratamientos				
	105	150	Mezcla (105-150)	Benomil	Control
1	0	5	11	10	1
2	0	8	0	0	8
3	0	0	6	4	4
4	0	7	2	12	3
5	0	4	3	3	0
6	0	0	2	5	0
7	17	2	1	8	9
8	0	0	10	0	15
9	0	11	7	0	1
10	0	0	3	0	11
11	7	5	3	4	8
12	0	0	2	0	5
13	0	4	5	0	5
14	5	3	4	0	0
15	0	1	7	9	9
16	0	3	1	11	0
17	0	0	3	13	7
18	18	3	11	4	16
19	2	7	0	0	10
20	2	0	0	0	4

**Anexo 2.** Gráfica de las fluorescencias de los tratamientos del experimento en tejido floral. Dispersión de cada una de las fluorescencias de cada tratamiento con respecto al tiempo.



**Anexo 3.** Parcela experimental, el cuadrante blanco señala la parcela útil de 4 mts es decir el número de plantas evaluadas por cada tratamiento.

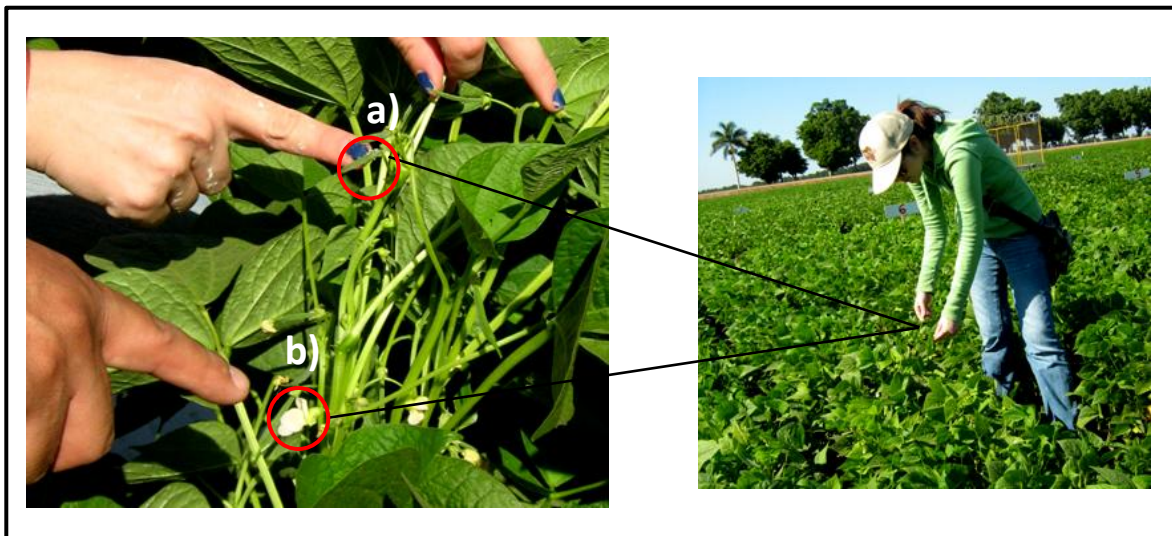


**Anexo 4.** Colecta de muestras de suelo para análisis físico-químicos y experimentos de diferenciación carpogénica y miceliogénica en suelo.





**Anexo 5.** Evaluación del número de flores y vainas en las parcelas experimentales de cada tratamiento. a) vaina y b) flor en una planta de frijol.



**Anexo 6.** Cosecha y limpieza manual del frijol. Cosecha de frijol de cada tratamiento (a), limpieza de frijol y colecta de esclerocios (b), medición del rendimiento de los granos de frijol y medición del % de humedad en granos (c)



## RECOMENDACIONES

- Los aislados 105, 150 y OX32 pueden ser efectivos contra moho blanco en el cultivo del frijol pero mejorando el diseño del experimento para propiciar un ambiente óptimo para el hongo y así lograr evaluar la eficacia de estos en campo.
- Evaluar los aislados con diferentes variedades de frijol.
- Aumentar el número de riegos de auxilio en el cultivo para propiciar un ambiente más húmedo para el desarrollo del hongo para fines experimentales y evaluación de la efectividad de productos biológicos.
- Probar distintas concentraciones de los aislados en experimentos en campo.
- Estudiar la relación de los factores físico-químicos del suelo con los esclerocios de *S. sclerotiorum* para determinar la diferenciación micelio- o carpogénica de éstos en el suelo.
- Estudiar los mecanismos de antagonismo de los aislados eficaces en pruebas *in vitro*.
- Se propone combinar el aislado 105 y OX32 debido a que en resultados *in vitro* en experimentos en suelo, ambos muestran efecto positivo y en combinación podrían resultar con mayor eficacia, ya que el aislado 105 controlaría la germinación carpogénica de esclerocios y el aislado OX32 la germinación miceliogénica de acuerdo a los resultados observados en este trabajo.