



1 11680  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO 1

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

“ALTERNATIVAS PARA EL ABATIMIENTO DE LAS  
POBLACIONES DE *Rhizoctonia solani* Y *Fusarium spp.*  
DEL SUELO”

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS  
(AREA: MICROBIOLOGIA)**

P R E S E N T A :

**CARLOS VICTOR MUÑOZ RUIZ**

DIRECTOR: DR. VICTOR OLALDE PORTUGAL  
ASESORES: DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA  
DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**COMITÉ TUTORIAL**

**Dr. Ernesto Moreno Martínez.**

**Dr. Víctor Olalde Portugal.**

**Dra. María Cristina López Fuentes.**

**Dr. Abel Ciprian Carrasco.**

**Dra. Genoveva García Aguirre.**

**Dra. Susana E. Mendoza Elvira.**

**Dr. Eliseo Hernández Baumgarten**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**SINODALES**

**Presidente:** Dr. Ernesto Moreno Martínez.

**Primer Vocal:** Dr. Víctor Olalde Portugal.

**Segundo Vocal:** Dra. María Cristina López Fuentes.

**Tercer Vocal:** Dr. Roberto Cervantes Olivares.

**Secretario:** Dr. Abel Ciprian Carrasco.

**Primer Suplente:** Dra. Genoveva García Aguirre.

**Segundo Suplente:** Dra. Susana E. Mendoza Elvira.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Este trabajo fue realizado con el apoyo parcial del Sistema de Investigación José María Morelos, SEP CONACYT dentro del proyecto 20000301019 y del Instituto Politécnico Nacional en los proyectos CGPI 20010365 y CGPI 20020486, así como de la Fundación PRODUCE Michoacán.**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**DEDICATORIA.**

*A MI ESPOSA MARISELA Y A MI HIJO EMILIO.*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ÍNDICE

### RESUMEN SUMMARY

<b>I</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II</b>	<b>OBJETIVOS</b>	14
	2.1    General	14
	2.2    Parciales	14
<b>III</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	15
	3.1    Suelo 1	15
	3.2    Suelo 2	15
	3.3    Suelo 3	16
	3.4 <b>Experimento 1.-</b> Efecto de la cal en solución acuosa sobre las bacterias Gram negativas del suelo.	16
	3.5 <b>Experimento 2.-</b> Encalado al suelo de cultivo y su efecto en papa.	17
	3.6 <b>Experimento 3.-</b> Efecto de la cal, el ácido sulfúrico y la mezcla de estos sobre las biotas de fúngicas y bacterianas del suelo.	19
	3.7 <b>Experimento 4.-</b> Prevalencia del encalado-acidificación en las poblaciones de <i>F. oxysporum</i> y <i>R. solani</i> del suelo.	20
	3.8 <b>Experimento 5.-</b> Protección al cultivo de papa hacia <i>R. solani</i> y <i>F. solani</i> con microorganismos antagónicos en suelos tratados.	21
	3.9 <b>Experimento 6.-</b> Demostración de la asociación micro simbiote-papa.	23
	3.10 <b>Experimento 7.-</b> Promoción del desarrollo de la papa mediante bacterias endofítica.	25
	3.11   Medios de cultivo.	26
	3.11.1   Agar papa dextrosa (PDA).	26
	3.11.2   Medios de cultivo comerciales.	26
	3.11.3   Medio Martin.	26
	3.11.4   Para el aislamiento de rizobacterias promotoras del desarrollo vegetal.	26
	3.11.4.1   Medio PAF.	26

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

3.11.4.2	Medio DF (Dworking y Foster).	27
3.12	Adición de cal al suelo de cultivo.	28
3.13	Adición del ácido sulfúrico al suelo de cultivo.	28
3.14	Estimación de las biotas fúngicas y bacterianas del suelo.	28
3.15	Aislamiento de rizobacterias antagónicas a los fitopatógenos.	28
3.16	Aislamiento de bacterias endofíticas.	29
3.17	Conservación de las cepas aisladas (Liofilización)	30
3.18	Aislamiento e identificación de los fitopatógenos.	31
3.19	Lectura de pH en el suelo.	31
3.20	Cuantificación de materia orgánica	31
3.21	Determinación del calcio tisular.	32

**IV RESULTADOS** 33

4.1	<b>Experimento 1.-</b> Efecto de la cal en solución acuosa sobre las bacterias Gram negativas del suelo.	33
4.2	<b>Experimento 2.-</b> Encalado al suelo de cultivo y su efecto en papa.	34
4.2.1	Contenido de calcio en follaje, estolón, bulbo y raíz de papa.	35
4.3	<b>Experimento 3.-</b> Efecto de la cal, el ácido sulfúrico y la mezcla de estos sobre las biotas fúngicas y bacterianas del suelo.	36
4.3.1	Efecto del ácido sulfúrico sobre la biota bacteriana del suelo.	36
4.3.2	Efecto del ácido sulfúrico sobre la biota fúngica del suelo.	36
4.3.3	Efecto de la cal sobre la biota bacteriana del suelo.	37
4.3.4	Efecto de la cal sobre la población fúngica del suelo.	37
4.3.5	Efecto conjunto de la cal y el ácido sulfúrico sobre la biota bacteriana.	37
4.3.6	Efecto conjunto de la cal y el ácido sulfúrico sobre la biota fúngica.	37
4.4	<b>Experimento 4.-</b> Prevalencia del efecto los tratamientos ácido-alcalinos en la población de <i>F. oxisporum</i> y <i>R. solani</i> .	42
4.4.1	Prevalencia de los tratamientos ácido-alcalinos en la población de <i>F. oxisporum</i> .	42
4.4.1.1	Efecto de los tratamientos sobre la materia orgánica el suelo	45

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



4.4.2	Prevalencia de los tratamientos ácido-alcalinos en la población de <i>R. solani</i> .	45
4.4.2.1	Efecto de los tratamientos en el pH del suelo.	48
4.5	<b>Experimento 5.-</b> Protección al cultivo de papa hacia <i>R. solani</i> y <i>F. solani</i> , por microorganismos antagonicos en suelos tratados.	48
4.5.1	Tratamiento por solarización.	48
4.5.1.1	Temperatura del suelo.	48
4.5.1.2	pH del suelo.	49
4.5.1.3	Comportamiento bacteriano en el suelo.	50
4.5.1.4	Comportamiento fúngico en el suelo.	50
4.5.1.5	Efecto de los tratamientos en la protección contra	51
4.6	<b>Experimento 6.-</b> Demostración de la asociación micro simbiote-papa.	52
4.7	<b>Experimento 7.-</b> Bacterización endofítica <i>in vitro</i> de <i>S. tuberosum</i> .	54
<b>V</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	56
<b>VI</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	67
<b>VII</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	68

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Posición taxonómica de los géneros <i>Rhizoctonia</i> y <i>Fusarium</i>	13
<b>Tabla 2.</b>	Sobre vivencia de diferentes géneros de bacterias Gram negativas obtenidas del suelo, que sobreviven al efecto de la cal hidratada en solución acuosa después de 60 y 120 minutos de contacto.	33
<b>Tabla 3.</b>	Contenido de nitratos en la savia peciolar del cultivo de papa en un suelo ácido enmendado con tres niveles de cal agrícola.	34
<b>Tabla 4.</b>	Contenido de potasio en la savia peciolar del cultivo de papa, en un suelo ácido enmendado con tres niveles de cal agrícola.	35
<b>Tabla 5.</b>	Calcio en la materia seca, en las estructuras aéreas de la planta de papa.	35
<b>Tabla 6.</b>	Calcio en la materia seca, en las estructuras radicales de la planta de papa.	36
<b>Tabla 7.</b>	Contrastación de las medias de los valores obtenidos para las bacterias en los diferentes tratamientos por la prueba de Tukey.	41
<b>Tabla 8.</b>	Contrastación de las medias de los valores obtenidos para los hongos en los diferentes tratamientos por la prueba de Tukey.	42
<b>Tabla 9.</b>	Determinación del porcentaje de materia orgánica a diferentes profundidades, en las parcelas experimentales después de 35 días de haber aplicado los tratamientos ácido-alcalinos.	45
<b>Tabla 10.</b>	Efecto de los tratamientos al suelo y del biocontrol sobre <i>R. solani</i> .	52
<b>Tabla 11.</b>	Contrastación de medias según Tukey, del peso de la biomasa de plántulas de papa bacterizadas y el tratamiento control.	54
<b>Tabla 12.</b>	Contrastación de medias según Tukey, del calcio tisular contenido en las raíces bacterizadas endofíticamente con diferentes cepas.	55

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Efecto del H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> en las bacterias del suelo.	38
<b>Figura 2.</b>	Efecto del H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> sobre los hongos del suelo.	38
<b>Figura 3.</b>	Efecto de la cal sobre las bacterias del suelo.	39
<b>Figura 4.</b>	Efecto de la cal sobre los hongos del suelo.	39
<b>Figura 5.</b>	Efectos de la cal y el H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> sobre las bacterias del suelo.	40
<b>Figura 6.</b>	Efectos de la cal y el H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> sobre los hongos del suelo.	40
<b>Figura 7.</b>	Efecto de los tratamientos ácidos-alcalinos sobre <i>F. oxisporum</i> y el pH del suelo.	43-44
<b>Figura 8.</b>	Efecto de los tratamientos ácidos-alcalinos sobre <i>R. solani</i> y el pH del suelo.	46-47
<b>Figura 9.</b>	Registro de la temperatura del suelo.	48
<b>Figura 10.</b>	Cambio en el pH del suelo.	49
<b>Figura 11.</b>	Comportamiento en la población bacteriana.	50
<b>Figura 12.</b>	Comportamiento de la población fúngica.	51

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

<b>Fotografía 1.</b>	Confrontación <i>in vitro</i> de <i>Bacillus</i> cepa Dt con <i>F. solani</i> .	52
<b>Fotografía 2.</b>	Confrontación <i>in vitro</i> de <i>Bacillus</i> cepa Dt con <i>R. solani</i> Ag-3.	53
<b>Fotografía 3.</b>	Prueba de Romeiro modificas.	53
<b>Fotografía 4.</b>	Efecto de las bacterias endofíticas.	54

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**RESUMEN**

El presente trabajo tuvo como objetivo buscar alternativas de control para los fitopatógenos, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium spp.*

Para introducir al suelo bacterias antagonicas a los fitopatógenos, se dio inicio con la evaluación de la capacidad de la cal, para inhibir el desarrollo bacteriano. Demostrando que las bacterias Gram negativas del suelo son, exceptuando algunas pseudomonadales, más resistentes que las enterobacterias.

Posteriormente se determinó el efecto del encalado en el desarrollo de la papa, modelo biológico de este estudio. Para ello se adicionaron diferentes concentraciones de cal, a un suelo dentro de la zona productora de este cultivo en el estado de Michoacán y se registraron los cambios en los valores de pH en el suelo, la siembra se efectuó hasta que este valor estuvo en el óptimo para la germinación. Como indicadores del estado fisiológico de las plantas se cuantificó durante su desarrollo, el contenido de nitratos y potasio en la savia peciolar. Después de la cosecha, se determinó la concentración de calcio en sus tejidos, encontrándose que en los estolones y tubérculos se tendía a acumular más este elemento y que en la savia de estas plantas se incrementaban los nitratos, cuando se adicionan volúmenes de cal aproximados al mega gramo (Mg) en 10 000 m<sup>2</sup> de suelo ácido.

Después se demostró que al encalar al suelo y neutralizar con ácido sulfúrico, reduce significativamente a las poblaciones fúngicas y bacterianas del suelo.

Así mismo se comprobó el efecto del tratamiento de encalado acidificado al suelo, sobre los hongos fitopatógenos *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* así como el contenido de materia orgánica del suelo, ya que de ella depende la fertilidad de los suelos. Los resultados indicaron que se requieren 2 Mg hidróxido de calcio neutralizado con ácido sulfúrico, para reducir el número de propágulos cultivables de *R. solani* y *F.*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

*oxysporum* y que el contenido de materia orgánica no se altera aún cuando se neutralicen 8 Mg de cal con ácido sulfúrico.

Con base en lo anterior se realizó un ensayo combinado de encalado neutralización y solarización con la adición de antagonistas a los fitopatógenos en cuestión, los que fueron 3 cepas bacterianas del género *Bacillus* además del hongo *Trichoderma*, como micelio y en fase esporulada, todos ellos limitantes *in vitro* el desarrollo *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani*. De aquí se concluyó que tanto los tratamientos al suelo, como el empleo de microorganismos (excepto *Trichoderma harzianum* en su fase esporulada) son una buena alternativa de control para *Rhizoctonia solani* AG-3, pues redujeron la incidencia de la enfermedad en el cultivo de papa y que los tratamientos de encalado y solarización, afectan el desempeño de los biocontroladores, en el caso de las bacterias regularmente de manera positiva con los *Fusaria* no fue posible realizar la evaluación.

Al reconocer que la aplicación de organismos antagónicos bacterianos resultó ser eficiente, se decidió aislar bacterias epifíticas y endofíticas a partir de solanáceas y diseñar una técnica que nos permitiera seleccionar de manera práctica, a organismos antagónicos que se asociaran a nuestro modelo. Encontrando que *Lycopersicon esculentum* var. Cerasiforme, es una buena fuente para el aislamiento de bacterias del género *Bacillus* antagónicas a *Fusarium spp* y *Rhizoctonia spp*.

Así mismo se demostró que es posible observar la asociación de las bacterias simbiotes con la región radicular de papas cultivadas *in vitro*, en el medio Murashige y Skoog, adicionado de azúcar comercial 30 g·L<sup>-1</sup> y tiamina 0.004 mg · L<sup>-1</sup>, cuando se inoculan sobre el medio entre 2-100µL de los microorganismos en una suspensión. Además se comprobó que las bacterias que desarrollan en la periferia de la raíz regularmente se establecían en el interior de la planta.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Finalmente demostramos que algunas de las bacterias que antagonizaron a *Fusarium* y *Rhizoctonia* también promovían el desarrollo de las plantas de papa, al establecerse como endofíticas. Una de las cepas del género *Bacillus* la denominada Dt, demostró ser buen promotor del desarrollo vegetal, diferenciándose estadísticamente respecto a la producción de biomasa y a la concentración de calcio tisular, esto último se considera confiere resistencia contra la invasión de patógenos.

Palabras clave: *Fusarium*, *Rhizoctonia*, papa, encalado, calcio, biocontrol.

TECIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## SUMMARY

The purpose of this work was to look for control alternatives against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium spp* in the soil.

In order to introduce antagonistic bacteria into the soil, we tried several methods, starting with the use of lime, for its inhibiting bacterial growth capacity. The result showed that except for some pseudomonadids, soil Gram negative bacteria were more resistant than enteric Gram negative bacteria, which had been evaluated in a previous work.

To use the liming soil procedure with potato culture, we applied several amounts of lime before seeding, and during the growth of the plants, sap nitrate and potassium content were quantified. Also at the harvest, tissue calcium concentration was defined. We found an increase in the sap nitrate level and in the root's calcium, mainly in the runners and tubercles.

Later, we tried to demonstrate that neutralizing with sulfuric acid after applying the soil liming procedure, would increase the reduction in the microbial population. As a result of this process, we were able to reduce bacterial and fungal populations significantly. In addition, this process was tried specifically with *R.solani* and *F. oxysporum*, and at the same time the effect on the organic matter was evaluated. The result indicated that as calcium hydroxide was increased and neutralized, it reduced *R .solani* and *F. oxysporum* soil populations; furthermore, there weren't any changes in the organic matter content.

Another two methodologies that we applied was soil solarization and the use of antagonistic microorganisms, because as we already know, these techniques reduce fungal and bacterial plant pathogen populations. We combined soil solarization with the neutralized soil liming procedure and added antagonistic microorganisms to *R. solani*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



and *Fusarium sp.* Such antagonistic microorganisms included three bacterial strains of *Bacillus* and the fungus *Trichoderma harzianum* in mycelia and spore form. We determinate at this point, microorganisms were a good alternative to control plant pathogens. In both the neutralized soil liming procedure and soil solarization in general bacteria worked better. On the other hand, *Trichoderma harzianum* was less successful and the applied phase was important. From here we decided to seek a technique to select potato symbiotic bacteria. We concluded that it was possible to see the bacterial development around the roots, of potato plant growing in the tissue culture medium Moorashige Skoog with sugar and tiamine when the bacterial inoculums were applied in solutions on the medium surface. With this method we also introduced antagonistic bacterias into the potato plants.

Finally we established that some strains antagonistic to *R. solani* and *Fusarium sp* also were plant growth promoting rhizobacterias. Consequently one of these strains named DT showed a significant difference compared to the control in biomass production and the root calcium concentration a resistant factor against pathogen, besides this microorganism showed good performance in the field.

Key words: *Fusarium*, *Rhizoctonia*, potato, liming, calcium, biocontrol

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## I.- INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de la agricultura es uno de los rasgos que caracteriza el tránsito del hombre hacia el neolítico y este paso se dio en diferentes espacios, tiempos y circunstancias. Modalidades contrastantes de este avance las encontramos en las condiciones bajo las que se desarrolló en la Mesopotamia y Mesoamérica, en la primera hace cerca de 11,000 años, grupos tribales dedicados a la caza y recolección, lograron asentarse aquí, por cerca de un milenio, después de este periodo, un descenso universal de la temperatura los orilló a buscar alguna alternativa para no regresar al nomadismo, de esto se deriva el cultivo de gramíneas como el hordeum, para lo cual modificaron el terreno a sembrar, eliminando montículos y maleza, es decir establecieron un monocultivo. Para ese entonces en Mesoamérica, ya se propagaba a algunas cucurbitáceas como la calabaza, inmersas en la selva oaxaqueña, dando inicio a la práctica del cultivo mixto. Para el monocultivo fue necesario desarrollar prácticas culturales para su protección, entre las primeras descritas se encuentran: la selección de semillas, la quema de residuos agrícolas sobre el terreno, la siembra oportuna para el desarrollo más favorable, el aislamiento de cultivos, el suministro de riego y manejo del agua, los abonos y las enmiendas al suelo empleando el azufre y la cal, que son compuestos de los que se tienen referencias que datan de más de 1,000 años a.C. (1,2).

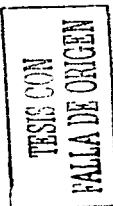
El empleo de la nicotina como insecticida en el siglo XVIII, marca el arribo de los plaguicidas de origen vegetal a la agricultura (2). Posteriormente, Prevost, en 1805, describe la inhibición de esporas del "añublo" por el sulfato de cobre; Weighton en 1814 fue el primero en sugerir la mezcla de cal con azufre como fungicida acaricida (3). El descubrimiento accidental de Millardet en 1882 de la pasta Bordeaux (cal en solución acuosa mezclada con sulfato de cobre diferentes proporciones), para el control del mildiú

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

de la vid y el tizón de la papa, es parte de la búsqueda de otros agroquímicos para adecuarse al combate de plagas y enfermedades (4). Al llegar el siglo veinte da inicio la quimioterapia contra patógenos en plantas y animales. Compuestos inorgánicos como azufre, cobre, mercurio, antimonio y arsénico, que no son selectivos hacia los patógenos se emplean para este fin. Asimismo, algunas sustancias orgánicas como la quinina, tabaco, aceites y jabones se usan, sin una idea clara de sus bases terapéuticas. En las primeras dos décadas del siglo XX la química orgánica introdujo el empleo de los metales por su uso como compuestos órgano metálicos, los que ya tuvieron una toxicidad más específica. La selectividad de estos compuestos no dependió únicamente de sitios bioquímicos sobre los que actuaba en la célula blanco, sino en la distribución de lípidos-agua en el patógeno, lo cual conlleva a una menor fitotoxicidad. Los fungicidas mercuriales fueron desarrollados para tratamientos de semilla y follaje en 1913, al igual que el bactericida acriflavina. Estos compuestos que fueron usados en medicina como antisépticos en la primera guerra mundial, no poseían la capacidad requerida para el control de infecciones bacterianas dentro de células o tejidos de origen vegetal.

En la década de los treinta del siglo pasado, se considera como el umbral hacia la era moderna del control químico de fitopatógenos, con la introducción de los pesticidas orgánicos sintéticos; entre los ejemplos relevantes se encuentran los insecticidas derivados del tiocianato de alquilo en 1930, la salicilanilida en 1931, el primer fungicida orgánico y los fungicidas ditiocarbámicos en 1934 (5,6).

Durante el periodo de 1935-1950, los avances continuos de microbiología y química orgánica desarrollaron bactericidas altamente selectivos tales como las sulfonamidas y los antibióticos (penicilina, estreptomina y clorotetraciclinas). Los antibióticos como la estreptomina y la ciclohexamida seguidos por la kanamicina y la polimixina fueron de



los primeros protectantes vegetales específicos.

Los primeros fungicidas sintéticos selectivos: **Benomil, Dimetrimol y Carboxin** fueron introducidos a la agricultura a finales de la década de 1960. Como los antibióticos, estos compuestos fueron selectivos de acuerdo a las propiedades bioquímicas del patógeno y ellos fueron introducidos a los vegetales, para que actuaran sistémicamente. En la década 1970-1980, se desarrollaron fungicidas altamente específicos con fines agrícolas, las finelamidas, órgano fosfatos, dicarboximidias y los inhibidores del esterol. La mayoría de estos fungicidas, presentan una fracción que reacciona con un receptor específico dentro de las células blanco del patógeno, usualmente un sitio donde una proteína es sintetizada por uno o varios genes. Pero para cada caso la resistencia microbiana se generó rápidamente. La mayoría de los mecanismos de la resistencia ahora son conocidos y es claro que su desarrollo es debido al potencial genético de los patógenos, a su capacidad de detoxificación o a cepas mutantes con poca afinidad a los antibióticos, el mismo patrón de resistencia que ha sido detectado en los insectos hacia los insecticidas. (7,8).

Estos compuestos, aunados a los insecticidas y fertilizantes han desempeñado un papel muy importante en la obtención de máximos rendimientos de casi todos los cultivos comerciales, esto por la reducción en las pérdidas ocasionadas por patógenos y plagas. Sin embargo, por sus efectos tóxicos residuales, el uso de estos agroquímicos ha propiciado desequilibrios ecológicos, además la contaminación de alimentos.

Por este motivo, otros métodos de control como el combate biológico y la solarización, han sido propuestos como una alternativa al uso de plaguicidas (7,8). La solarización del suelo es un proceso hidrotérmico que actualmente se efectúa cubriendo el suelo húmedo, con una película transparente de plástico, para exponerlo a la radiación solar durante los meses de mayor temperatura en el verano. Mediante este tratamiento se pretende incrementar la

temperatura del suelo hasta los 42 - 45 °C, a 5 cm de profundidad, al menos durante seis horas. Bajo estas condiciones, las semillas de maleza y los agentes etiológicos de enfermedades y plagas que habitan el suelo no pueden proliferar, ya que por ser mesofílicos se inactivan y se propicia su descomposición.

Este tratamiento además ocasiona cambios químicos y físicos que favorecen el desarrollo de las biotas saprofitas (9). Esta práctica se deriva del intento de brindar protección al suelo y los vegetales, de la acción del intemperismo tal como el calor, el frío, la evaporación del agua o la erosión, para lo cual se empleaban inicialmente ramas, maleza u otros materiales del campo (10-18).

La lucha biológica o control biológico de fitopatógenos, que es el uso de microorganismos para prevenir enfermedades, es un procedimiento que se inicia dentro de la Entomología agrícola. El primer intento de controlar una plaga mediante la introducción de un enemigo natural se registró en el año de 1888 (19). Mientras que la introducción de microorganismos como un inoculante al suelo, para el control de fitopatógenos data de 1922 (20). Aunque cabe mencionar que el control biológico en el suelo puede ser llevado a cabo de manera indirecta o directa. Las estrategias indirectas incluyen todas las labores y enmiendas realizadas sobre el cultivo o el suelo para el mejor desarrollo de los vegetales, debido a que la nutrición de los cultivos es un factor primordial para el control de las enfermedades, no solo porque una buena nutrición implica mayor resistencia al establecimiento de los fitopatógenos, posibilidades de "escape" a plagas y enfermedades, o la disminución de el efecto de las mismas, si no que además, las prácticas empleadas para el mejoramiento de la fisiología de los cultivos, de alguna manera, repercuten en la nutrición de los suelos, de manera tal que los nutrientes influyen sobre las poblaciones de fitopatógenos o de otros habitantes que coexisten con ellos en el suelo, dando pie a la competencia entre ellas.

TESIS CON  
PALLA DE ORIGEN

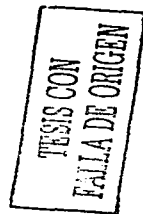
Ejemplo de esto lo tenemos en la rotación de cultivos, en la siembra de cultivos asociados, el uso de abonos, la irrigación, el encalado del suelo para ajustar el pH, los aporques y las podas, etc. (21-26).

El mecanismo de como los nutrientes influyen en la fisiología del huésped para que los patógenos logren o no la invasión y su establecimiento en su gran mayoría se desconoce, pero se ha avanzado de manera general en esto. Se ha establecido, por ejemplo, que el manganeso tiene un papel relevante en este particular, por ser indispensable en los procesos de formación de sustancias fenólicas, de lignificación de los tejidos, en el metabolismo del nitrógeno, de los carbohidratos y en la fotosíntesis.

También se sabe que el suministrar el nitrógeno oportunamente al suelo incrementa la microflora en él, lo que dará lugar a la existencia de un complejo de asociaciones y antagonismos dentro de la biota que lo habita. Observaciones similares se tiene con el calcio y el nitrógeno nítrico que incrementan el pH del suelo, lo que minimiza la virulencia de *Fusarium oxysporum* (27-31). Sin embargo, existen elementos que en una concentración dada reducen el efecto de algún fitopatógeno pero a la vez incrementan el de otros. Ejemplo de esto se presenta en papa con la marchitez ocasionada por *Verticillium* y el cáncer por *Rhizoctonia*. Este último se incrementa cuando se le fertiliza con sulfato de amonio para abatir a la marchitez y cuando se combate a *Rhizoctonia*, nitrificando con nitrato de calcio, los propágulos de *Verticillium* proliferan (25). Otro comportamiento inducido, es el que se presenta en un medio rico en sales de calcio, que limita el desarrollo de un patógeno, a la vez que propicia la proliferación de un antagonista, que es el caso de *Penicillium digitatum*, abatida por la levadura *Pichia guillermondi* en presencia de cloruro de calcio (32).

El calcio es uno de los nutrimentos vegetales que mayor atención ha recibido para confrontarlo frente a los fitopatógenos. Por más de dos siglos se ha sabido que la enmienda al suelo con carbonato de calcio puede proveer una reducción significativa de la "hernia de las crucíferas". Aún cuando el parásito fue descrito por Woronin hasta 1878. Esta enfermedad es más severa en cultivos que crecen en suelos ácidos al momento se considera que la mejor enmienda y control se realiza con cal. Cunningham, en 1914, incrementó los rendimientos de coliflor 3.5 veces, adicionando carbonato de calcio al suelo y Campbell y col., en 1985, controlaron esta enfermedad en brócoli, por tres años consecutivos con la sola aplicación de la misma fuente de calcio. Ellos señalaron que su éxito dependió por la interacción entre el pH, el calcio extractable y el magnesio. Adicionalmente Thaxter, publicó en 1981 que la escama corchosa de la papa se controlaba de la misma forma (33). Además el encalado de los suelos se ha empleado, para combatir a otros fitopatógenos como *Erwinia* en papa (34), *Botrytis cinerea* en rosal (35) y la marchitez ocasionada por *Fusarium* (36) *Sclerotium rolfsii*, *Pythium*, en cultivos varios (33).

La marchitez causada por *Fusarium* en tomate tuvo el primer reporte en los Estados Unidos en 1899, por E.F. Smith, quien dijo que esta enfermedad había acabado con los productores de tomate de los mercados del Norte de Florida. Para 1920, ya se había extendido hasta el Medio Este de la Costa Atlántica (37). Los primeros esfuerzos para el control de *Fusarium* datan de cerca del 1910, por Norton (38,39) y Essary (40,41) los que se concentraron en el desarrollo de variedades tolerantes. Casi simultáneamente Wollenweber (42) y Sherbakoff (43) iniciaron observaciones sobre la morfología y fisiología del género *Fusarium*. Una tercera fase de investigación se inició con Edgerton y Moreland, (44,45) investigando el efecto de la nutrición sobre el desarrollo de la enfermedad. Ellos reportaron, en 1913, que la cal suministrada al suelo en grandes cantidades, 10 Mg por acre, (Nota Mg

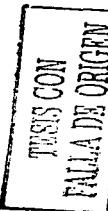


= mega gramo =  $1 \times 10^6$ g) mejoraba el control de la marchitez en tomate. Su hallazgo fue confirmado por varios investigadores incluyendo a Sherwood (46) en 1923, Scott (47) en 1924, Fisher (48,49) en 1935. Después de ellos, se han realizado con diferentes cultivos ensayos en donde se demuestra el control de la marchitez, mediante la aplicación de calcio y el incremento del pH.

Trabajos relevantes sobre esta enfermedad han tenido resultados positivos en Florida sobre todo los realizados por Woltz, Jones y Engelhard en condiciones de campo e invernadero, con tomate (33, 34, 36, 50-51, 53-56) y otros cultivos (33, 34, 52, 57-63). Ellos evaluaron la adición de nitrógeno nítrico vs. nitrógeno amoniacal, micro elementos, fósforo, carbonato de calcio, hidróxido de calcio y sulfato de calcio, encontrando que el patógeno puede entrar en estarvación y reducirle la virulencia mediante el manejo de macro y micro elementos. En la década de 1970 en que Woltz y Engelhard desarrollaron un manejo en el que integraban el uso de nitratos cal y quimioterapia para controlar esta enfermedad en crisantemos (28-31, 47) y clavel (55). Este sistema dio resultados satisfactorios en tomates cultivados en Hungría por Sarhan y Kiraly (56).

Repetidamente se ha reportado la influencia de la nutrición mineral en las enfermedades producidas por alteraciones fisiológicas y bióticas estos han sido compendiados por Huber (64). Este resumen reporta varias veces la asociación entre el calcio y la resistencia en las plantas, a diferentes agentes patogénicos.

En particular, los cambios en las concentraciones de calcio en los tejidos vegetales han mostrado influencia en la localización de la infecciones virales (65). También como moderador de la severidad de las enfermedades en varios cultivos atacados por hongos (66-73). La aplicación de calcio afecta la dureza de los tejidos de los pepinos (74) y la integridad de la pared celular en raíz de calabaza (75) y también reduce la severidad de





enfermedades abióticas incluyendo la pudrición final del tomate (76), el corazón negro del apio y la punta mordida de la manzana (77). En papas la aplicación de calcio ha mostrado reducir el desarrollo de la mancha café de los tubérculos y las necrosis subapicales (76-81). Un incremento en la concentración de calcio en los tejidos vegetales puede resultar también en la resistencia a enfermedades bacterianas ocasionadas por *Pseudomonas* (82, 83) como la pudrición de la calabaza china (84, 85) y el frijol (86).

Con respecto a la papa, en trabajos de nutrición vegetal se ha demostrado que la mayor parte del calcio se acumula en el follaje y tallo, en los tubérculos escasamente un 2.3% del total (87). Y en esta región de la raíz, este elemento se concentra principalmente en el peridermo y la región cortical (88). En el tejido medular de los tubérculos de papa el calcio es muy escaso se encuentra en valores de 0.01% y 0.08% del peso seco de la planta, mientras que regularmente en otros vegetales fluctúa entre el 0.2 y el 4.0% (89), no obstante el conocimiento de estos porcentajes, no se sabe el nivel en el que se considere como deficiente en calcio a los tubérculos de papa.

Ahora bien, entre las estrategias directas, se incluyen la introducción de antagonistas microbianos específicos al suelo o material de sustrato (90). Estos antagonistas tienen que proliferar y establecerse *per se* en, un micro hábitat determinado para poder así coexistir y activarse contra los patógenos (91).

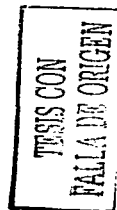
Sobre el empleo de bacterias biocontroladoras de patógenos del suelo, se han realizado muchos trabajos y resúmenes (92 a 102). Durante cerca de 80 años de estudio (102, 103) los resultados la mayoría de las veces no los han señalado como comercialmente confiables. Sin embargo desde 1965 el interés y la investigación en esta área se ha incrementado (102) como se refleja en el número de libros (104-107) y revisiones acerca de esto (107-116). Actualmente ha habido un cambio de opinión sobre el control biológico y su importancia en

la agricultura del futuro y esto ha motivado a desarrollar programas para la búsqueda y el empleo de agentes biocontroladores comerciales. Este renovado interés en el uso de la lucha biológica, para combatir plagas se debe en parte a la preocupación pública sobre los daños asociados al uso de plaguicidas químicos.

De entre los microorganismos asociados a los vegetales, los que crecen en la rizósfera son ideales para usarse como agentes biocontroladores, puesto que en la rizósfera se ubica la línea frontal de defensa para las raíces contra el ataque de los patógenos hipogeos, además de ser fuente de inóculo para las bacterias endofíticas. Los patógenos enfrentan al antagonismo de los microorganismos de la rizósfera, antes de la primoinfección y de las siguientes infecciones secundarias a la raíz. Existen suelos en donde se han identificado a microorganismos que les confieren supresividad hacia los patógenos (117). El antagonismo microbiano en ellos es tan eficiente que llega a un control de la enfermedad. Los suelos supresivos a patógenos son escasos, sin embargo son el modelo a seguir.

En los últimos 15 años, varios ejemplos de bacterias capaces de brindar un control substancial de las enfermedades en campo han sido reportados. Estos recientes éxitos en el control biológico contrastan con los menos afortunados intentos de inicio de siglo (100), resultan en parte por el mayor entendimiento de la rizósfera y la selección de cepas con facilidad para establecerse ahí. Los agentes bacterianos de biocontrol mejoran el desarrollo vegetal por inhibir tanto patógenos mayores como menores. Los patógenos mayores son aquellos que producen las enfermedades vasculares de la raíz con los síntomas asociados. Los patógenos menores son parásitos saprófitos que dañan tejidos juveniles tales como los pelos absorbentes, los meristemos y células corticales (118); en este caso las enfermedades no tienen síntomas característicos.

Las bacterias muestran un potencial para usarse como biocontroladores en muchos géneros



en donde se incluyen a los siguientes *Actinoplanes* (119, 120), *Agrobacterium* (112, 120-126), *Acaligenes* (127, 128), *Amorphosporangium*, (119), *Arthrobacter* (127-130), *Azotobacter* 131, *Bacillus* (132-142), *Enterobacter* (141-147), *Erwinia* (148), *Flavobacterium* (141, 149), *Hafnia* (148, 150), *Micromonospora* (129), *Pseudomonas* (135, 136, 151-172), *Pasteuria* (111,173-176), *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (177), *Serratia* (148;150), *Sireptomyces* (134, 142-143, 178-179) y *Xantomonas* (141-149).

Obviamente los agentes antagonicos a fitopatogenos no están limitados a un grupo específico de bacterias y dada la diversidad de la microflora en la rizósfera hay un gran número de cepas útiles para este fin que no han sido estudiadas. Es de esperarse que los microorganismos biocontroladores que son eficientes en campo, actúen conjuntamente con otras especies. Cuando se han ensayado experimentalmente mezclas de biocontroladores, como mezclas de hongos (180 -184) o de hongos con bacterias (185-193) o de bacterias (183, 194-203) regularmente se ha incrementado la protección. Sin embargo, hay reportes en donde mezclas de microorganismos no confieren mayor protección que la que brinda un solo antagonista (158, 204-206). Lo que sugiere la existencia de incompatibilidad entre coinoculantes (207).

El primer ejemplo de rizobacteria biocontroladora es *Agrobacterium radiobacter* cepa 84, la cual controla las agallas causadas por *A. tumefaciens* (121), la cepa 84 fue el primer bacilo comercialmente usado y ha sido empleada exitosamente en todo el mundo (122, 125-126), a pesar de que se siguen publicando trabajos que mencionan lo errático que resulta el control mediante el empleo de un solo microorganismo (208).

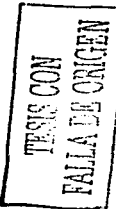
Paralelamente, se ha demostrado que los microorganismos endofíticos (hongos y bacterias) son capaces de propiciar el desarrollo vegetal como también reducir los síntomas ocasionados por varios fitopatogenos (209).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El primero en desarrollar el concepto de inocuidad para las bacterias endofíticas, fue Perrotti en 1926, sin embargo quien registró su hallazgo fue Pasteur en 1870, él las consideró como patógenos que cursaban asintómicamente (209). Desde 1940 se han reportado muchos trabajos sobre bacterias indígenas endofíticas dentro de tejidos tan diversos como semillas y óvulos (210), tubérculos (211), raíces (212), tallos y hojas (209) y frutos (213-214).

Esta clase de bacterias aisladas de los tejidos internos de plantas aparentemente sanas, pertenecen a 129 especies de más de 54 géneros (216). Siendo los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* y *Agrobacterium* los más frecuentemente recuperados (209). Aunque se cree que la baja tolerancia presentada por las plantas axénicas al estrés por factores bióticos o abióticos, es en parte ocasionada por la ausencia de estos simbioses, las investigaciones más recientes con ellos tratan sobre su capacidad antagónica hacia los patógenos (215, 217-219).

Referente a los géneros *Rhizoctonia* y *Fusarium* fitopatógenos objeto de este trabajo, se le considera habitante del suelo y es agente etiológico causante de severas pérdidas en numerosos cultivos y en algunos como fresa y papa han ocasionado en nuestro país, que los requerimientos de fungicidas durante su producción sean tan altos que llegan a afectar su calidad y rentabilidad. En el estado de Michoacán en fresa, dentro del complejo de hongos llamado "Secadera de la fresa" puede ocasionar pérdidas mayores al 50 %, cuando se presentan condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad y esta no se controla a tiempo (220). Con respecto a la papa, *R. solani* Kühn teleomorfo: *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk. Las características típicas de este patógeno son: ramificaciones en ángulo recto cerca del septo distal de las células jóvenes en las hifas vegetativas, formación de un septo cerca del punto de origen de ramificación, constricción



de la ramificación de la hifa en el punto de origen, presencia de un doliporo, ausencia de conexiones en forma de grapa, ausencia de conidias, presenta células miniloides, tejido escleroidal no diferenciado en corteza y médula y ausencia de rizomorfos. Causa la enfermedad conocida como cáncer del tallo y estolón, provoca además lo que comúnmente se conoce como “Costra negra de la papa”. Este patógeno se presenta en todas las áreas productoras de este cultivo (221).

Los daños ocasionados por este hongo se asocian con la reducción de la emergencia de los brotes, reducción del vigor de las plantas, también con una mayor frecuencia de tubérculos deformados, agrietados o con esclerosios sobre la superficie (222). Las lesiones en los tallos pueden alcanzar una incidencia mayor al 90% de las plantas y reducir significativamente el rendimiento de los tubérculos (hasta un 35.1%) (223, 224).

El género *Fusarium* Link. teleomorfo: *Gibberella*. Se caracteriza por: macroconidios hialinos, fusiformes a veces pedicelados, con 1-7 septas, conidióforos ramificados, pueden formar esporodoquios, algunos presentan microconidios con frecuencia hialinos, abundantes o escasos con septas de 1-4, clamidosporas de paredes gruesas terminales o intercalares; produce esclerocios y sus colonias son generalmente coloreadas. Es un hongo que habita el sistema vascular de las plantas, produce marchitamientos, pudriciones basales y Damping-off. En condiciones de temperatura y humedad alta puede afectar a más del 70% del cultivo, (225) el estado de Michoacán México, según registros del distrito desarrollo de la ciudad de Zamora, localidades como Yurecuaro y Villamar dejaron de producir papa en los últimos 5 años a causa de este agente etiológico.

De acuerdo a Herrera y Ulloa (226) los géneros de los fitopatógenos en cuestión tienen la siguiente posición taxonómica:

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 1.** Posición taxonómica de los géneros *Rhizoctonia* y *Fusarium*

Reino	Fungi	Fungi
Subdivisión	Deuteromycotina	Deuteromycotina
Clase	Hyphomycetes	Hyphomycetes
Orden	Moniliales	Moniliales
Familia	Agonomycetaceae=Mycelia Sterilia	Tuberculariaceae
Género	<i>Rhizoctonia</i>	<i>Fusarium</i>

El frecuente aislamiento de los género *Fusarium* y *Rhizoctonia*, coexistiendo en la región radical de un sin número de huéspedes, induce a pensar en una posible asociación de ambos fitopatógenos, de aquí el interés de desarrollar una técnica en la que se intente abatir a ambas poblaciones.

La técnica de solarización, la cual fue descrita y aplicada por vez primera en Israel (227) es usada como un método de desinfección del suelo, que abate las poblaciones de hongos, nemátodos y malezas (228), sin embargo en un ensayo previo a más de 2 400 msnm no se obtuvieron resultados satisfactorios en el abatimiento de las biotas fúngicas del suelo.

en ensayos *in vitro* se ha observado el efecto bactericida de la cal en solución acuosa sobre bacterias entero patógenas del hombre (229) y por citometría de flujo de rayo láser la ruptura de paredes y membranas celulares ocasionada por la misma solución en *vibrio cholerae* (230).

En este trabajo se presentan metodologías desarrolladas para abatir a las enfermedades fúngicas, que se transmiten por el suelo y que afectan a los cultivos en su sistema radical, con el propósito incrementar la consistencia del control biológico en los sistemas agrícolas.

PREVENIR CON  
FALLA DE ORIGEN

## II.- OBJETIVOS

### 2.1 General

Diseñar y evaluar metodologías para el combate de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium spp* fitopatógenos de la papa.

### 2.2 Parciales

- Evaluar *in vitro* el efecto del hidróxido de calcio convencional (cal) en solución acuosa sobre las bacterias del suelo.
- Demostrar el efecto del encalado al suelo, en la fisiología del cultivo de papa.
- Observar el efecto de la cal sobre las biotas fúngicas y bacterianas del suelo.
- Desarrollar una metodología a base de encalado y antagonistas biológicos para reducir las poblaciones de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium spp*.
- Desarrollar una técnica para la selección de bacterias rizosféricas y endofíticas con perspectivas para incrementar el desarrollo o la resistencia la planta de papa.
- Seleccionar antagonistas endofíticos contra *R. solani* y *Fusarium spp* para emplearlos como biocontroladores.

### III.- MATERIAL Y MÉTODOS

Se trabajaron tres tipos de suelo según el experimento. Las características de los mismos se anotan a continuación:

#### 3.1 Suelo No 1

Su origen es el municipio de León en el Bajío Guanajuatense, el cual es delimitado al Este por Querétaro, al Sur por Michoacán, al Oeste por Jalisco y al Norte por la Sierra del Norte de Guanajuato, presenta un clima semicálido seco, con precipitación de 600 mm y temperatura media anual de 20.6 °C. Suelo donde se cultiva papa con alta incidencia de enfermedades fúngicas entre ellas *R. solani* y *Fusarium spp.* Es un vertisol de color pardo oscuro, de textura arcillosa, con un pH de 6.5 y una densidad de 1.2 g cm<sup>-3</sup>, materia orgánica 1.8 %.

#### 3.2 Suelo No 2

Es originario de la zona conocida como Ciénega de Chapala región localizada entre los estados de Michoacán y Jalisco. La ciénega de Chapala es un área plana, siendo una parte originada por la desecación parcial de un lago. Tiene una precipitación promedio de 728 mm, iniciándose la época de lluvias en mayo y finalizando en octubre, sus temperaturas medias son de 14.9 °C. Actualmente se utiliza para la agricultura esencialmente al cultivo de la fresa y donde la incidencia de *Fusarium* es muy alta, es un vertisol de color negro, crómico, pélico, con un pH de 7.4 y una densidad aproximada a 1.0 g cm<sup>-3</sup>, con 1.3 % de materia orgánica. (231)



### 3.3 Suelo No 3

Del poblado de "Patamban" en la sierra Tarasca en el estado de Michoacán, la que forma parte del eje neovolcánico transversal de la república mexicana, tiene clima templado con lluvia en verano con temperatura media del mes más cálido inferior a 22° C y la temperatura máxima se presenta antes del solsticio de verano, la precipitación pluvial es de 1362 mm. Vocación agrícola forestal anteriormente se ha sembrado maíz, por primera vez se cultiva papa en él, es un andosol, color rojizo, de textura franco y con un pH de 5.5, densidad de  $1.0 \text{ g} \cdot (\text{cm}^3)^{-1}$  con un contenido de materia orgánica de 3.7 % (231).

### 3.4 Experimento 1.- Efecto del hidróxido de calcio (cal) en solución acuosa sobre las bacterias Gram negativas del suelo

Teniendo como antecedente la sensibilidad de las bacterias Gram negativas del tracto digestivo humano a las soluciones alcalinas, se decidió evaluar *in vitro* el efecto de la cal hidratada en solución acuosa, sobre las bacterias Gram negativas del suelo. Para esto se tomaron 3 muestras de 10 g del suelo No2, cada una se suspendió en 95 mL de agua peptonada estéril mediante homogeneización manual, agitando 30 veces la suspensión contenida. Tras reposo de la suspensión de 5 minutos, se tomó 1 mL de cada frasco y se llevó hasta la dilución  $10^{-3}$ , para de aquí tomar una alícuota de 1 mL de cada dilución, las que se vertieron en condiciones de esterilidad a placas con  $\pm 15$  mL de medio azul de metileno eosina (EMB) (ver más adelante), fundido y a temperatura de 45° C y después de 48 horas de incubación a  $21^\circ\text{C} \pm 0.1$ , se seleccionaron 7 colonias al azar de la superficie de estos medios y dos más de pseudomonadales obtenidos como promotores del crecimiento vegetal en el medio DF, y todos se sembraron en 25 mL de medio líquido de infusión

cerebro corazón (ver más adelante) para dejarse incubar a temperatura ambiente y en agitación continua durante 48 horas.

De cada una de las 9 suspensiones bacterianas, se tomaron 2 alícuotas de 1 mL, con la primera mediante diluciones decimales en agua peptonada (peptona de caseína en agua destilada  $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 7.0) se les cuantificó la densidad poblacional sin tratamiento, a los tiempos 0, 60 y 120 min. mediante vertida en placa (232) (ver más adelante) en el medio agar cerebro corazón. Con la segunda se observó el efecto de la cal hidratada en solución acuosa a los mismos tiempos. Para esto el mL restante se depositó en 9 mL del sobrenadante centrifugado, a 2 000 rpm durante 10 min., de una suspensión de  $2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de cal hidratada en agua destilada y pH de 11.4, para después de 60 y 120 minutos de incubación a  $21^{\circ}\text{C} \pm 0.1$ , neutralizarlo en agua peptonada, en la dilución  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  donde el pH era de 7.1 o 7.2 y así poder cuantificar por la técnica de la vertida en placa a las células viables, después del tratamiento alcalino, después de los resultados del tratamiento a cada cepa, se contrastaron mediante una técnica de estadística no paramétrica, la suma de rangos de Wilcoxon, para determinar si en al menos dos de los valores obtenidos en cada prueba, existía diferencia estadística significativa.

### **3.5 Experimento 2.- Encalado al suelo de cultivo y su efecto en papa**

El trabajo se estableció en 4 parcelas de 2 hectáreas cada una en la zona productora de papa de Michoacán en la meseta Tarasca (suelo No 3), en el poblado de Patamban municipio de Tangancicuaro, a 2300 msnm.

Se empleó papa *Solanum tuberosum* L. de la variedad Alfa. Los valores de pH en el suelo eran 4.8, 5.8 y 4.6, el contenido de calcio en las parcelas tenía una media de  $5.2\text{ meq}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ . En ellas se realizaron las mismas labores de preparación del suelo, excepto la

aplicación de cal agrícola, que se suministro en las siguientes proporciones:

- a) Un Mg de cal · hectárea<sup>-1</sup>.
- b) Dos Mg de cal · hectárea<sup>-1</sup>.
- c) Tres Mg de cal · hectárea<sup>-1</sup>.
- d) Sin aplicación de cal.

El encalado al suelo se realizó el día 4 de julio del 2001, aproximadamente un mes antes de la fecha de siembra, que fue el 3 de agosto, para que el hidróxido de calcio se neutralizara y el pH estuviera entre los valores de 6 y 7.

Además como fertilizante de base el agricultor empleo superfosfato de calcio 300 kg·ha<sup>-1</sup> y el día 6 de agosto aplicó nitrato de calcio a razón de 200 kg·ha<sup>-1</sup>.

Las variables analizadas fueron:

Concentración de nitratos y potasio en la savia peciolar del cultivo, en los siguientes estadios fenológicos:

- a) 20 cm de altura
- b) Inicio de la floración
- c) 50 % de la floración
- d) 100% de la floración
- e) Decaimiento del follaje
- f) Follaje en suelo

Posterior a la cosecha, en una muestra compuesta tomada de cada tratamiento, se cuantificó el contenido de calcio en los tejidos de los estolones, bulbos y raíces principales de las plantas, mediante espectrofotómetro de absorción atómica (233) marca Perkin Elmer modelo 3100 (Connecticut EE.UU.).

### 3.6 Experimento 3.- Efecto de la cal, el ácido sulfúrico y la mezcla de estos sobre las biotas de fúngicas y bacterianas del suelo

Empleando el suelo 2, bajo un diseño de bloques al azar con cuatro repeticiones, en parcelas de 3 surcos de 1 m de longitud, las que también fueron las parcelas útiles, a 10 días del transplante de un cultivo de cebolla *Allium cepa* L. var. Suprema, se aplicaron sobre el follaje, los siguientes tratamientos:

- a) Encalado.- En proporción de  $18 \text{ Mg} \cdot \text{ha}^{-1}$  de cal hidratada aplicada el día 1.
- b) Encalado-Acidificado.- Encalado en la misma proporción y día que el anterior, acidificado con ácido sulfúrico diluido en agua (ver más adelante) aplicado el día 7, en la concentración neutralizante de la cal adicionada.
- c) Acidificado.- Ácido sulfúrico diluido en agua, aplicado el día 7, en la concentración del tratamiento anterior
- d) Testigo.-Sin tratamiento.

Las muestras se tomaron de cada parcela por triplicado, eliminando a los 10 cm de la superficie del suelo en el lomo de cada del surco y se procesaron el mismo día para estimar la abundancia bacteriana y fúngica, mediante la técnica de vertida en placa. Las lecturas se realizaron periódicamente hasta que los valores de pH en el suelo, fueron similares al inicial.

Los valores medios de las curvas poblacionales de bacterias y hongos sometidos a los tratamientos anteriores, fueron contrastados con los valores de sus testigos con una prueba de estadística no paramétrica, la depares apareados de Wilcoxon con una probabilidad del error  $\alpha = 0.05$

### 3.7 Experimento 4.-Prevalencia del efecto del encalado-acidificación en las poblaciones de *R. solani* del suelo

Con el propósito de determinar el efecto del hidróxido de calcio y ácido sulfúrico, sobre la población de los fitopatógenos de nuestro interés a diferentes profundidades del suelo, se adaptó un metodología descrita por Jiménez y Chew (234) para evaluar la eficiencia de la técnica de la solarización, en este caso se empleó al suelo 2 sin de fertilizante, en un diseño de bloques al azar con tres repeticiones, en 2 lotes de 12 m<sup>2</sup>, divididos en 6 fracciones mediante tablas de madera cubiertas con película plástica, para evitar contaminaciones y además se trabajó en el m<sup>2</sup> central de cada fracción.

Se aislaron cepas de *F. oxysporum* y *R. solani*, a partir de las lesiones de plantas enfermas (235), para el primer caso de frijol de cultivos locales y de papa de la localidad de Patamban Michoacán. Los fitopatógenos se inocularon a semillas de trigo esterilizadas y se incubaron 20 ± 1°C durante un mes, posteriormente se conservaron en refrigeración.

Posteriormente a 3 kilos del suelo mencionado pasado a través de un tamiz de 2.38 mm<sup>2</sup> de luz, se les esterilizó en autoclave a 121°C durante una hora, repitiéndose el procedimiento durante tres días consecutivos. A dos fracciones de este suelo se le inoculó a partir de los cultivos desarrollados en las semillas de trigo, con una concentración de 10<sup>7</sup> propágulos 1g<sup>-1</sup> de *R. solani*.

Para la cuantificación se partió de una suspensión de las fracciones desprendidas de las semillas de trigo por agitación en agua destilada estéril, los propágulos se cuantificaron mediante la técnica de vertida en placa, por triplicado. El suelo estéril fue inoculado mediante un aspersor dándole movimiento continuo.

Con este suelo de inóculo cuantificado, se llenaron sacos de tul de aproximadamente 5 cm<sup>2</sup> con 40 g, 12 de estos sacos fueron introducidos a cada una de las fracciones del suelo

descritas anteriormente, 6 a 10 cm de profundidad y a otros 6 a 20 cm. Los tratamientos al suelo, fueron aplicados en las proporciones de 2, y 6 Mg de cal·ha<sup>-1</sup> y su equivalente en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para neutralizarla (1 400 y 4 200 L·ha<sup>-1</sup>) respectivamente y un testigo sin tratamiento.

Muestras de 10 g de suelo del interior de los sacos se tomaron a 9, 21, 30 y 35 días, es decir hasta el momento en que se igualaron los valores logarítmicos del número de propágulos (UFC) cuantificados en la dilución 10<sup>-4</sup>, con el tratamiento testigo, esto es 35 días después de la aplicación del H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Al final del ensayo se determinó por titulación volumétrica la materia orgánica oxidable en cada parcela experimental (236).

### **3.8 Experimento 5.- Protección al cultivo de papa hacia *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani* y *Fusarium spp*, con microorganismos antagónicos en suelos tratados**

Un Mg del suelo número 1 fue colectado y trasladado a las instalaciones del CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato, para ser depositado en un contenedor de madera recubierta de plástico dividido en 4 áreas, en el se incrementó el inóculo de *R. solani* AG-3 mediante una modificación de la técnica descrita por Carling (237), adicionando el día 3 de febrero de 1996, el micelio fragmentado del patógeno desarrollado sobre medio PDA, en 40 cajas de Petri de 10 cm de diámetro incubadas 25 días a 21°C. Inmediatamente después se sembró a 10 cm de profundidad, en surcos a 20 cm de distancia la semilla-tubérculo de papa que se requirió para cubrir el área.

Después de 15 días se depositaron alrededor de los brotes emergidos, 12 discos de aproximadamente 1 cm de diámetro, con el micelio de *R. solani* y *F. solani* de los géneros de hongo cultivadas en medio PDA en cajas de Petri de 10 cm de diámetro.

Tras de 27 días se retiraron las plántulas emitidas, para estimar el porcentaje de tallos lesionados, el mismo día los tejidos con lesiones aparentes se introdujeron al contenedor, posteriormente el suelo se homogeneizó y se sembraron de nueva cuenta semillas de papa. Al principio del mes de mayo se constató que el 100% de los tallos emergidos de las semillas presentaban lesiones en su superficie. Los tallos lesionados se usaron nuevamente como fuente de inóculo que se introdujo al contenedor.

#### Tratamientos al suelo:

A dos de las fracciones en el contenedor se les adicionó el equivalente de 30 Mg de cal por hectárea, para posteriormente dar un riego pesado a todas. A una fracción con cal y otra sin ella, se les cubrió con un plástico transparente de 25 micras de espesor, se sellaron sus bordes con piedras y suelo para evitar pérdida de temperatura, como lo indica la técnica de solarización, la fracción sin cal y sin plástico se mantuvo como testigo.

Semanalmente durante 35 días se registraron los datos de temperatura del suelo, a 15 cm de profundidad, los cambios de pH y también se cuantificó a las comunidades bacterianas y fúngicas.

A todos los tratamientos se les adicionó a los 27 días fertilizante ácido líquido, con una concentración porcentual de los elementos N, P, K y S, equivalente a (48-64-16-12) la proporción fue de 100 L por hectárea, y a los 52 días ácido sulfúrico diluido en agua para bajar el pH en una unidad.

Una semana después se retiró el plástico y se llenaron macetas con cada uno de los suelos tratados, ahí se sembró semilla de papa adicionada con los microorganismos antagonistas de *Rhizoctonia* y *Fusarium*, en un diseño de bloques al azar con 10 repeticiones, estos fueron 3 bacterias del género *Bacillus*: a las que se les asignaron los siguientes nombres Kodiak®, AG 3 y *Bacillus* y una cepa de *Trichoderma harzianum* IM1206040 en su forma

esporulada y miceliar. Las bacterias y las esporas fueron adheridas a los tubérculos sumergiéndolos en una suspensión en papa dextrosa, que las contenía en las siguientes concentraciones: Kodiak =  $7 \times 10^6$ , AG 3 =  $1.4 \times 10^7$  y *Bacillus* =  $3 \times 10^7$ , *T. harzianum*  $\times 10^8$  como micelio se adhirieron 250 mg a la superficie de los bulbos, además de un tratamiento testigo con la infusión.

Los datos se analizaron mediante el empleo de un diseño factorial A x B, tomando como variable la magnitud del daño entre el número de tallos afectados después de 22 días de desarrollo de la planta (238). La separación medias se hizo mediante la prueba de Tukey, los datos posteriormente fueron transformados mediante el empleo de una escala inversa, a porcentaje de protección (100% protección = 0 daño).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 3.9 Experimento 6.- Demostración de la asociación micro simbiote - papa

En este caso se aislaron de la rizósfera de la variedad Alfa de papa y dentro de plantas resistentes a enfermedades fúngicas (239), bacterias pseudomonadales inductoras del desarrollo vegetal y del género *Bacillus* que de mostraran ser antagónicas a las especies *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani* Ag-3. Para demostrar la asociación, de estos micro simbioses con la planta de papa se modificó la prueba de Romeiro (240) a) cambiando el hospedero, *L. esculentum* por *S. tuberosum* L. var. Alfa; b) el tejido bacterizado, semillas desinfectadas con NaOCl, por la región radical de plántulas cultivadas *in vitro*; c) el medio en que se realizó, el agar agua al 8 % por los medios base Gamborg B-5, el de Murashige y Skoog y este último adicionado con 15 y 30 g de azúcar comercial y 0.004 mg de tiamina por litro de medio.

La evaluación se realizó en un diseño con 5 repeticiones, consistiendo cada repetición, de un recipiente con 2 plántulas de papa, al tiempo en que éstas alcanzaron una altura

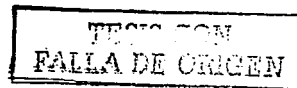


aproximada a los 3 cm, se inocularon con 0.4 mL de una suspensión bacteriana incubada en agitación en papa dextrosa infusión, a temperatura de laboratorio, en concentración de  $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>, cuando su curva de crecimiento se encontraba en fase exponencial. Las cepas probadas fueron las siguientes:

- a) Bacilo esporulado Gram + endofítico aislado de papa silvestre *Solanum* sp. positivo a la prueba de Romeiro, antagónica a *R. solani* AG-3 y *F. solani* denominada 3d'.
- b) Pseudomonadal rizosférico promotor del desarrollo vegetal de solanáceas, aislado de la rizósfera de *S. tuberosum* L. var. Alfa, positivo a la prueba de Romeiro, denominado 5 acc.
- c) Bacilo esporulado Gram + endofítico aislado de jitomate silvestre *L. esculentum* Mill. var. Ceraciforme. (Dunal) Alef. positivo a la prueba de Romeiro, antagónica a *R. solani* AG-3 y *F. solani* denominado Dt.
- d) *Bacillus subtilis* epifítico promotor del desarrollo vegetal de papa, aislado de la rizósfera de *S. tuberosum* L. var. Alfa negativo a la prueba de Romeiro, antagónica a *R. solani* AG-3 y *F. solani* denominado AG-3.
- e) Papa dextrosa como control.

Nota en este caso se empleo para la prueba de Romeiro a la variedad de tomate "Río grande" de la compañía Petoseed.

Después de 7 días de contacto bajo foto periodo de 18 horas de luz diarias, en un banco de iluminación con 3000 luxes de intensidad y a temperatura entre los 21 y 24°C, se observó al estereo microscopio a la región radicular de las plántulas, buscando desarrollo bacteriano asociado en su periferia.



### 3.10 Experimento 7.-Promoción del desarrollo de la papa mediante bacterias endofíticas

En este caso se emplearon de bacterias antagónicas a *R. solani*, con capacidad de asociación con la planta hospedante en el medio Murashige y Skoog aisladas del interior de solanáceas (cepas Dt, 3d'y At) la cepa de *Bacillus subtilis* AG3 que es antagonista que habita en la rizósfera de la papa, que se asocia y penetra a la variedad Alfa, 5 acc pseudomonadal que induce el desarrollo vegetal y que se asocia a la misma variedad y como control se aplicó infusión de papa dextrosa.

Se inocularon 0.4mL de una suspensión bacteriana de cada tratamiento, en concentración del orden de  $1 \times 10^6$ , bajo condiciones de asepsia a plantas de papa de la variedad Alfa con al menos una raíz de 1cm de longitud, se incubaron durante 15 días en un fotoperíodo de 18 horas de luz diarias, en iluminación de 3000 luxes de intensidad y a temperatura entre los 21 y 24°C. Posteriormente, se extrajeron las plántulas de los frascos para eliminar agar de la raíz, esto bajo el chorro agua de la llave, para después trasplantar a 10 vasos de poliuretano por tratamiento ver (diseño), conteniendo turba como sustrato.

Después del trasplante se cubrió a los vasos con bolsas de plástico para evitar el estrés hídrico, tras 15 días de incubación entre 21 y 24°C de temperatura, con un fotoperíodo de 16 horas de luz a 3 000 luxes de intensidad se extrajeron las plántulas para cuantificar la biomasa de cada una de ellas y el contenido de calcio radicular, posteriormente se reaislaron las bacterias endofíticas:

Tratamiento	Cepa
1	Dt
2	3d'
3	At
4	Sacc
5	Papa dextrosa

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Cepas inoculadas a la papa variedad Alfa, para la inducción de desarrollo vegetal.

### **3.11 Medios de cultivo**

#### **3.11.1 Agar papa dextrosa (PDA)**

Elaborado con infusión de papa fragmentada  $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  y sometida a ebullición en agua destilada, por 20 minutos, a esto se le adiciona 20 g de dextrosa y 15 de agar bacteriológico con un pH de 7.0, lo anterior se lleva a un volumen de 1L antes de esterilizar a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 15 minutos.

#### **3.11.2 Medios de cultivo comerciales**

Agar cuenta estándar marca Difco, Infusión cerebro corazón como líquido y agar y eosina azul de metileno marca Oxoid, hidratados y esterilizados de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

#### **3.11.3 Medio Martin**

Para un litro de agua destilada se adiciona lo siguiente:

20.0 g Agar bacteriológico.

1.0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

0.5 g  $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

5.0 g Peptona.

10.0 g Dextrosa.

Rosa de Bengala  $3.3 \text{ mL}$  en una solución con  $6.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , después de esterilizar a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 minutos y antes de que solidifique el agar.

#### **3.11.4 Para el aislamiento de rizobacterias promotoras del desarrollo vegetal**

##### **3.11.4.1 Medio PAF**

10 g de caseína hidrolizada.

1.5 g de  $\text{Mg SO}_4$  anhidro.

1.5 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  dibásico.

10 mL de glicerol.

Llevar a 100 mL.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 3.11.4.2 Medio DF (Dworking y Foster).

Medio mínimo en sales requeridas por pseudomonadales.

2.0 g de  $\text{NH}_3 \text{SO}_4$ .  
 4.0 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .  
 6.0 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .  
 0.2 g de  $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .  
 1 mg de  $\text{Fe SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .  
 10  $\mu\text{g}$  de  $\text{BO}_3\text{H}_3$ .  
 10  $\mu\text{g}$  de  $\text{Mn SO}_4$ .  
 70  $\mu\text{g}$  de  $\text{Zn SO}_4$ .  
 30  $\mu\text{g}$  de  $\text{Cu SO}_4$ .  
 10  $\mu\text{g}$  de  $\text{MO O}_3$ .

20 g de agar (cuando sólido).

Llevar a un litro con agua destilada.

El sulfato de amonio se sustituye por el 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) en concentración 3 mM.

Para esto se tomó un gramo de suelo de rizósfera y se inoculó a 50 mL del medio PAF (sin sulfato de amonio), dentro de un matraz Erlenmeyer de 250 mL a temperatura ambiente (aproximadamente de 20° C). Se dejó en agitación durante 24 horas, después se transfirió 1 mL de la suspensión, a otro matraz con el mismo medio en condiciones similares otras 24 horas, tras este tiempo, se transfirió 1 mL de la suspensión al mismo medio pero adicionado de 2  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sulfato de amonio, se le incubó en las mismas condiciones y tiempo para de aquí transferir otro mL al medio original pero ahora adicionado de 0.3033  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de (ACC) como fuente de nitrógeno. Se incubó como anteriormente, para después tomar inóculos de 1 mL para depositarlos en cajas de Petri en donde se les vertió el medio DF adicionado de (ACC) y agar en condiciones de esterilidad.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **3.12 Adición de cal al suelo de cultivo**

La cal se aplicó a todos los experimentos excepto el 2, en volúmenes de 1kg, para así distribuirla en la superficie del suelo seco, incorporándola inmediatamente después de aplicarla mediante la adición de un riego pesado.

En el experimento 2 por se aplicó mediante una tolva para polvos unida a un tractor, después de rastrear el terreno, posteriormente se incorporó cruzándolo con la rastra.

### **3.13 Adición del ácido sulfúrico al suelo de cultivo**

Este se aplicó sobre parcelas experimentales, diluyendo el volumen de ácido sulfúrico concentrado requerido (hasta 2.1 L) en recipientes con agua de 200 L y esta dilución se vertió en la superficie de las parcelas con una regadera manual.

### **3.14 Estimación de las biotas fúngicas y bacterianas del suelo**

La toma de muestras de suelo se realizó por triplicado. Para los recuentos microbianos en ellas se utilizó la técnica de vertida en placa. Con alicuotas de suelo de 10 g y como diluyente agua peptonada ( $1g \cdot 1 L^{-1}$  de agua destilada). Para el caso de las biotas bacterianas el medio de cultivo vertido fue el agar cuenta estándar y agar papa dextrosa, para las biotas fúngicas el medio de Martin. La incubación se llevó a temperatura de  $21^{\circ}C \pm 0.1$ .

### **3.15 Aislamiento de rizobacterias antagonicas a los fitopatógenos**

Para el aislamiento de las bacterias de la rizósfera, antagonistas a las especies de *Fusarium* spp y *Rhizoctonia solani* parásitas de papa, se empleó una técnica de impronta con esponja

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

(241) cual consistió en tomar del campo una planta del cultivo deseado y desenterrarla, sacudirla para eliminar los terrones grandes adheridos a la raíz para trasladarla al laboratorio, aquí de nueva cuenta se sacudirá enérgicamente sobre hojas limpias de papel con el objeto de recolectar las partículas más finas adheridas a la zona radicular. Estas partículas, fueron colectadas con cilindros de hule espuma estériles de 2.5 cm de diámetro, con los cuales se sembró a manera de impronta, sobre medio PDA.

Después de 24 horas de incubación a 20° C se aislaron las colonias bacterianas que fueron de nuestro interés, en este caso las que tuvieron color blanco, con elevación plana, borde irregular, aspecto seco características a la luz transmitida opaca a la luz reflejada mate, de consistencia cremosa. Con morfología microscópica parecida a las del género *Bacillus* es decir bacilos largos Gram positivos con espora central. Otra metodología ensayada fue la siembra en el medio PDA, de fracciones de 0.5 cm de raíces recién extraídas del suelo, de vegetales resistentes y susceptibles a patógenos hipogeos, lavadas previamente con agua de la llave, para de aquí después de 48 horas de incubación a 21°C ± 0.1 aislar y confrontar *in vitro*, a las rizobacterias que se desarrollaron, contra los fitopatógenos de nuestro interés.

### **3.16 Aislamiento de bacterias endofíticas**

La extracción y el aislamiento bacteriano, se realizó lavando con detergente a los materiales previamente a su aseptización con NaOCl al 3% durante 5 minutos, el desinfectante fue eliminado por una serie de 3 enjuagues con agua destilada estéril. Posteriormente se licuaron con 30 mL agua peptonada 1g·L<sup>-1</sup> durante 15 segundos a máxima velocidad, dentro de mini vasos de una licuadora comercial o se maceraron dentro de un homogenizador de vidrio según la dureza del tejido, suspendiendo el macerado en 9 mL de agua peptonada.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La carga bacteriana en el material licuado fue cuantificada diluyendo 1 mL de él mediante la técnica de la vertida en placa y con la siembra directa de 0.2 mL en conteo por superficie en medios de cultivo (PDA)

Como control del método se cuantificaron las UFC que sobrevivieron a la desinfección antes de licuar.

Los resultados se leyeron 48 horas después de incubar a  $21^{\circ}\text{C} \pm 0.1$ .

Otra metodología ensayada fue mediante la siembra en el medio PDA de raíces lavadas con agua de la llave, de las que después de 48 horas de incubación a  $21^{\circ}\text{C} \pm 0.1$ , se aislaron a las colonias bacterianas desarrolladas sobre el medio a partir de la raíz, para de aquí confrontar *in vitro*, a estas rizobacterias contra los fitopatógenos en estudio.

### **3.17 Conservación de las cepas aisladas (Liofilización)**

Las cepas aisladas tanto de bacterias como de hongos fueron conservadas mediante liofilización, empleando microorganismos en fase de crecimiento exponencial, cultivados en 25 mL de infusión de papa dextrosa, dentro de matraces Erlenmeyer de 125 mL, en agitación constante a temperatura ambiente de laboratorio  $20^{\circ}\text{C} \pm 2$ . El período de incubación fue para el caso de las bacterias de 24 horas y para los hongos 5-8 días. Después de este tiempo de se colectaron a los microorganismos con asas bacteriológicas para depositarlos dentro de ampollitas de 2 mL, usando como medio de soporte una solución diluida al 10 % de leche en polvo descremada (Svelty). El liofilizador empleado fue marca Labconco Liph lock 4.5 (Kansas City EE.UU.) el cual trabaja a temperatura de  $-50^{\circ}\text{C}$  y con un vacío 10 micras de presión de mercurio.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 3.18 Aislamiento e identificación de los fitopatógenos

Para el aislamiento de los fitopatógenos materia de este trabajo, se colectaron de los sitios en donde se establecería cada ensayo, plantas de papa o frijol según el caso, con lesiones en la región radical. A partir de estas lesiones se realizaron los aislamientos de acuerdo a la técnica descrita por Agrios (235), empleando para asepticar NaOCl al 3% y sembrando en el medio PDA. A las 24 o 48 horas de desarrollo miceliar sobre el medio de cultivo, se cortaron las puntas de las hifas de las cepas en desarrollo y se transfirió cada punta a una caja nueva, para asegurar la identificación de una sola especie. Ésta se realizó para el caso de *Rhizoctonia* mediante la confrontación con las cepas de referencia según las técnicas descritas por Ogoshi (242) y para *Fusarium* una cepa de *F. solani* fue obtenida del CINVESTAV- Irapuato y otra de *F. oxysporum* a graves del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.

### 3.19 Lectura de pH en el suelo

Cuando fue necesario medir el pH del suelo, se tomaron muestras de 10 g de él a las profundidades requeridas, para suspenderlas en 20 mL de agua y así determinar el valor del pH mediante la técnica descrita por Jackson (236).

### 3.20 Cuantificación del contenido de nitratos y potasio en savia

La savia se extrajo en campo, de las nervaduras centrales de follaje joven, con una prensa manual, la que se depositó en los sensores de los lectores de iones compactos para nitratos y potasio respectivamente de la marca Cardy, Horiba, Kyoto, Japón,.

ENCLOSURE CON  
FALLA DE ORIGEN



### **3.21 Determinación del calcio tisular**

Ésta se realizó de muestras tomadas en campo de los tejidos de raíz, tubérculo y estolón, las que fueron deshidratadas en un horno de aire forzado durante 24 horas para llevarlas a peso constante y ser pulverizadas en un molino de martillos marca Janke & Kunkel Bresigau Alemania, los valores fueron determinados en un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer 3100 Norwalk EE.UU. de acuerdo al manual editado por Etchevers (233).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### IV.- RESULTADOS

##### 4.1 Experimento 1.- Efecto de la cal en solución acuosa sobre las bacterias Gram negativas del suelo

Al contrastar el efecto de la cal en solución acuosa saturada ( $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), sobre la viabilidad de 9 cepas bacterianas Gram negativas, se apreciaron diferentes niveles de sensibilidad al tratamiento alcalino en cada una de ellas, lo cual se manifestó en el número de células que se desarrollaron en el medio BHI, en la dilución equivalente a 1:10 000, a los tiempos 0, 60, y 120 minutos de efecto alcalino. Los resultados se presentan a continuación en la **Tabla 2**. Y en ella se puede observar, en general un efecto bactericida de la cal hidratada en solución acuosa, siendo en este caso los pseudomonadales los organismos más sensibles.

**Tabla 2.** Supervivencia de diferentes géneros de bacterias Gram negativas obtenidas del suelo, que sobreviven al efecto de la cal hidratada en solución acuosa después de 60 y 120 minutos de contacto.

Cepa	1				2				3			
	Tes.	$\sigma$	cal	$\sigma$	Tes.	$\sigma$	cal	$\sigma$	Tes.	$\sigma$	cal	$\Sigma$
0	8320	$\pm 643$	8320	$\pm 643$	768	$\pm 42$	768	$\pm 42$	7656	$\pm 40$	7656	$\pm 40$
60	8000	$\pm 811$	8512	$\pm 204$	640	$\pm 36$	90	$\pm 25$	7688	$\pm 37$	45	$\pm 8$
120	10240	$\pm 310$	3136	$\pm 204$	960	$\pm 40$	4	$\pm 1.6$	9658	$\pm 22$	24	$\pm 4$
Cepa	4				5				6			
	Tes.	$\sigma$	cal	$\sigma$	Tes.	$\sigma$	cal	$\sigma$	Tes.	$\sigma$	cal	$\Sigma$
0	2344	$\pm 32$	2344	$\pm 32$	5680	$\pm 40$	5680	$\pm 40$	1820	$\pm 40$	1820	$\pm 40$
60	1800	$\pm 38$	62	$\pm 16$	6220	$\pm 32$	36	$\pm 4.8$	1800	$\pm 81$	32	$\pm 6.5$
120	2380	$\pm 41$	26	$\pm 6$	6100	$\pm 94$	18	$\pm 2.4$	2040	$\pm 322$	47	$\pm 19.6$
Cepa	7				8				9			
	Tes.	$\sigma$	cal	$\sigma$	Tes.	$\sigma$	cal	$\sigma$	Tes.	$\sigma$	cal	$\Sigma$
0	5678	$\pm 79.6$	5 678	$\pm 79.6$	14784	$\pm 816$	14784	$\pm 816$	17472	$\pm 123$	17472	$\pm 123$
60	5788	$\pm 81.6$	234	$\pm 24$	13760	$\pm 432$	0	$\pm 0$	19200	$\pm 432$	8	$\pm 4$
120	5920	$\pm 40.8$	436	$\pm 24$	16064	$\pm 514$	0	$\pm 0$	19958	$\pm 542$	1	$\pm 8$

t = tiempo en minutos.

Cepa # 1 y 2 género *Agrobacterium*.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Cepa # 3 y 5 género *Nitrobacter*.

Cepa # 6 y 7 no identificadas.

Cepa # 8 y 9 pseudomonadales.

Cal = tratamiento alcalino.

Cifras en la Tabla = unidades formadoras de colonias · mL<sup>-1</sup>.

Tes = testigo.

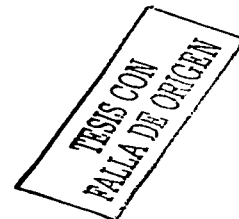
Los valores de las medias poblacionales, fueron sometidos a la prueba de suma de rangos de Wilcoxon, encontrándose diferencia estadísticamente significativa, en al menos dos de los valores (60 y 120 minutos) en todos los tratamientos con  $p \alpha = 0.05$ .

#### 4.2 Experimento 2.-Encalado al suelo de cultivo y su efecto en papa

Al analizarse el contenido de nitratos y potasio en la savia de los peciolas, del cultivo de papa a nivel de campo destaca que al aplicar el equivalente de 1 Mg de cal agrícola por hectárea al suelo, el contenido de nitratos se incrementó en todos los estadios fenológicos del cultivo y esto en más del 50 % con respecto al tratamiento control, en los estadios previos a la mitad de la floración **Tabla 3**. Al aplicar la dosis 2 y 3 Mg del mismo compuesto, los nitratos ya no se incrementaron y los niveles de potasio en la mayoría de los estadios decreció **Tabla 4**.

**Tabla 3.** Contenido de nitratos en la savia peciolar del cultivo de papa, en un suelo ácido enmendado con tres niveles de cal agrícola.

Estadio	Nitratos en savia peciolar ppm			
	Control	1 Mg·ha <sup>-1</sup>	2 Mg·ha <sup>-1</sup>	3 Mg·ha <sup>-1</sup>
20 cm de altura	1293 B	3766 A	1600 B	1650 B
Inicio floración	1233 B	3256 A	1675 B	1600 B
50% floración	2180 B	4566 A	1866 B	1700 B
100% floración	2400 B	2700 A	2266 B	2300 B
Hojas abajo	2000 B	2300 A	2000 B	1900 B
Tallos abajo	1750 B	2166 A	1633 B	1700 B



Las letras significan igualdad estadística al contrastar medias por Tukey = 449.32  $\alpha = 0.05$   
 C.V. = 23.61  
 T = Tratamiento

**Tabla 4.** Contenido de potasio en la savia peciolar del cultivo de papa, en un suelo ácido enmendado con tres niveles de cal agrícola.

Estadio \ T	Potasio en savia peciolar ppm			
	Control	1 Mg·ha <sup>-1</sup>	2 Mg·ha <sup>-1</sup>	3 Mg·ha <sup>-1</sup>
20 cm de altura	4566 A	4800 A	3333 A	3200 A
Inicio floración	4066 A	4233 A	3363 A	3400 A
50% floración	3533 A	2766 A	5233 A	3500 A
100% floración	3233 A	2666 A	2733 A	3000 A
Hojas abajo	3000 A	2633 A	2666 A	2700 A
Tallos abajo	2466 A	2133 A	1966 A	2000 A

Las letras significan igualdad estadística al contrastar medias por Tukey = 519.34  $\alpha = 0.05$   
 C.V. = 18.12  
 T = Tratamiento

#### 4.2.1 Contenido de calcio en follaje, estolón, bulbo y raíz de papa

El análisis del contenido de calcio en el follaje y tallo de las plantas bajo tratamiento, nos indica que el aplicar cal al suelo en proporciones de 1 a 3 Mg·ha, no se refleja en las estructuras aéreas de la papa **Tabla 5** los datos están dados en mg por Kg de materia seca.

**Tabla 5.-** Calcio en la materia seca, en las estructuras aéreas de la planta de papa.

Tratamiento	Control	1 Mg·ha <sup>-1</sup>	2 Mg·ha <sup>-1</sup>	3 Mg·ha <sup>-1</sup>
	mg de Ca·Kg	mg de Ca·Kg	mg de Ca·Kg	mg de Ca·Kg
Tejido				
Follaje	10 115	9 889	10 110	10 120
Tallo	7 325	6 789	7 651	7 851

En la **Tabla 6** se observa a continuación, que existe una tendencia creciente en el estolón y el tubérculo a acumular calcio a medida que se incrementan los niveles de cal en el suelo y que en la raíz principal esta tendencia no es uniforme. El análisis estadístico se realizó solo con los tejidos bajo suelos, sin embargo no existió diferencia estadística entre los valores de calcio tisular.

**Tabla 6.- Calcio en la materia seca, en las estructuras radicales de la planta de papa.**

Tratamiento Tejido	Control mg de Ca·Kg	1 Mg·ha <sup>-1</sup> mg de Ca·Kg	2 Mg·ha <sup>-1</sup> mg de Ca·Kg	3 Mg·ha <sup>-1</sup> mg de Ca·Kg
Raíz	7 700 A	7 800 A	8 000 A	7 850 A
Estolón	6 025 A	6 223 A	6 123 A	6 342 A
Tubérculo	7 650 A	7 900 A	8 800 A	8 800 A

Las letras significan igualdad estadística al contrastar media por Tukey = 519.34  $\alpha = 0.05$  C.V. = 18.12

### **4.3 Experimento 3.-Efecto de la cal, el ácido sulfúrico y la mezcla de estos sobre las biotas fúngicas y bacterianas del suelo**

#### **4.3.1 Efecto del ácido sulfúrico sobre la biota bacteriana del suelo**

El ácido sulfúrico bajó el pH del suelo en poco tiempo en una unidad, paralelamente abatió a las biotas bacterianas presentes, en al menos un logaritmo, en el efecto supresor continuó por más de 30 días aún después de que el suelo neutralizó el pH. **Figura 1.**

#### **4.3.2 Efecto del ácido sulfúrico sobre la biota fúngica del suelo**

La adición de ácido sulfúrico también abatió a la población de hongos del suelo, al menos en un logaritmo, durante cerca de un mes, el pH del suelo regresó a su valor inicial después de este periodo **Figura 2.**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### **4.3.3 Efecto de la cal sobre la biota bacteriana del suelo**

El efecto de la cal en la población bacteriana  $18 \text{ Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$  se apreció aproximadamente a los 42 días de la aplicación del hidróxido de calcio, aún cuando el pH del suelo ya había decrecido y estaba muy próximo al del tratamiento testigo. **Figura 3.**

#### **4.3.4 Efecto de la cal sobre la población fúngica del suelo**

El efecto supresor de la cal sobre la población fúngica, se manifestó entre los 15 a 30 días posteriores a su adición, por un periodo muy corto, cuando el pH en el suelo encalado se igualó con el del testigo. **Figura 4.**

#### **4.3.5 Efecto conjunto de la cal y el ácido sulfúrico sobre la biota bacteriana**

La adición de cal hidratada ( $18 \text{ Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) a partir del primer día, reduce a la población bacteriana dentro del suelo de cultivo, observándose una decremento constante con respecto al testigo, el ácido sulfúrico aplicado el séptimo día, continúa con este efecto alcanzando un valor de 2 logaritmos de diferencia **Figura 5.**

#### **4.3.6 Efecto conjunto de la cal y el ácido sulfúrico sobre la biota fúngica**

La cal ( $18 \text{ Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) aplicada el primer día y el ácido sulfúrico al séptimo, mantienen a la biota fúngica del suelo abatida, durante los 35 días de cuantificación. En relación al pH del suelo, este tendió a mantenerse cercano a la neutralidad **Figura 6.**

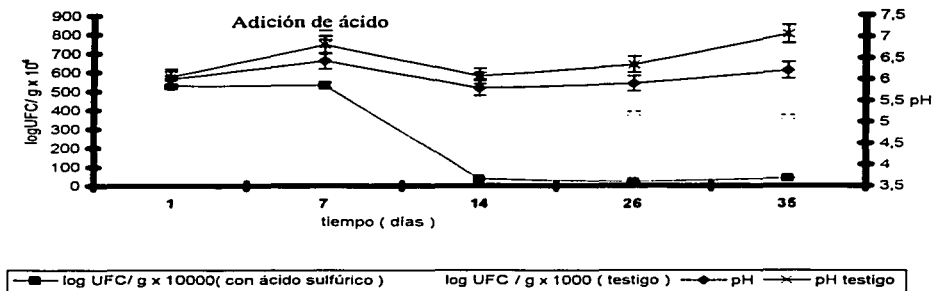


Figura 1. - Efecto del H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sobre las bacterias del suelo

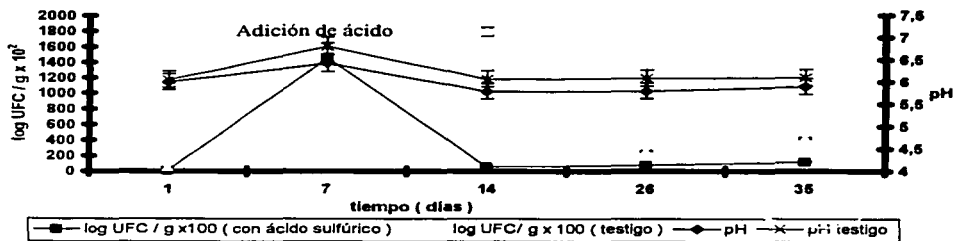


Figura 2.- Efecto del H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sobre los hongos del suelo

FÍSICO QUÍMICO  
 FALLA DE ORIGEN

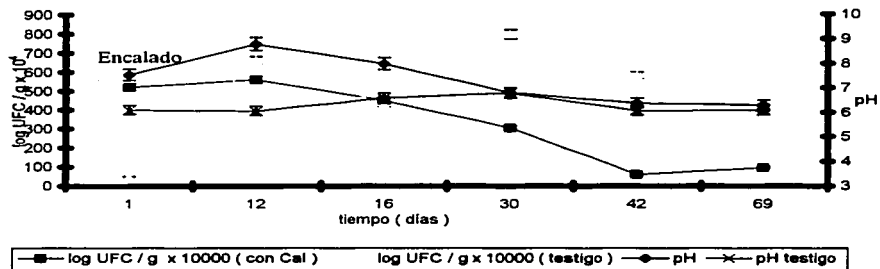


Figura 3.- Efecto de la cal sobre las bacterias del suelo

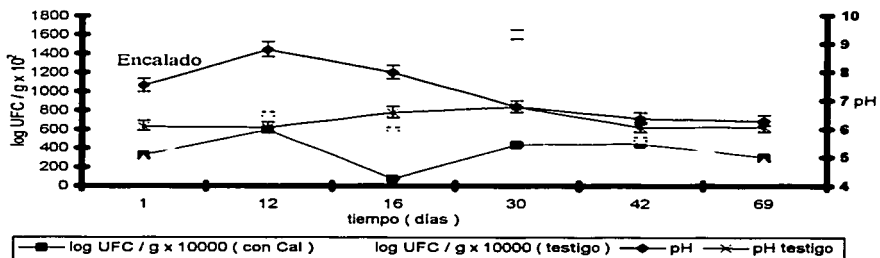


Figura 4.- Efecto de la cal sobre los hongos del suelo

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



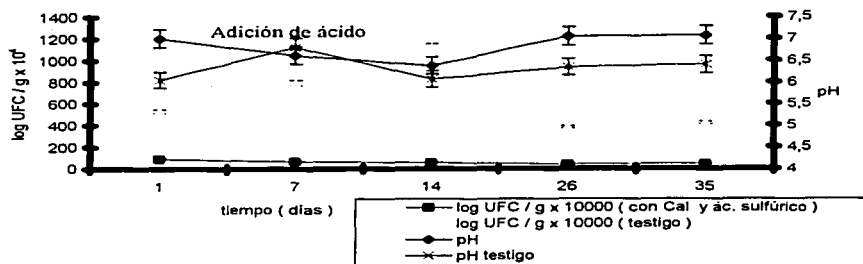


Figura 5.- Efecto de la cal y el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sobre las bacterias del suelo

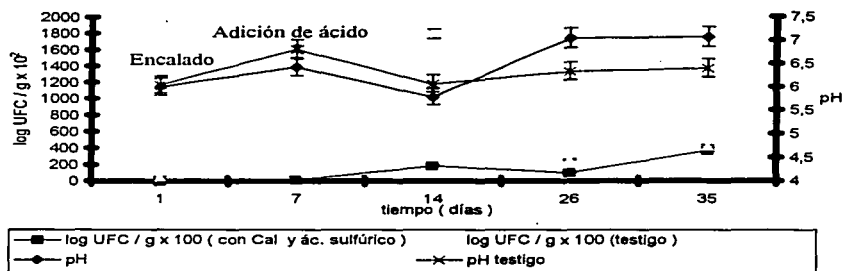


Figura 6.- Efecto de la cal y el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sobre los hongos del suelo.

TRABAJO CON  
FALLA DE ORIGEN

El análisis estadístico determinó que las poblaciones bacterianas y fúngicas en todos los tratamientos anteriores (4.3.1-4.3.6), en al menos en dos valores de las curvas poblacionales se presentaban diferencias significativas con respecto al testigo. En los tratamientos acidificados esto se reflejó en las lecturas inmediatas. En el de encalado sobre bacterias después de 30 días y el de encalado sobre hongos en las cuantificaciones a 16 y 30 días de iniciado el tratamiento. Por lo tanto se rechaza  $H_0$  por pares apareados de Wilcoxon en  $\alpha = 0.05$  para las poblaciones tratadas y sin tratamiento.

Al comparar el efecto de los tratamientos en la **Tabla 7** se demuestra según la prueba de Tukey, que cada tratamiento aplicado sobre las bacterias tiene un efecto estadísticamente diferente en el abatimiento de su población, siendo el de ácido sulfúrico aunado a la cal, el que más la reduce.

**Tabla 7.-** Contrastación de las medias de los valores obtenidos para las bacterias en los diferentes tratamientos por la prueba de Tukey.

Tratamiento	Media
Control	536 A
Cal	378 B
Ac. Sulfúrico	231 C
Ac. Sulfúrico + Cal	62 D

C.V. 40.59 Tukey 119.38  $\alpha = 0.05$

En la **Tabla 6** se observa que en los hongos el efecto de todos los tratamientos abate a la población de manera estadísticamente similar, excepto el de encalado, el cual es semejante al control.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 8.-** Contrastación de las medias de los valores obtenidos para los hongos en los diferentes tratamientos por la prueba de Tukey.

Tratamiento	Media
Control	824 A
Cal	322 AB
Ac. Sulfúrico + Cal	220 B
Ac. Sulfúrico	87 B

C.V. 22.94 Tukey 374.82  $\alpha = 0.05$

Con respecto al rendimiento del cultivo no hubo diferencia estadística significativa entre los tratamientos según Tukey con probabilidad de  $\alpha = 0.05$ .

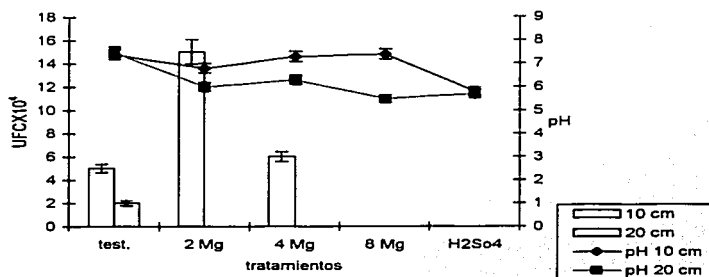
#### **4.4 Experimento 4.-Prevalencia del efecto los tratamientos ácido-alcalinos en la población de *F. oxisporum* y *R solani***

##### **4.4.1 Prevalencia de los tratamientos ácido-alcalinos en la población de *F. oxisporum***

Aquí se observó la reducción la población de *F. oxisporum* en un logaritmo a los 20 cm de profundidad desde la dosis de  $2 \text{ Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$  de cal neutralizada y en ambas profundidades cuando se aplicaron más de  $4 \text{ Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$  y con el ácido sulfúrico en la proporción necesaria para neutralizar  $4 \text{ Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$  de cal. El efecto se acentuó a medida que las concentraciones del tratamiento se incrementaron y este se determinó hasta el momento en que se igualaron los valores logarítmicos del número de propágulos (UFC) cuantificados en la dilución  $10^{-5}$  esto es 35 días después de la aplicación del ácido sulfúrico **Figura 7. a), b), c) y d).**

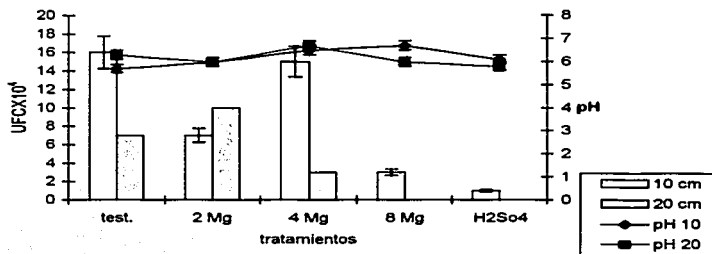
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

a) Después de 9 días de neutralizar

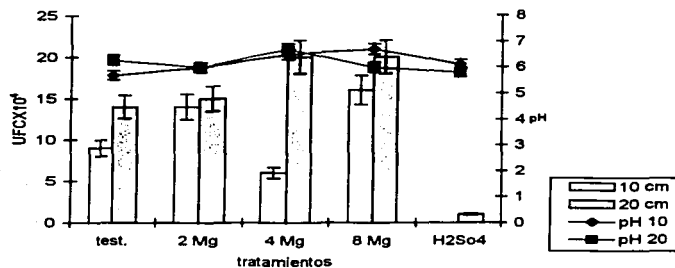


b) Después de 21 días de neutralizar

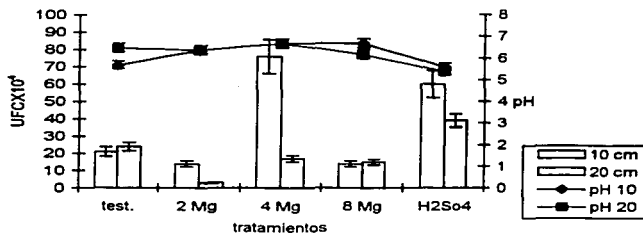
TESIS CON FALLA DE ORIGEN



c) Después de 30 días de neutralizar



d) Después de 35 días de neutralizar



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 7.-Efecto de los tratamientos ácido alcalinos sobre *F. oxysporum* y el pH del suelo.- La prevalencia del efecto de los tratamientos ácido-alcalinos, sobre las conidias de *F. oxysporum* las bolsas bajo el suelo, se aprecia en las barras hasta 35 días después de la aplicación del H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el tratamiento con este reactivo es el de mayor prevalencia a los 21 días el pH del suelo es semejante al tratamiento testigo. Valores de pH y propágulos de *F. oxysporum* después de a) 9, b) 21, c) 30 y d) 35 días de acidificar el suelo.

#### 4.4.1.1 Efecto de los tratamientos sobre la materia orgánica del suelo

Según se aprecia en los resultados sobre la determinación del porcentaje de materia orgánica, en los suelos de las parcelas experimentales (**Tabla 9**), ésta se mantuvo después de los tratamientos en una concentración similar a la de los testigos.

**Tabla 9.-** Determinación del porcentaje de materia orgánica a diferentes profundidades, en las parcelas experimentales después de 35 días de haber aplicado los tratamientos ácido-alcalinos.

TRATAMIENTO	PROFUNDIDAD	% DE M.O.
Testigo	10 cm	3.03
Testigo	20cm	3.03
2 Mg·ha <sup>-1</sup>	10 cm	3.38
2 Mg·ha <sup>-1</sup>	20 cm	3.22
4 Mg·ha <sup>-1</sup>	10 cm	3.11
4 Mg·ha <sup>-1</sup>	20 cm	3.09
8 Mg·ha <sup>-1</sup>	10 cm	3.39
8 Mg·ha <sup>-1</sup>	20 cm	3.01
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 cm	3.09
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20 cm	3.24

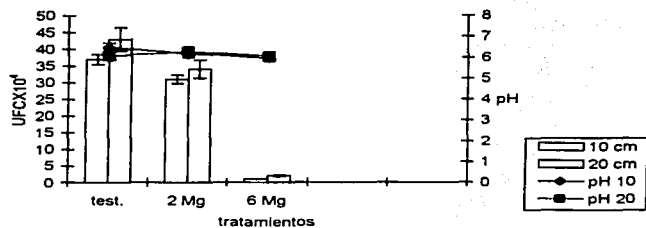
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

M.O.= Materia orgánica

#### 4.4.2 Prevalencia de los tratamientos ácido-alcalinos en la población de *R. solani*.

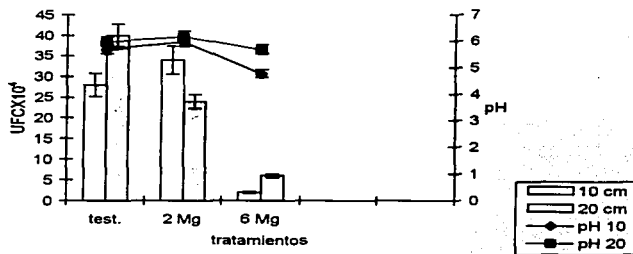
Aquí se observa que el efecto ácido-alcalino sobre la población de *R. solani*, a profundidades en el suelo de 10 y 20 centímetros fue similar en todos los tratamientos y que a mayor concentración del tratamiento el efecto persiste durante más tiempo, los valores de pH del suelo se igualaron en los tratamientos después de 15 días **Figura 8. a), b), c) y d)**.

**a) Después de 2 días de neutralizar**

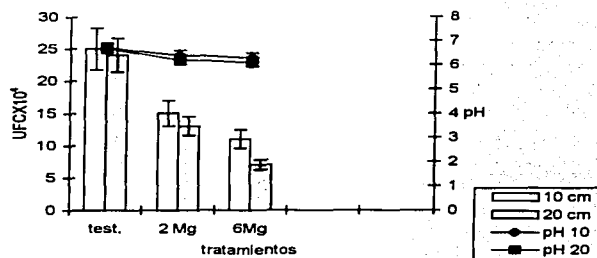


**b) Después de 8 días de neutralizar**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



c) Después de 15 días de neutralizar



d) Después de 20 días de neutralizar

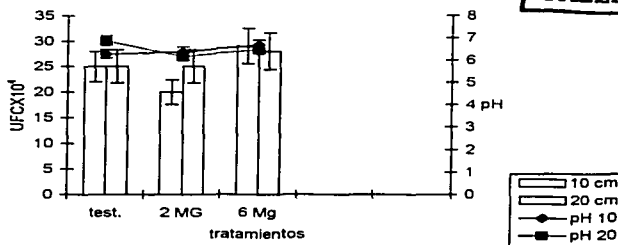


Figura 8.-Efecto de los tratamientos ácido alcalinos sobre *R. solani* y el pH del suelo.- Las barras señalan la cantidad de propágulos de *R. solani* registrados a diferentes tiempos en los tratamientos ácido-alcalinos, en las profundidades de 10 y 20 centímetros y las líneas los cambios en el pH. Valor de pH y propágulos de *R. solani* después de a) 2, b) 8, c) 15 y d) 20 días de acidificar el suelo.



#### 4.4.2.1 Efecto de los tratamientos en el pH del suelo

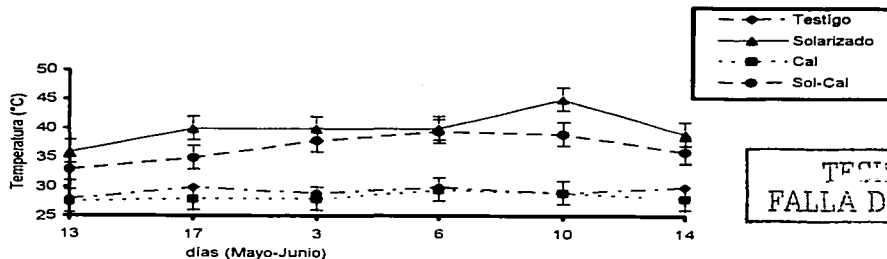
En general en todos los tratamientos al suelo en los que se les aplicó cal como neutralizante del ácido sulfúrico, se pudo apreciar el efecto amortiguador de está manteniendo el pH estable en un valor cercano al siete, a 10 y 20 cm de profundidad. Excepto en el tratamiento con 8 Mg·ha<sup>-1</sup> de cal a 20 cm de profundidad los 21 días en donde se obtuvo un valor cercano a 6. En el tratamiento con el H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> en volumen de 2 800 L·ha<sup>-1</sup> sin neutralizar, el valor del pH se mantuvo próximo a 5 después de 35 días de haber aplicado.

### 4.5 Experimento 5-Protección al cultivo de papa hacia *R. solani* y *F. solani*, por microorganismos antagonísticos en suelos tratados

#### 4.5.1 Tratamiento por solarización

##### 4.5.1.1 Temperatura del suelo

El efecto hidrotérmico en la solarización es probablemente el más importante en la desinfección del suelo, en este caso la temperatura se incrementó bajo la película plástica 10° C en el mes de mayo y hasta 15 en el de junio, la temperatura en los tratamientos adicionados con cal siempre fue menor. **Figura 9.**

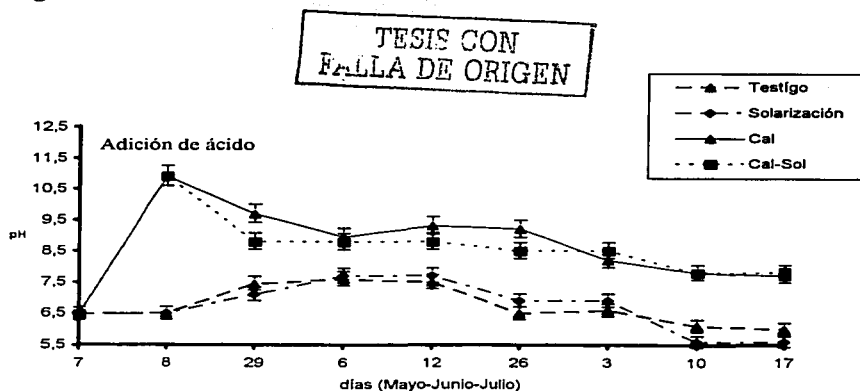


**Figura 9.- Registro de la temperatura del suelo.-**En la figura se grafican las medias de las temperaturas máximas a 10 cm de profundidad en los tratamientos durante los meses de mayo y junio.

TFSE CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 4.5.1.2 pH del suelo

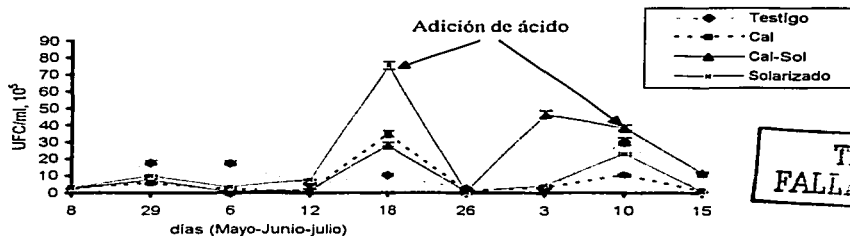
El efecto desinfectante de la cal en el suelo, lo hemos observado esencialmente sobre las bacterias y este depende de la alcalinidad máxima que se alcance. Con respecto al pH del suelo, el tratamiento solarizado mantuvo valores próximos al del testigo. En los otros tratamientos, la cal lo incrementó por arriba de 11 en los primeros 8 días, después su efecto decreció paulatinamente durante más de un mes, con la adición del fertilizante ácido líquido y de ácido sulfúrico se neutralizó a pH propicio para la siembra del cultivo. Los tratamientos solarizados tendieron a mantener un pH inferior respecto a los que no lo fueron. **Figura 10.**



**Figura 10.- Cambios en el pH del suelo.-** Los tratamientos dentro del contenedor, los días 7 de mayo encalado, 25 de junio adición del fertilizante ácido líquido ( $100 \text{ L}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) y 10 de julio 1 000 L de ácido sulfúrico por tratamiento.

#### 4.5.1.3 Comportamiento bacteriano en el suelo

Los tratamientos aplicados al suelo redujeron a la población bacteriana que lo habita, manteniendo a su número poblacional por debajo del testigo. Después de la adición del fertilizante ácido líquido y el ácido sulfúrico los días 18 de junio y 10 de julio es muy marcado el abatimiento en las poblaciones en todos los tratamientos. La cal en el suelo, mantuvo ligeramente reducidas a las poblaciones bacterianas, la solarización después de una supresión por más de un mes incrementa el número de unidades formadoras de colonias. **Figura 11.**

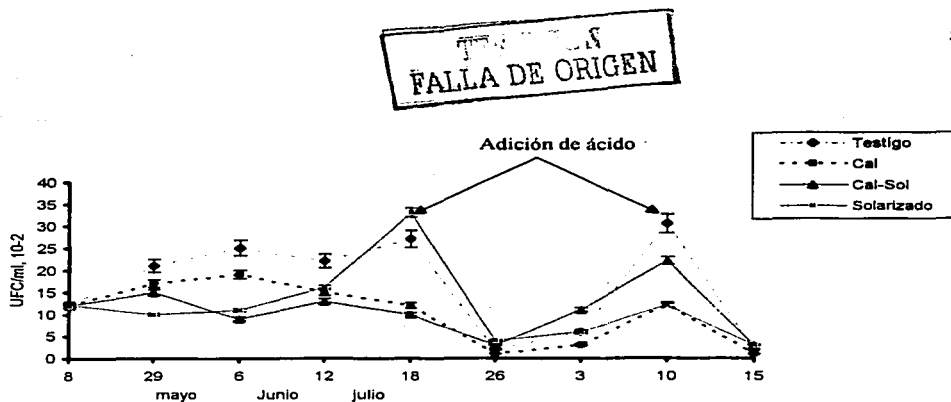


**Figura 11.- Comportamiento de la población bacteriana.-** Los tratamientos ácidos aplicados el día 18 de junio y de ácido sulfúrico 10 de julio y abaten abruptamente a esta población.

#### 4.5.1.4 Comportamiento fúngico en el suelo

Los tratamientos aplicados al suelo redujeron a las biotas fúngicas y después de la adición del fertilizante ácido líquido y el ácido sulfúrico los días 18 de junio y 10 de julio fue muy marcado el decremento en las poblaciones. **Figura 12.**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 12.- Comportamiento de la población fúngica.-** En la dilución  $1 \times 10^2$  a 10 cm de profundidad, en los 4 tratamientos, se aprecian los decrementos inducidos por la adición, de los tratamientos ácidos los días 18 de junio 10 de julio.

#### 4.5.1.5 Efecto de los tratamientos en la protección contra *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* y *Fusarium spp*

El daño causado por *Fusarium solani* inoculado al contenedor y *Fusarium spp* contenido en el suelo naturalmente, no se manifestó en ningún tratamiento de manera consistente por lo que no se pudo evaluar. Con *R. solani*, el índice de daño en el testigo fue de 31.25%, los antagonistas *B. subtilis* AG-3 y *Bacillus sp.* tuvieron un 100% de control sobre *R. solani* en los tratamientos de encalado y solarizado, *B. subtilis* (Kodiak<sup>MR</sup>) alcanzó una protección del 97.5 en el suelo sin tratamiento. *T. harzianum* inoculado en forma de esporas dio una protección de 98.75% en suelo solarizado no así donde se inoculó en suelo encalado (59.46%). Se observa que la eficiencia del *T. harzianum* se reduce considerablemente en los suelos alcalinizados tanto en su forma esporulada como micelial, llegando a ser la protección menor que en el tratamiento testigo **Tabla 10**.

**Tabla 10.-Efecto de los tratamientos al suelo y del biocontrol sobre *R. solani*.**

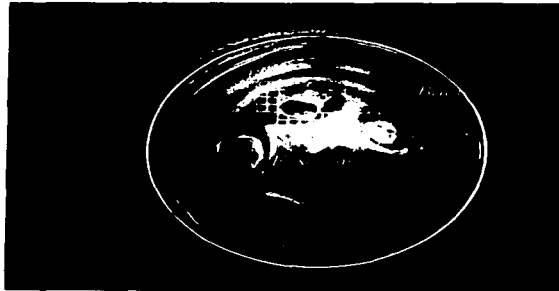
TRATAMIENTO	Cal+Acido	Solarizado	Cal+Solarizado	Testigo
<i>B. subtilis</i> AG-3	100 A	97.91 A	93.75 AB	81.66 ABCD
<i>B. subtilis</i> (Kodiak <sup>MR</sup> )	87.41 ABC	92.5 ABC	95 ABC	97.5 A
<i>Bacillus</i> sp	90.16 ABC	100 A	82.83 ABCD	73.16 BCDE
<i>T. harzianum</i> (esporas) IMI206040	59.46 DE	98.75 A	95.12 AB	52.83 E
<i>T. harzianum</i> (micelio) IMI206040	17.9 F	95.83 AB	94 AB	86.16 ABC
Testigo	87.25 ABC	92.5 ABC	95 AB	68.75 CDE

Las letras significan igualdad estadística al contrastar medias por Tukey = 5.19  $\alpha$  = 0.05  
C.V. = 22.12

#### 4.6 Experimento 6.- Demostración de la asociación micro simbiote - papa.

##### a) Selección de antagonistas endofíticos contra *Fusarium spp* y *R. solani*.

Los mejores antagonistas hacia *Fusarium spp* y *R. solani* fueron aislados del interior de papa y jitomate silvestre las fotografías 1 y 2 nos muestran la confrontación *in vitro* del *Bacillus* cepa Dt con *F. solani* y *R. solani* AG-3 respectivamente.



**Fotografía 1-Confrontación *in vitro* de *Bacillus* cepa Dt con *F.solani*. Halos de inhibición de *F. solani* al rededor de bacterias endofíticas.**



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Fotografía 2.** Confrontación *in vitro* de *Bacillus cepa Dt* con *R. solani* AG-3. Halos de inhibición de *F. solani* al rededor de bacterias endofíticas.

Mediante el uso de la prueba de Romeiro modificada, se seleccionaron a aquellas bacterias antagonicas y promotoras del desarrollo vegetal que demostraron la capacidad de desarrollarse en la periferia de la raíz de las plántulas de papa (*Solanum tuberosum* var. Alfa, cultivadas *in vitro*). Es decir tenían la capacidad de asociarse con la planta, los mejores resultados se obtuvieron en el medio base Murashige Skoog adicionado de 30 g de azúcar y tiamina  $0.004 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . **Fotografía 3.**



**Fotografía 3.** Prueba de Romeiro modificada.- En la fotografía se puede apreciar a las rizobacterias desarrolladas en la periferia de la raíz de papa cultivada *in vitro*.

La modificación desarrollada demostró que las bacterias antagonicas y el pseudomonadal denominado como Sacc, se asocian a la raiz de la papa de la variedad Alfa.

#### 4.7 Experimento 7- Bacterización endofítica *in vitro* de *S. tuberosum*.

Las bacterias antagonistas del género *Bacillus* cepa DT del introducidas *in vitro* a plántulas de la variedad Alfa de papa mejoraron el vigor de su huésped e incorporaron más calcio en sus el **Fotografía 4**.



**Fotografía 4.** – Efecto de las bacterias endofíticas *Bacillus* Dt inoculadas a plántulas de papa, se contrasta su desarrollo contra plantas control inoculadas con infusión papa dextrosa.

**Tabla 11.-** Contratación de medias según Tukey del el peso de la biomasa de plántulas de papa bacterizadas y el tratamiento control.

Tratamiento	Media en g
Dt	8.88 A
Sacc	8.27 B
AG-3	7.95 B C
3D'	7.78 C
Control	5.92 D

Tukey = 0.462 C. V. = 4.63  $\alpha$  = 0.05

**Tabla 12.-** Contrastación de medias según Tukey, del calcio tisular contenido en las raíces bacterizadas endofíticamente con diferentes cepas.

Tratamiento	Media ppm
Dt	2295.25 A
5acc	2082.75 AB
AG-3	1983.50 BC
3D'	1765.75 CD
Control	1681.25 D

Tukey = 239.51 C. V. = 5.41  $\alpha=0.05$

A partir de todos los tratamientos se logró aislar a las cepas inoculadas.



## V.- DISCUSIÓN.

Comúnmente cuando se realizan ensayos con el objetivo de controlar microorganismos del suelo mediante la aplicación de sales de calcio, al ser publicados, se reporta el uso del material "lime", término que incluye a compuestos tales como: carbonato de calcio, hidróxido de calcio, óxido de calcio, a mezclas de ellos en distintas proporciones e incluso a la dolomita. En este trabajo para abatir a las poblaciones microbianas del suelo *in vitro* e *in situ*, se decidió emplear cal de construcción, la que por norma oficial en nuestro país, contiene un mínimo de 80 % de hidróxido de calcio y el resto se complementa con carbonato de calcio e impurezas, este compuesto al estar en suspensión saturada, eleva el pH del agua a valores cercanos a 12. Con base en lo anterior, la cal ha sido utilizada para combatir bacterias del tracto digestivo humano (229). En nuestro trabajo se evaluó *in vitro* el efecto de la cal hidratada en solución acuosa, sobre bacterias Gram negativas del suelo en el experimento 1, se observó que excepto algunas pseudomonadales, géneros como *Agrobacterium* y *Nitrobacter* son más resistentes que aquellas que habitan el tracto digestivo del hombre. Sin embargo las bacterias Gram negativas, siguen siendo la población más sensible al efecto alcalino dentro de este sustrato lo que en un inicio nos indujo a pensar en poder introducir *Pseudomonas* con características de antagonicidad hacia *Fusarium* y *R. solani* (135,136, 151-172).

Para los mecanismos de acción con que limitan a las enfermedades los materiales calcáreos, se ha propuestos lo siguiente: 1) es el resultado de la corrección de deficiencias de calcio, como en el caso de la marchites del tomate ocasionada por *F. oxysporum* la que se incrementa por deficiencias del elemento en la planta (243,244), 2) Corden (243) también sugiere que el calcio tiene la capacidad de inhibir la actividad de la poligalacturonidasa producida por *Fusarium*, 3) Jones y Woltz (244) concluyen después de varios

experimentos en campo e invernadero que lo importante es el cambio del valor del pH del suelo y no el incremento de calcio en los tejidos del huésped en la prevención de la marchitez por *Fusarium*, ya que de esta manera se limita la disponibilidad de nutrientes esenciales para el crecimiento esporulación y virulencia de los *Fusaria*, en especial el fósforo, 4) Waksman (245) señaló como otro mecanismo probable, que el incremento del pH favoreciera el desarrollo de bacterias entre ellas los actinomicetales, los que a través de la liberación de metabolitos inhibieran la germinación de las esporas y el crecimiento vegetativo de fitopatógenos, 5) Otros autores (246) señalan que es posible incrementar la resistencia al ataque de patógenos dosificando la aplicación de carbonatos de calcio y la nitrificación al suelo con nitrógeno nítrico, no obstante este procedimiento con *Sclerotium rolfsi* ha sido inconsistente (247).

En contraste en el combate dirigido hacia *R. solani*, la incorporación de sales de calcio al suelo escasamente se menciona, un reporte en el que se emplean es el de Bateman y Lumsden (248), el que se realizó usando como modelo biológico al frijol y en el se concluye que la resistencia del vegetal al ataque del patógeno, está relacionada con la edad de los tejidos y el contenido de calcio dentro de los epicotilos.

Bajo este contexto, en el experimento 2 se observó un incremento del contenido de calcio tisular en las raíces de papa, en los tratamientos de encalado al suelo, aquí es importante recordar que el calcio se transloca dentro de la planta, a través del movimiento del agua en una sola dirección hacia el follaje, esto por efecto de la transpiración. En la raíz donde la transpiración es mínima, la demanda de calcio debe ser cubierta por difusión de este elemento a través de las raíces secundarias para concentrarse en los tejidos corticales (249,250). El incremento obtenido en este trabajo fue del orden de las decenas o centenas de miligramos por kilo de tejido radical y esto pudo representar un aumento en la

concentración de pectatos cálcicos, los que son en parte responsables de la resistencia a la invasión de *R. solani* en otros cultivos (248).

En el mismo experimento, se atribuye el incremento del contenido de nitratos en la savia peciolar de todos los estadios fenológicos evaluados, al efecto neutralizante de la cal en el suelo, liberando a elementos adsorbidos, principalmente fósforo, a minerales amorfos cuando se encuentran a un pH ácido (251).

Por otra parte, en la actualidad por los incrementos en la temperatura ambiental, y en las enfermedades del cultivo, ha orillado a los productores de papa a sembrar en zonas de mayor altitud y éstas en el centro y occidente del país, como es el caso, regularmente se ubican en las laderas de los cerros, lo que implica en muchos casos trabajar con suelos ácidos, ya sea por ser suelos de "ando", derivados de cenizas volcánicas cuyos materiales parentales son ácidos (252) y bajos en cationes básicos  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$ ,  $\text{Na}^{+}$  o por que sus elementos han sido removidos del perfil del suelo por lixiviación o la absorción de las plantas cultivadas, esto se intensifica por el uso de fertilizantes nitrogenados de acidez residual (253) y por la depositación de los ácidos suspendidos en la atmósfera contaminada (254).

Por lo tanto, el hecho de aplicar cal como fuente de calcio para incrementar los niveles de calcio en los tejidos radicales y así su tolerancia a la invasión de *R. solani*, funcionaría también como neutralizante de la acidez que limita la productividad de los cultivos.

Ahora bien, la cantidad de cal tiene que ser dosificada para cada terreno, ya que el contenido de calcio en los suelos suele ser muy heterogéneo y este elemento compite en disponibilidad para la planta con otros elementos. En este sentido en la **tabla 4** se manifestó en la disminución del contenido de potasio en la savia de los peciolas, con las dosis

mayores a un Mg. Así mismo desde el punto de vista fisiológico el suministro calcio debe ser continuo, ya que la distribución del calcio dentro de los vegetales no es homogénea y existen reportes en los que se señala a su deficiente distribución en los tejidos es la responsable de al menos 30 alteraciones fisiológicas (255,256), esta distribución heterogénea se constata en lo frecuente que es encontrar en diversas especies y entre ellas la papa altas concentraciones de calcio en el follaje y escasez en los órganos de almacenaje y tejidos jóvenes de la misma planta (257,258), lo que puede repercutir en la tolerancia a las enfermedades.

Habitualmente cuando se encalan los suelos de cultivo con 0.5 a 1 Mg por hectárea cal agrícola (la que por norma oficial contiene hasta un 24% de hidróxido de calcio, el resto la conforman el carbonato de calcio e impurezas entre las que predomina el sílice), se deja que el CO<sub>2</sub> atmosférico neutralice a los oxidrilos del compuesto, por al menos durante el mes previo a la siembra. Al incrementar la concentración de hidróxido de calcio, el tiempo de neutralización se prolonga y muchas de las veces esto no resulta práctico para el agricultor. El compuesto que se emplea para bajar el pH de los suelos alcalinos es el ácido sulfúrico, y en este caso se empleó para neutralizar y llevar al suelo a un pH propicio para el desarrollo del cultivo, reduciendo así los tiempos de espera.

En este sentido en el experimento 3, cuando se aplicó cal de construcción a un cultivo, observamos un efecto supresor en toda la población bacteriana cultivable, no mayor a un logaritmo y esto después de 40 días de la aplicación (**Figura 4**), el ácido sulfúrico, tiene un efecto supresor de más de dos logaritmos en las poblaciones bacteriana y fúngica cuando se le aplica al suelo, en este caso se empleó el volumen requerido para neutralizar 18 Mg·ha<sup>-1</sup> de cal de construcción (**Figuras 6 y 7**), que es similar a la empleada por Fletcher (259), para controlar a *Plasmodiophora brassicae* en crucíferas.

Cuando se evaluó la prevalencia del efecto supresor del tratamiento ácido - alcalino, específicamente sobre las poblaciones de *F. oxysporum* y *R. solani* AG-3 del suelo (Experimento 4), con volúmenes de cal similares a las aplicadas por Anderson (260), apreciamos que estos géneros se abaten con el tratamiento y que este efecto es directamente proporcional a los volúmenes de los compuestos aplicados, neutralizar 4 a 6 Mg·ha<sup>-1</sup> de cal con ácido sulfúrico, abate a la población dentro del suelo a 10 y 20 cm de ambos fitopatógenos por aproximadamente 20 días, cabe hacer mención que el efecto es estresante sobre los propágulos en el suelo y que después de un tiempo en las poblaciones igualan en número a los testigo, sin embargo dicho efecto puede prolongarse si se repite el tratamiento. Un aspecto importante es el hecho de que aun siendo el ácido sulfúrico concentrado el compuesto empleado para digerir a la materia orgánica en el laboratorio, en este caso de acuerdo a la metodología utilizada, al cuantificar el efecto de los tratamientos ácido-alcalinos sobre la materia orgánica del suelo, no se detectaron cambios en su porcentaje, neutralizando volúmenes hasta de 8 Mg·ha<sup>-1</sup>.

Otra alternativa conocida para reducir a propágulos de hongos fitopatógenos del suelo es la aplicación del tratamiento hidrotérmico (7), aquí se decidió conjuntar a este, el efecto del encalamiento y neutralización.

En el experimento 5, se apreció que las técnicas de solarización, encalado-solarización, alcanzando temperaturas máximas por arriba de los 40°C durante el mes de Julio y la de encalado, tuvieron efecto bacteriostático al inicio de su aplicación, para después de aproximadamente un mes, incrementar a la población bacteriana por encima de los valores del tratamiento testigo, esto reporta la técnica de solarización (7), es por el incremento las de bacterias termo resistentes.

Así mismo, la adición al suelo de microorganismos antagonísticos o a la semilla, ha sido otra estrategia aplicada para el control de enfermedades. Las bacterias que realizan dicho control están clasificadas como bacterias promotoras del crecimiento (PGPR) y aunque el conocimiento de los mecanismos por los que se realiza dicha promoción están inconclusos, se han reconocido a los siguientes: 1) capacidad de producir o cambiar la concentración de sustancias reguladoras del crecimiento, como el ácido indol acético, el ácido giberélico, las citocininas y el etileno 2) la fijación de nitrógeno simbiótico 3) la producción de compuestos que antagonizan patógenos, como sideróforos,  $\beta$  1-3 glucanasas, quitinasas y cianuro y 4) solubilización de fosfatos minerales y nutrimentos (261).

Los microorganismos inoculados como antagonistas en nuestro trabajo, protegieron significativamente contra *R. solani* dentro de ellos resalta *B. subtilis* el cual incrementó su efecto antagonístico con los tratamientos de encalado y encalado solarización así como también la solarización incrementó de manera estadísticamente significativa la protección conferida tanto por *Bacillus sp.*, la de *B. subtilis* AG-3 y *T. harzianum* IMI206040 en su forma esporulada, en los tratamientos en donde se empleo cal se favoreció el desempeño de los antagonistas bacterianos, *Bacillus sp.*, la de *B. subtilis* AG-3 no así el de *T. harzianum* que en sus dos formas, incremento la incidencia de *R. solani* en su huésped, lo que pudiera atribuirse a cambios metabólicos en el patógeno, que promovieron la liberación de sustancias volátiles y estas lesionaron las capas corticales de la raíz, propiciando así la invasión de *R. solani*, como se ha demostrado con algunas cepas de este patógeno en condiciones experimentales (262).

*T. harzianum*, parece no establecerse eficientemente en suelo encalado, posiblemente por el efecto del incremento del pH en el suelo, lo cual puede afectar el desarrollo del hongo, debido a que se ha determinado que el pH bajo mejora la propagación de varias especies de

*Trichoderma* (263). Lo anterior, también coincide con lo informado por Chet y Baker (264) quienes mencionan que, en un suelo de Colombia con pH de 5,1 encontraron una densidad de propágulos de *Trichoderma* de  $8 \times 10^5 \cdot g^{-1}$  de suelo, mientras que en Fort Collins EE.UU., en un suelo con pH de 8,1 la densidad fue de  $10^2 \cdot g^{-1}$  de suelo. El género *Bacillus* muestra mayor capacidad de adaptación a valores altos de pH, dado que puede crecer hasta pH de 8,5 y mantenerse latente en forma de esporas en valores mayores (265). *T. harzianum* mostró un excelente efecto cuando se inoculó en suelo solarizado, quizá debido a la reducción de microorganismos nativos y a una mayor oportunidad de colonizar rápidamente el suelo para ejercer un buen efecto de control. *B. subtilis* (Kodiak<sup>MR</sup>) mostró un efecto aceptable en la protección contra *R. solani* (97,5%), sin embargo, factores como la cal y la solarización afectaron en cierta medida su potencial de control. En condiciones de campo, esta cepa ha mostrado un efecto catalogado como intermedio, en el control sobre *R. solani*, en relación a otras alternativas (266).

Mientras que la cepa *B. subtilis* AG-3 parece presentar una gran adaptación a los tratamientos aplicados, los que le favorecen considerablemente en el control sobre *R. solani*; estos resultados sugieren que existe una reducción de microorganismos nativos por efecto del encalado- neutralizado y la solarización, concordando esto último con Katan (7). En esta investigación, permitió el rápido establecimiento de la cepa (*B. subtilis* AG-3), la cual puede considerarse como una buena alternativa de control de *R. solani* y con posibilidades de usarse en condiciones de campo.

Los tratamientos aplicados al suelo además permitir la introducción de microorganismos antagónicos a patógenos del suelo, suprimen a patógenos menores y son tan eficientes como controlando a los patógenos señalados como emplear microorganismos antagónicos.

Por otra parte, *Bacillus* sp. Muestra un porcentaje considerable de control en los diferentes suelos, excepto en el suelo testigo, siendo estadísticamente diferente a *B. subtilis* (Kodiak<sup>MR</sup>) y a *B. subtilis* AG-3.

El efecto antagónico sobre los hongos patógenos de la raíz será más eficiente si se colonizan estas como lo indica Kloepper (167).

En este sentido en el experimento 6, la búsqueda de simbioses bacterianas se realizó, tanto en la rizósfera de papas susceptibles (variedad Alfa), como en el interior de especies resistentes, para la selección de estas últimas se contó con un trabajo previo (239), las cepas bacterianas aisladas correspondientes al género *Bacillus*, fueron confrontadas *in vitro* contra *F. solani* y *R. solani* AG-3. Algunas de estas bacterias fueron sometidas a la prueba diseñada para demostrar de la asociación papa-micro simbiote, en ella inicialmente quisimos limitar la fuente de carbono, reduciendo la concentración de azúcar comercial administrada, sin embargo la especificidad bacteria planta es tan alta, que aún en un medio tan enriquecido como el Murashige Skoog, es posible apreciar el desarrollo bacteriano en la periferia de la raíz de la plántula, con la concentración de azúcar óptima para el desarrollo del vegetal. Mediante esta técnica se apreció la asociación planta simbiote, con bacterias que presentaban características de antagonismo a fitopatógenos, otras que promovían el desarrollo vegetal, por emplear el ácido 1 amino ciclo propano 1 carboxílico, como fuente de nitrógeno, y por lo tanto reducen la concentración de este compuesto, (que es el precursor del etileno, gas que funciona como hormona de envejecimiento), que bajo el suelo limita el desarrollo de la raíz (267), es importante recordar que esta especificidad bacteria planta esta determinada a nivel de cepa (268).

Las bacterias que manifestaron mayor afinidad al vegetal y antagonismo *in vitro* hacia *F. solani* y *R. solani* AG-3, fueron aisladas del interior de plantas silvestres: jitomate *L.*



*esculentum* var. *Ceraciforme* y papa *Solanum spp.* (**Fotografías 1 y 2**) lo cual concuerda con Insunza (269), quien obtuvo antagonistas hacia trichodoridos parásitos de papa a partir de plantas resistentes. La técnica descrita para demostrar la asociación planta microsimbionte, también permite inocular endofíticamente a *S. tuberosum* con estas bacterias, lo que se demostró al reaislarlas del interior de los tejidos además se constató su efecto como promotoras del desarrollo vegetal. De entre los microorganismos biocontroladores de *F. solani* y *R. solani* AG-3, destaca el *Bacillus* denominado Dt el que promovió el mejor y mayor desarrollo de la papa y un desarrollo más rápido promueve la entrada de iones a la raíz, por que esta es una actividad de las fitohormonas, en especial la del ácido abscísico (ABA) y las citocininas. Ya que el ABA favorece el paso de agua a la raíz y las citocininas lo reducen (270). Los resultados obtenidos registraron una diferencia estadística significativa en la producción de biomasa, lo cual implica una precocidad en maduración de los tejidos, y esto se corroboró por el incremento del calcio radicular, siendo esto un criterio de resistencia vegetal a *R. solani* (257), la cepa Dt coloniza internamente a la región basal del tallo de la papa, esta cepa obtenida de *L. esculentum* var. *Ceraciforme*, es un relicto de la agricultura mesoamericana y ha demostrado *in vitro* inhibir el desarrollo micelial de *Rhizoctonia solani* AG-3, *Fusarium spp* y *Alternaria porri*.

Recapitulando lo anterior podemos concluir que aún siendo las bacterias Gram negativas del suelo, sensibles al efecto del hidróxido de calcio en solución acuosa *in vitro* en un tiempo de una a dos horas, dentro del suelo este efecto se reduce, lo que para poder abatir a su población implica incrementar los volúmenes del material alcalinizante más allá de las dosis requeridas por el cultivo de papa para su desarrollo, ya que para el cultivo de papa de la variedad Alfa la aplicación  $1 \text{ Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$  de cal agrícola en los suelos con pH 4.5-5.5, es el adecuado, por que además de promover un mejor estado fisiológico de la planta,

incrementa los niveles de calcio en los tejidos del estolón y el tubérculo. Cuando incrementamos las cantidades de hidróxido de calcio o ácido sulfúrico para abatir a las poblaciones de bacterias y hongos del suelo, afectamos la disponibilidad de nutrientes por periodos que en términos agrícolas pueden resultar prolongados. Para resolver ese inconvenientes, se propone aplicar a ambos compuestos de manera que se neutralicen estequiométricamente en los tiempos y de la forma más práctica para realizar las labores agrícolas, es decir la cal al preparar el suelo antes de sembrar y el ácido con el primer riego, de esta manera también se obtienen los beneficios de poder ser aplicada a suelos ácidos o alcalinos, ajustar el pH de este al óptimo requerido por el cultivo y reducir el tiempo de neutralización del suelo, de aproximadamente un mes a 2 ó 3 días, siendo este tratamiento el que estadísticamente redujo más a la comunidad bacteriana. La adición de sales de calcio en dosis de mayores a las requeridas, implica corregir las deficiencias nutrimentales del vegetal mediante fertilización foliar.

Cuando se con juntaron metodologías, se concluyó que los tratamientos al suelo de solarización y encalado-acidificación, aplicados independientemente o combinados, son tan eficientes como el aplicar microorganismos biocontroladores *Rhizoctonia solani* AG-3, *Fusarium spp.* También se observó que el encalado tuvo un efecto detrimente en el género *Trichoderma*, por lo tanto para poder aplicar microorganismos en suelos tratados se deberá considerar la compatibilidad entre ellos.

En lo que se refiere a la búsqueda de antagonistas contra *Rhizoctonia solani* AG-3 y *Fusarium spp.*, las mejores fuentes resultaron ser las variedades silvestres de jitomate *L. esculentum* Mill. var. *Ceraciforme* y de papa *Solanum spp.*, a partir de ellas se aislaron bacterias antagonistas que fueron compatibles con la variedad Alfa de *Solanum tuberosum*, que es con la que se cubre la mayor parte de la demanda nacional, esta compatibilidad fue

demostrada por la prueba de Romeiro modificada y desarrollada en este trabajo. La que también permite la introducción de los simbiontes al interior de la papa.

Así el *Bacillus Dt* aislado del jitomate silvestre, es un buen inductor del desarrollo vegetal lo cual se demostró, tanto en la biomasa producida, como en las concentraciones de calcio acumulado a nivel radicular, por las plantas bacterizadas endofíticamente con ella. El siguiente paso será sembrar semillas bacterizadas externa e internamente en suelos tratados.

## VI.- CONCLUSIONES.

- Las Bacterias del suelo, entre ellas las Gram negativas excepto algunas pseudomonadales, fueron más resistentes al efecto de la cal que las enterobacterias.
- El encalado al suelo afectó al cultivo de papa nutricionalmente en forma indirecta al corregir el pH del suelo y liberar elementos adsorbidos a las arcillas y directamente puede fungir como fuente de calcio para los estolones y bulbos.
- Para inhibir a las poblaciones fúngicas y bacterianas y del suelo mediante la neutralización de la cal con ácido sulfúrico, se requiere más de 2 Mg·ha<sup>-1</sup>.
- Las técnicas de solarización, el encalado y el encalado-acidificación, redujeron la incidencia de *Rhizoctonia solani* AG-3, en plántulas de papa durante la primer etapa del cultivo.
- El efecto del encalado-acidificación, la solarización y la conjunción de ambos tratamientos son tan eficiente en el abatimiento de *Rhizoctonia solani* como adicionar *B. subtilis* AG-3 y *B. subtilis* (Kodiak<sup>MR</sup>) a la semilla de papa.
- La solarización sirve como tratamiento para la introducción de biocontroladores de los géneros *Bacillus* y *Trichoderma*. En las técnicas de encalado solo las bacterias del género *Bacillus*, incrementaron el control del patógeno.
- La selección de bacterias antagónicas a *Fusarium spp* y *Rhizoctonia solani* se puede realizar tanto de la rizósfera, como de los tejidos internos de vegetales que sean sensibles o resistentes a los fitopatógenos.
- La técnica de Romeiro modificada sirve para demostrar *in vitro* la asociación papa-bacteria, así como para introducir a las bacterias endofíticas a esta planta.

## VII.- BIBLIOGRAFÍA.

- 1.- El encalado de los suelos. Centro Regional de Ayuda Técnica. Agencia para el desarrollo Internacional. Libros de México. 35 pp. 1966.
- 2.- Horsfall, J.G. y E.B. Cowling (eds). Plant diseases. An advanced Treatise. Vol I: How disease is managed. Academic Press, New York. 465 pp. 1985
- 3.- Whitten, J.L., That We May Live, Van Nostrand, Princeton, E.U.A.,. 26 p. 1966
- 4.- Mc Callan, S.E.A. 'History of fungicides' en fungicides, an advanced Treatise (ed. Torgeson, D.C.), Academic Press, Nueva York. 1p. 1967.
- 5.- De Ong, E.R. Chemistry and Uses of Pesticides, 2ª ed., Reinhold Publ. Corp., Nueva York., 1956.
- 6.- Cremlyn, R. Plaguicidas Modernos y su Acción Bioquímica. 1ª ed. Edit. Limusa. Mex. 1986
- 7.- Katan, J., A. Grenberger, Alon y A. Grinstein. 1976. Solar heating by polyethylene mulching for control of diseases caused by soil borne pathogens. *Phytopathology* 66:683-688.
- 8.- Baker, R. 1990. An overview of current and future strategies and models for biological control. pp 375-388 en *Biological Control of Soilborne Plant Pathogens*. D. Hornby, ed. CAB International, Wallingford, Reino Unido.
- 9.- De Vay, E.J., J.J. Stapleton, y C.L. Elmore (eds). 1991. Soil solarization. FAO. Roma.
- 10.- Balderdi, C.F. 1976. Plastic and hay mulches for tropical fruit crops: observations and economics. *Poc. Florida State Hort. Soc.* 89:234-236.
- 11.- Burrows, W.C. y W. E. Larson. 1962. Effect of amount of mulch on soil temperature and early growth of corn. *Agron. J.* 54:19-23.
- 12.- Counter, J.W. y N.F. Oebker. 1964. Comparisons of paper and polyethylene mulching on yields of certain vegetable crops. *Proc. Amer. Soc. for Hort. Sci.* 85:526-531.
- 13.- Flint, L.H. 1928. Crop-plant stimulation with paper mulch. *US Dept. Agr. Tech. Bull.* 75.
- 14.- Jacks, G.V., W.D. Brind y R. Smith. 1955. Mulching. *Tech. Comm. 49 of the Commonwealth Bur. Soil. Sci. Commonwealth Agric. Bureaux, England.*
- 15.- Lippert, L.F., F.H. Takatori y F.L. Whiting. 1964. Soil moisture under bands of petroleum and polyethylene mulches. *J. Appl. Meteorol.* 18:1263-1267.
- 16.- Reynolds, S.G. 1970. The effect of mulches on southern blight (*Sclerotium rolfsii*) in dwarf bean (*Phaseolus vulgaris*). *Trop. Agric.* 47: 137-144.
- 17.- Unger, P. W. 1978. Straw mulch effects on soil temperatures and sorghum germination and growth. *Agron. J.* 70:858-864.
- 18.- Waggoner, P. E., P. M. Miller y H. C. de Roo. 1960. Plastic mulching: principles and benefits. *Conn. Agric. Expt. Station Bull.* 634.
- 19.- De Bach, P. *Biological Control of Insect Pest and Weeds*. New York: Reinhold, , 844 pp. 1964.
- 20.- Hartly, C. 1989: Damping-off in forest nurseries. *US Dept Agric Bull* 934: 1-99.

- 21.- Huber, D.M. 1978. Disturbed mineral nutrition. 163-168 pp. En *Plant Pathology an advanced Treatise*, Vol.3. J.G. Horsfall y E.B. Cowling, eds Academic press NY. . J.G. Horsfall y E.B. Cowling, eds Academic press NY.
- 22.- Huber, D.M. 1980. The role of nutrition in defense, 381-406 pp. En *Plant Pathology an advanced Treatise*, Vol.5
- 23.- Huber, D.M. y Watson R.D. 1970. Effect of organic amendment on soil borne pathogens. *Phytopathology* 60:22-26
- 24.- Huber, D.M. y Watson R.D. 1974. Nitrogen form and plant disease. *Annul. Rev. Phytopathol.* 12:139-165
- 25.- Huber, D.M. Introduction. 1-8 pp. 1990. En *Soilborne plant pathogens: Management of diseases with macro- and microelements*. A.W.Engelhard, ed. APS. Press.Minn.
- 26.- McNew, G.L. The effect of soil fertility. 100-114pp. En: *Plant Diseases, The Yearbook of Agriculture*, U.S. Dept. Agr., Washington, D.C. 1953.
- 27.- Office of Technology Assessment. *Pest Management Strategies in Crop Protection. Vol I, II.* Congress of the United States Washington, D.C. 1979.
- 28.- Engelhard, A.W. y Woltz, S.S. 1972. Complete control of *Fusarium* wilt of chrysanthemum with chemotherapeutants combined with a high lime and nitrate-nitrogen culture regime. *Phytopathology* 62:756.
- 29.- Engelhard, A.W. y Woltz, S.S. 1973. *Fusarium* wilt of chrysanthemum: Complete control of symptoms with an integrated fungicide-lime-nitrogen regime. *Phytopathology* 63:1256-1259.
- 30.- Engelhard, A.W. y Woltz, S.S. 1978. Effect of temperatura, nitrogen source, lime and benomyl treatments on *Fusarium* wilt of chrysanthemum, aster, and giadiolus. *Third Int. Congr. of Plant Pathology* p. 375 (Abstr.).
- 31.- Woltz, S.S. y Engelhard, A.W. 1973. *Fusarium* wilt of chrysanthemum: Effect of nitrogen source and lime on disease development. *Phytopathology* 63:155-157.
- 32.- Droby, S. et al. 1996. Influence of  $CaCl_2$  on *Penicillium digitatum*, grapefruit peel tissue, and biocontrol activity of *Pichia guilliermondii*. *Phytopathology* 87:310-315
- 33.- Jones P.J., Engelhard, A.W. y Woltz, S.S. Management of *Fusarium* wilt of vegetables and ornamentals by macro- and microelement nutrition. 18-32 pp. En: *Soilborne plant pathogens: Management of diseases with macro- and microelements*. 1990. A.W.Engelhard, ed. APS. Press.Minn.
- 34.- Engelhard, W.A. Historical Highlights and Prospects for the Future. 9-17 pp. En: *Soilborne plant pathogens: Management of diseases with macro- and microelements*. 1990. A.W.Engelhard, ed. APS. Press.Minn.
- 35.- Volpin, H. y Elad, Y. 1991. Influence of calcium nutrition on susceptibility of rose flowers to botrytis blight. *Phytopathology* 81:1390-1394.
- 36.- Woltz, S.S., Jones, J.P. y Scott, J.W. 1992. Sodium chloride, Nitrogen Source, and Lime Influence *Fusarium* Crow Rot Severity in Tomato. *Hort Science* 27(10):1087-1088.
- 37.- Walker, J.C. 1971. *Fusarium* wilt of tomato. *The Am. Phytopathol. Soc. Monograph No. 6.* Am. Phytopathol. Soc., St. Paul, MN.

- 38.- Norton, J.B.S. 1912. Differences in varieties of fruit and truck crops in reference to disease. Rep. Md. State Hort. Soc. 15:62-67.
- 39.- Norton, J.B.S. 1914. Tomato diseases. Md. Agric. Exp. Stn. Bull. 180:102-114.
- 40.- Essary, S.H. 1912. Notes on tomato diseases with results of selection for resistance. Tenn. Agric. Exp. Stn. Bull. 95.
- 41.- Essary, S.H. 1920. Report of the botanist. Tenn. Agric. Exp. Stn. Annu. Rep. 1919-20:15-16.
- 42.- Wolienweber, H.W. 1913. Studies on the Fusarium problem. Phytopathology 3:24-50.
- 43.- Sherbakoff, C.D. 1915. Fusaria of potatoes. Cornell Univ. Agric. Exp. Stn. Memoir 6.
- 44.- Edgerton, C.W. y Moreland, C.C. 1913. Diseases of the tomato in Louisiana. La. Agric. Exp. Stn. Bull. 142.
- 45.- Edgerton, C.W. y Moreland, C.C. 1920. Tomato wilt. La. Agric. Exp. Stn. Bull. 174
- 46.- Sherwood, E.C. 1923. Hydrogen-ion concentration as related to the Fusarium wilt of tomato seedlings. Am. J. Bot. 10:537-553
- 47.- Scott, I.T. 1924. The influence of hydrogen ion concentration on the growth of *Fusarium lycopersici* and on tomato wilt. Mo. Agric. Exp. Stn. Res. Bull. 64. 32 pp.
- 48.- Fisher, P.L. 1935. Physiological studies on the pathogenicity of *Fusarium lycopersici* Sacc. for the tomato plant. Md. Agric. Exp. Stn. Bull. 374.
- 49.- Fisher, P.L. 1935. Responses of tomato in solution cultures with deficiency and excesses of certain essential elements. Md. Agric. Exp. Stn. Bull. 375.
- 50.- Jones, J.P. y Woltz, S.S. 1967. Fusarium wilt (race 2) of tomato: effect of lime and micronutrient soil amendments on disease development. Plant Dis. Rep. 51:645-648.
- 51.- Jones, J.P. y Woltz, S.S. 1972. Effect of soil pH and micronutrient amendments on Verticillium and Fusarium wilt of tomato. Plant Dis. Rep. 56:151-153.
- 52.- Jones, J.P. y Woltz, S.S. Fusarium-incited diseases of tomato and potato and their control. Pages 157-168 in. *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*. P. E. Nelson, T. A. Toussoun and R. J. Cook, eds. Penn. State Univ. Press, University Park. 1981.
- 53.- Jones, J.P. y Woltz, S.S. 1983. Cultural control of Fusarium wilt race 3 of tomato. Proc. Fla. State Hort. Soc. 96:82-83.
- 54.- Woltz, S.S. y Jones, J.P. 1973. Tomato Fusarium wilt control by adjustments in soil fertility: A systematic approach to pathogen starvation. Agric. Res. Ed. Center Bradenton Res. Rept. GC1973-7
- 55.- Woltz, S.S. y Jones, J.P. 1984. Effects of aluminum, lime, and phosphate combinations on Fusarium wilt (race 3) of tomato. Phytopathology 74.-629 (Abstr.).
- 56.- Sarhan, A.R.T. y Kiraly, Z. 1981. Control of Fusarium wilt of tomato with an integrated nitrate-lime-fungicide regime. Acta Phytopathol. Acad. Sient. Hung. 16:9-14.
- 57.- Engelbard, A.W. 1979. Control of Fusarium wilt of carnation with an integrated (NO<sub>3</sub>-)N and systemic fungicide control program. Phytopathology 69:1027 (Abstr.).

- 58.- Jones, J.P. y Woltz, S.S. 1975. Effect of liming and nitrogen source on Fusarium wilt of cucumber and watermelon. Proc. Fla. State Hort. Soc. 88:200-203.
- 59.- Keane, E.M. y Sackston, W.E. 1970. Effects of boron and calcium nutrition of flax on Fusarium wilt. Can. J. Plant Sci. 50:415-422.
- 60.- Woltz, S.S. y Magie, R.O. 1975. Gladiolus Fusarium disease reduction by soil fertility adjustments. Proc. Fla. State Hort. Soc. 88:559- 562.
- 61.- Engelhard, A.W. 1975. Aster Fusarium wilt: Complete symptom control with an integrated fungicide-NO<sub>3</sub>-pH control system. Proc. Am. Phytopathol. Soc. 2:62 (Resumen.).
- 62.- Jones, J.P. y Woltz, S.S. 1975. Effect of liming and nitrogen source on Fusarium wilt of cucumber and watermelon. Proc. Fla. State Hort. Soc. 88:200-203.
- 63.- Sun, S.K. y Huang, J.W. 1985. Formulated soil amendmnt for controlling Fusarium wilt and other soilborne diseases. Plant. Dis. 69:917-920.
- 64.- Huber, D.M. 1981. The use of fertilizers and organic amendements in the control of plant diseases 357-394 pp. En: Handbook of pest management in agriculture. Vol.I. D. Pimentel, Ed. CRC. Press. Inc. Fla.
- 65.- Weintraub, M. y Ragetti, H.W.J. 1961. Cell wall composition in leaves With a localized virus infection. Phytopathology 51:215-219.
- 66.- Conway, W.S., Gross, K.C. y Sams, C.E. Relationship of bound calcium and inoculum concentration to the effect of postharvest calcium treatment on decay of apples by *Penicillium expansum*. Plant. Dis. 71:78-80
- 67.- Conway, W.S., Gross, K.C., Boyer C.D. y Sams, C.E. 1988. Inhibition of *Penicillium expansum* polygalacturonase activity by increased apple cell wall Ca. Phytopathology 78:1052-1055.
- 68.- Csinos, A.S., y Gains, T.P. 1986. Peanut pod rot complex: a geocarposphere nutrient imbalance Plant. Dis. 70:525-529.
- 69.- Csinos, A.S., y Gains, T.P. y Walker, M.E. 1984. Involvement of nutrition and fungi in tile peanut pod rot complex Plant Dis. 68:61-65.
- 70.- Edgington, L.V., Corden, M.E., y Dimond, A.E. 1961. Thee role of pectic substances in chemically-induced resistance to wilt of tomato. Phytopathology 51:179-182.
- 71.- Hancock, J.G. y Stanghellini, M.E. 1968. Calcium localization in *Hypomyces*-infected squash hypocotyls and effect of Ca on pectate lyase activity and tissue maceration. Can. J. Bot. 46:405-409
- 72.- Myers, D.F. y Campbell, R.N. 1985. Lime and the control of clubroot of crucifers: Effects of pH, Calcium, Magnesium and their interactions. Phytopathology 75:670-673.
- 73.- Conway, S. W., Gross, C. K., Boyer, D.C. y Sams, E.C. 1988. Inhibition of *Penicillium expansum* poligaracturonase activity by increased apple cell wall calcium. Phytopathology 78:1052-1055.
- 74.- Buescher, R. W., Hudson J. M. y Adams, J. R. 1979. Inhibition of poly-galacturonase. softening of cucumber pickles by calcium chloride. J. Food Sci. 44:1786-1787.
- 75.- Konno, H., Yamaya, T., Yamasaki, Y., y Matsumoto, H. 1984. Pectic polysaccharide breakdown of cell walls in cucumber roots grown with Calcium starvation. Plant Physiol. 76:633-637



- 76.- Geraldson, C.M. 1957. Control of blossom-end rot of tomatoes. Proc. Am. Soc. Hon. Sci. 69:309-317.
- 77.- Bangerth, F. 1979. Ca-related physiological disorders of plants. Ann. Rev. Phytopatol. 17:97-122
- 78.- Collier, G.F., Wurr, D.C.E. y Huntington, V.C. 1978. The effect of Calcium nutrition on the incidence of internal rust spot in the potato. J. Agric. Sci. (Cambridge) 91:241-243.
- 79.- Dyson, P.W. y Digby, I. 1975. Effects of calcium on sprout growth and sub-apical necrosis in Majestic potatoes. Potato Res. 18:290-305.
- 80.- Hiller, L.K., Koller, D.C. y Thornton, R.E. 1985. Physiological disorders of potato tubers. Pages 389-455, en: Potato Physiology. P. H. Li, Ed. Academic Press, Inc., N.Y.
- 81.- Tzeng, K.C., Relman, A., Simmons, K.E. y Kelling, K.A. 1986. Relationship of Calcium nutrition to internal brown spot of potato tubers and sub-apical necrosis of sprouts. Am. Potato J. 63:87-97.
- 82.- Tzeng, K.C., Kelman, A., Simmons, K.E. y Kelling, K.A. 1985. Relation of Calcium content in potato tuber periderm to bacterial soft rot susceptibility, internal brown spot and subapical necrosis on sprouts. Phytopathology 75:1379 (Resumen).
- 83.- Power, R.H. 1983. Relationship between the soil environment and tomato resistance to bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum*): 4. Control Method. Surinam Agric. 31:39-47.
- 84.- Fritz, V.A., Honma, S., y Widders, I. 1988. Effects of petiole Calcium status, petiole location, and plant age on the incidence and progression of soft rot in Chinese cabbage. J. Amer. Soc. Hon. Sci. 113:56-61.
- 85.- Park, S.K. 1969. Studies on the relationship between calcium nutrient and soft rot disease in Chinese cabbage. The research report of the Office of Rural Development. Suwon, Korea 12:63-70.
- 86.- Platero, M. y Tijerina, G. 1976. Calcium nutrition in *Phaseolus vulgaris* in relation its resistance to *Erwinia carotovora*. Phytopathol Z. 85:314-319
- 87.- Dun, H.V. y Rost, C.O. 1948. Effect of fertilizer on the composition of potatoes grown in the Red River Valley of Minnesota. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 13:374-379.
- 88.- Bretzloff, C. W. y McMenamin, J. 1971. Some aspects of potato appearance and texture. III. Sampling tubers of cation analysis. Am. Potato J. 48: 97-104.
- 89.- Bangerth, F. 1979. Ca related physiological disorders of plants. Ann. Rev. Phytopathol. 17: 97-122.
- 90.- Cook, R.J. y Baker K.F.. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. St. Paul, MN: The American Phytopathological Society, 1983, 539 pp.
- 91.- Sivian, A. y Chet I.. 1992. Microbial control of plant diseases. Enviro. Microbiol. 335-354
- 92.- Chang, I. y Kommedahl T.. 1968. Biological control of seeding blight of corn by coating kernels with antagonistic microorganisms. Phytopatology 58:1395-1401.
- 93.- Cook, R. J. Twenty-five years of progress towards biological control, p.1-14. In D. Hornby (ed.), biological control of soil-borne plant pathogens. C.A.B. International, Wallingford, United Kingdom. 1990.
- 94.- Cooksey, D. A. y Moore L. W. 1982. Biological control of crown gall with an agrocin mutant of agrobacterium radiobacter. Phytopathology 72: 919-921.

- 95.- De Freitas, J. R. y Germida J. J. 1991. *Pseudomonas cepacia* and *Pseudomonas putida* as winter wheat inoculants for biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Can. J. Microbiol.* 37: 780-784.
- 96.- De la Cruz, A. R., A. R. Poplawsky J. J. y Wiese M. V. 1992. Biological suppression of potato ring rot by fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1985-1991.
- 97.- Geels, F. P. y Schippers B. 1983. Reduction of yield depressions in high frequency potato cropping soil after seed tuber treatments with antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathol. Z.* 108:207-214.
- 98.- Gutterson, N. 1990. Microbial fungicides: recent approaches to elucidating mechanisms. *Crit. Rev. Biotechnol.* 10:69-91.
- 99.- Laville, J., Voisard C., Keel C., Maurhofer M., Defago G. y Hass D. 1992. Global control en *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1562-1566.
- 100.- Lemanceau, P., P. A. H. M. Bakker, W. J. de Kogel, C. Alabouvette, B. Schippers. 1992. Effect of pseudobactin 358 production by *Pseudomonas putida* WC358 on suppression of *Fusarium wilt* of carnations by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2978-2982.
- 101.- Liang, I. N., J. L. Sinclair, L. M. Mallory, y M. Alexander. 1982. Fate in model ecosystems of microbial species of potential use in genetic engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 708-714.
- 102.- Weller, D. M. 1988. Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26: 379-407.
- 103.- Baker, K.F. 1987. Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 25:67-85
- 104.- Cook, R. J. y Baker, K. F. 1983. *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens.* St. Paul: Am. Phytopathol. Soc. 539 pp.
- 105.- Baker, K.F. y Cook, R.J. 1974. *Biological Control of Plant Pathogens.* St. Paul: Am. Phytopathol. Soc. 433 pp
- 106.- Chet, I. *Innovative Approaches to Plant Disease Control.* New York: Wiley. 372 pp. 1987.
- 107.- Papavizas, G C., ed.. *Biological Control In Crop Production.* London: Allanheld Osmun. 461 pp. 1981.
- 108.- Baker, R. 1968. Mechanisms of biological control of soil-borne pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 6:263-94
- 109.- Brown, M. E. 1974. Seed and root bacterization. *Annce. Rev. Phytopathol.* 12:181-97
- 110.- Burr, T. J., y Caesar, A. 1984. Beneficial plant bacteria. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 2:1-20
- 111.- Jatala, P. 1986. Biological control of plant-parasitic nematodes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24:453-89
- 112.- Moore, L. W. 1979. Practical use and succes of *Agrobacterium radiobacter* strain 84 fur crown gall control. *See Ref.* 36, pp. 553-68
- 113.- Papavizas, G. C. y Lumsden, R. D. 1980. Biological control of soilborne fungal propagules. *Annu. Rev. Phytopathol.* 18:389-413

- 114.- Schroth, M. N. y Hancock, J. G. 1981. Selected topics in biological control. *Annu. Rev. Microbiol.* 35:453-76
- 115.- Schroth, M. N. y Hancock, J. G. 1982. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science* 216:137-81
- 116.- Suslow, T. V. 1982. Role of root-colonizing bacteria in plant growth. In *Phytopathogenic Prokaryotes*, ed. M. S. Mount, G. H. Lacy, 1:187-223. London: Academic
- 117.- Schneider, R. W. 1982. *Suppressive Soils and Plant Disease*. St. Paul: Am. Phytopathol. Soc. 88 pp.
- 118.- Salt, G. A. 1979. The increasing interest in "minor pathogens." See Ref. 36, pp. 209-27
- 119.- Filonow, A.B. y Lockwood, J. L. 1985. Evaluation of several actinomycetes and the fungus *Hyphochytrium catenoides* as biocontrol agents for *Phytophthora* root rot of soybean. *Plant Dis.* 69: 1033-36
- 120.- Sutherland, E. D. y Lockwood, J. L. 1984. Hyperparasitism of oospores of some *Peronosporales* by *Actinoplanes missouriensis* and *Humicola fuscoatra* and other *Actinomycetes* and fungi. *Can. J. Plant Pathol.* 6: 139-45
- 121.- Kerr, A. 1972. Biological control of crown gall: seed inoculation. *J. Appl. Bacteriol.* 35:493-97
- 122.- Kerr, A. 1980. Biological control of crown gall through production of agrocin 84. *Plant Dis.* 64:25-30.
- 123.- Moore, L. W. 1979. Practical use and succes of *Agrobacterium radiobacter* strain 84 fur crown gall control. See Ref. 36, pp. 553-68.
- 124.- Cooksey, D. A., Moore, L. W. 1982. Biological control of crown gall with an agrocin mutant of *Agrobacterium radiobacter*. *Phytopathology* 72:919-21.
- 125.- Kerr A. 1974. Soil microbiological studies on *Agrobacterium radiobacter* and biological control of crown gall. *Soil Sci.* 111-116
- 126.- Moore, L. W. y Warren, G. 1979. *Agrobacterium radiobacter* strain 84 and biological control of crown gall. *Annu. Rev. Phytopathol.* 17:163-79
- 127.- Elad, Y. y Chet, I. 1987. Possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Pythium* damping-off by bacteria. *Phytopathology* 77:190-95
- 128.- Koth, J. S. y Gunner, H. B. 1967. Establishment of a rhizosphere microflora on carnation as a means of plant protection in steamed greenhouse soils. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 91:617-26
- 129.- Mitchell, R. y Hurwitz, E. 1965. Suppression of *Phytium devaryanum* by lytic rhizosphere bacteria. *Phytopathology* 55:156-58
- 130.- Sneh, B. 1981. Use of rhizosphere chitinolytic bacteria for biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in carnation. *Phytopathol. Z.* 100:251-56
- 131.- Meshram, S. U. y Jager, G. 1983. Antagonism of *Azotobacter chroococcum* isolates to *Rhizoctonia solani*. *Neth. J. Plant Pathol.* 89:191-97
- 132.- Anwar, A.A. 1949. Factors affecting the survival of *Helminthosporium sativum* and *Fusarium lini* in soil. *Phytopathology* 39:1005-19

- 133.- Broadbent, P., Baker, K. F., Franks, N. y Holland, J. 1977. Effect of *Bacillus* spp. on increased growth of seedlings in steamed and in nontreated soil. *Phytopathology* 67:1027-34
- 134.- Broadbent, P., Baker, K. F. y Waterworth, Y. 1971. Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australian soils. *Aust. J. Biol. Sci.* 24:925-44
- 135.- Burr, T. J., Schroth, M. N. y Soslow, T. 1978. Increased potato yields by treatment of seed pieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. *Phytopathology* 68:1377-83
- 136.- Capper, A. L. y Campbell, R. 1986. The effect of artificially inoculated antagonistic bacteria on the prevalence of take-all disease of wheat in field experiments. *J. Appl. Bacteriol.* 60:155-60
- 137.- Chang, L. y Kommedahl, T. 1968. Biological control of seedling blight of corn by coating kernels with antagonistic microorganisms. *Phytopathology* 58:1395-1401
- 138.- Dunleavy, J. 1955. Control of damping off of sugarbeet by *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 45:252-58
- 139.- Faull, J. y Campbell, R. 1979. Ultrastructure of the interaction between the take-all fungus and antagonistic bacteria. *Can. J. Bot.* 57:1800-8
- 140.- Kommedahl, T. y Mew, I. C. 1975. Biocontrol of corn root infection in the field by seed treatment with antagonists. *Phytopathology* 65:296-300
- 141.- Kwok, O. C. H., Fahy, P. C., Hoitink, H. A. J. y Kuter, G. A. 1987. Interactions between bacteria and *Trichoderma* in suppression of *Rhizoctonia* damping-off in bark compost media. *Phytopathology* 77:1206-12
- 142.- Merriman, P. R., Price, R. D. y Baker, K. F. 1974. The effect of inoculation of seed with antagonists of *Rhizoctonia solani* on the growth of wheat. *Aust. J. Agric. Res.* 25:213-18.
- 143.- Merriman, P. R., Price, R. D., Kollmorgen, J. F., Piggott, T. y Ridge, E. H. 1974. Effect of seed inoculation with *Bacillus subtilis* and *Streptomyces griseus* on the growth of cereals and carrots. *Aust. J. Agric. Res.* 25:219-26
- 144.- Thirumalachar, M. J. y O'Brien, M. J. 1977. Suppression of charcoalrot in potato with a bacterial antagonist. *Plant Dis. Repr.* 61:543-46
- 145.- Hadar, Y., Harman, G. E., Taylor, A. G. y Norton, J. M. 1983. Effects of pregermination of pea and cucumber seeds and of seed treatment with *Enterobacter cloacae* on rots caused by *Pythium* spp. *Phytopathology* 73:1322-25
- 146.- Nair, N.G. y Fahv, P. C. 1972. Bacteria antagonistic to *Pseudomonas tolaasii* and their control of brown blotch of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *J. Appl. Bact.* 35:439-42
- 147.- Nelson, E. B., Chao, W. L., Norton, J. M., Nash, G. T. y Harman, G. E. 1986. Attachment of *Enterobacter cloacae* to hyphae of *Pythium ultimum*: Possible role in biological control of *Pythium* pre-emergence damping-off. *Phytopathology* 76:327-35
- 148.- Sneh, B., Dupler, M., Elad, Y. y Baker, R. 1984. Chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* as affected by fluorescent and lytic bacteria from *Fusarium*-suppressive soil. *Phytopathology* 74: 1115-24
- 149.- Chen, W., Hoitink, H. A. J y Schmitthenner, A. F. 1987. Factors affecting suppression of *Pythium* damping-off in container media amended with compost. *Phytopathology* 77:755-60

- 150.- Snch. B., Agami, O. y Baker, R. 1985. Biological control of *Fusarium* wilt in carnation with *Serratia liquefaciens* and *Hafnia alvei* isolated from rhizosphere of carnation. *Phytopathol. Z.* 113:271-76
- 151.- Caesar, A. J. y Burr, T. J., 1987. Growth promotion of apple seedlings and root-stucks by specific strains of bacteria. *Phytopathology* 77: 1583-88
- 152.- Chen, W. Y. y Echandi, E. 1984. Effects of avirulent bacteriocin-producing strains of *Pseudomonas solanacearum* on the control of bacterial wilt of tobacco. *Plant Pathol.* 33:245-53
- 153.- Colyer, P. D. y Mount, M. S. 1984. Bacterization of potatoes with *Pseudomonas putida* and its influence on postharvest soft rot diseases. *Plant Dis.* 68:703-6
- 154.- Elad, Y. y Baker, R. 1985. Influence of trace amounts of cations and siderophore-producing pseudomonads on chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 75:1047-52
- 155.- Elad, Y. y Baker, R. 1985. The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamydospore germination of *Fusarium* spp. by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 75:1053-59
- 156.- Elad, Y., Chet, I. y Baker, R. 1987. Increased growth response of plants induced by rhizobacteria antagonistic to soilborne pathogenic fungi. *Plant Soil* 98:325-30
- 157.- Ganesan, P. y Gnanananicam, S. S. 1987. Biological control of *Sclerotium rolfsii* Sacc. in peanut by inoculation with *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biol. Biochem.* 19:35-38.
- 158.- Geels, F. P. y Schippers, B. 1983. Selection of antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. and their root colonization and persistence following treatment of seed potatoes. *Phytopathol. Z.* 108:193-206.
- 159.- Geels, F. P. y Schippers, B. 1983. Reduction of yield depressions in high frequency potato cropping soil after seed tuber treatments with antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathol. Z.* 108:207-214.
- 160.- Geels, F. P. y Schippers, B. 1983. Selection of antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. and their root colonization and persistence following treatment of seed potatoes. *Phytopathol. Z.* 108:193-206.
- 161.- Geels, F. P. y Schippers, B. 1983. Reduction of yield depressions in high frequency potato cropping soil after seed tuber treatments with antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathol. Z.* 108:207-214.
- 162.- Howell, C. R. y Stipanovic, R. D. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonads fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology* 69:480-82.
- 163.- Howell, C.R. y Stipanovic, R.D. 1980. Supresión of *Pythium* ultimon induced camping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteerin. *Phytopathology* 70:712-15.
- 164.- Howie, W.J. y Echandi, E. 1983. Rhizobacteria: influence of cultivar and soil type on plant growth and yield of potato. *Oil Bio. Biochem.* 15:127-32
- 165.- Kawamoto, S.O. y Lorbeer, J.W. 1976. Protection of onion seedlings from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* by seed and soil infestation with *Pseudomonas cepacia*. *Plant Dis. Repr.* 60:189-91.
- 166.- Kempe, J. y Sequeira, L. 1983. Biological control of bacteria wilt of potatoes: Attempts to induce resistance by treating tubers with bacteria. *Plant Dis.* 67:499-503.
- 167.- Kloeppe, J.W. 1983. Effect of seed picce inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on populations of *Erwinia carotovora* on potato roots and daughter tubers. *Phytopathology* 73:217-219.

- 168.- Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M. y Schroth, M.N.. 1980. *Pseudomonas siderophores*: A mechanism explaining disease suppressive soils. *Curr. Microbiol.* 4:317-320.
- 169.- Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M. y Schroth, M.N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* 286:885-886.
- 170.- Kloepper, J. W. y Schroth, M. N. 1978. Plant growth promoting rhizobacteria on radish. *Proc. 4th Int. Conf. Plant Pathol. Bacteria*, Vol. II:879-82. Tours: Gilbert-Clarey. 979 PP.
- 171.- Meyer, J.R. y Linderman, R.G. 1986. Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and a plant-growth promoting bacterium, *Pseudomonas putida*. *Soil Biol. Biochem.* 18: 185-190.
- 172.- Olsen, M. W. y Misaghi, I. J. 1984. Responses of guayule (*Parthenium argentatum*) seedlings to plant growth promoting fluorescent pseudomonads. *Plant and Soil* 77:97-101.
- 173.- Brown, S. M, Kepner, J. L. y Smart, G.C. Jr. 1985. Increased crop yields following applications of *Bacillus penetrans* to field plots infested with *Meloidogyne incognita*. *Soil Biol. Biochem.* 17:483-486.
- 174.- Sayre, R. M., Ghera, R. L. y Wergin, W.P. 1983. Morphological and taxonomic reevaluation of *Pasteuria ramosa* Metchnikoff 1888 and "Bacillus penetrans" Mankav 1975. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33:636-649.
- 175.- Sayre, R. M. y Starr, M. P. 1985. *Pasteuria penetrans* (ex Thorne, 1940) nom. rev., comb. n., sp. n., a mycelial and endospore-forming bacterium parasitic in plant-parasitic nematodes. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 52: 149-165.
- 176.- Stirling, G. R. 1984. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penentrans*. *Phytopathology* 74:55-60.
- 177.- Chakraborty, U. y Purkayastha, R. P. 1984. Role of rhizobitoxine in protecting soybean roots from *Macrophomina phaseolina* infection. *Can J. Microbiol.* 30:285-289.
- 178.- Chattopadhyay, S. K. y Nandi, B. 1982. Inhibition of *Helminthosporium oryzae* and *Alternaria solani* by *Streptomyces longisporus* (Krasil' nokov) Waksman. *Plant Soil* 69:171-175.
- 179.- Rothrock, C.S. y Gottlieb, D. 1984. Role of antibiosis in antagonism of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* to *Rhizoctonia solani* in soil. *Can. J. Microbiol.* 30:1440-447
- 180.- Budge, S. P., McQuilken, M.P., Fenlon J.S. y Whipps, J.M. 1995. Use of *Coniothyrium minitans* and *Gliocladium vivens* for biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* in glasshouse lettuce. *Biol. Control* 5:513-522.
- 181.- Danoff, L.E., Nemec, S., y Pernecky, K. 1995. Biological control of Fusarium crown and root rot of tomato in Florida using *Trichoderma harzarium* y *Glomus intradices*. *Biol. Control* 5: 427-431.
- 182.- Danoff, L.E., Nemec, S. y Pohronezny K. 1993. Influence of *Trichoderma harzarium* y *Glomus intradices* on incidence and severity of Fusarium crown y root. *Biol. Cultural Test* 9,78
- 183.- De Boer, M., van der Slis, I., Looon, L.C. y Baker, P. A. H. M. 1997. In vitro compatibility between fluorescent *Pseudomonas* spp. Strains can increase effectivity of Fusarium wilt control by combinations of these strains. Pages 380-382 in: *Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria- Present Status and Future Prospects. Proc. Int. Workshopp on Plant Growth-promoting Rizobacteria*, 4<sup>th</sup>, A.

- Ogoshi, K. Hobayashi, Y. Homa, F., Koama, N. Kpndo, y S Akino, eds. Nakanishi Printing, Sapporo, Japan.
- 184.- Paulitz, T. C., Ahmad, J. S., y Bakker, R. 1990. Integration of *Pythium nun* and *Trichoderma harzianum* isolate T-95 for the biological control of Pythium damping-off of cucumber. Plant Soil 111: 243-250.
  - 185.- Duffy, B. K., y Weller, D. M. 1996. Combination of *Trichoderma koningii* with fluorescent pseudomonads for control of take-all on wheat. Phytopathology 86: 188-194.
  - 186.- Duffy, B. K., y Weller, D. M. 1995. Use of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* alone and in combination with fluorescent *Pseudomonas* spp. To suppress take-all of wheat. Plant Dis. 79: 907-911.
  - 187.- Hassan, D., G., Zargar, M., y Beigh, G. M. 1997. Biocontrol of *Fusarium* root rot in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by using symbiotic *Glomus mosseae* and *Rhizobium leguminosarum*. Mol. Ecol. 34: 74-80.
  - 188.- Janisiewicz, W. J. 1998. Biocontrol of postharvest diseases of apples with antagonist mixtures. Phytopathology 78: 194 - 198.
  - 189.- Janisiewicz, W. J. 1996. Ecological diversity, niche overlap, and coexistence of antagonists used in developing mixtures for biocontrol of postharvest diseases of apples. Phytopathology 86: 473-479.
  - 190.- Leeman, M., den Ouden, F. M., van Pelt, J. A., Comelissen, C., Matamala-Garros, A., Bakker, P. A. H. M., y Schippers, B. 1996. Suppression of fusarium wilt of radish by co-inoculation of fluorescent *Pseudomonas* spp and root-colonizing fungi. Eur. J. Plant Pathol. 102: 21-31.
  - 191.- Leibinger, W., Beuker, B., Hahn, M., y Menger, K. 1997. Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. Phytopathology 87: 1103-1110.
  - 192.- Lemanceau, P., y Allabouvette, C. 1991. Biological control of fusarium diseases by fluorescent *Pseudomonas* and nonpathogenic *Fusarium* Crop prot. 10: 279-286.
  - 193.- Park, C. Paulitz, T. C., Ahmsd, J. D., y Baker, R. 1990. Biocontrol of Fusarium wilt of cucumber resulting from interactions between *Pseudomonas putida* and nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. Phytopathology 78: 190-194.
  - 194.- Janisiewicz, W. J., y Bors, B. 1995. Development of a microbial community of bacterial and yeast antagonists to control wound-invading postharvest pathogens of fruit. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3261-3267.
  - 195.- Mazzola, M., Fujimoto, D. K., Thomshow, S. y Cookk, R. J. 1995. Variation sensitivity of *Gaeumannomyces graminis* to antibiotics produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. and effect on biological control of take-all wheat. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2554-2559.
  - 196.- Pierson, E. A., y Weller, D. M. 1994. Use of mixtures of fluorescent pseudomonads to suppress take-all and improve the growth of wheat. Phytopathology 84: 940-947.
  - 197.- Raaijmakers, J. M., van der Sluis, I., Koster, M., Bakker P. A. H. M., Weisbeek, P. J. y Schippers, B. 1995. Utilization of heterologous siderophores and rhizosphere competence of fluorescent *Pseudomonas* spp. Can. J. Microbiol. 41: 126-135.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- 198.- Roberts, D. P., Dery, P. D., Mao, W. y Hebar, P. K. 1997. Use of a colonization-deficient strain of *Escherichia coli* in strain combinations for enhanced biocontrol of cucumber seedling diseases. *J. Phytopathol.* 145: 461-463.
- 199.- Schisler, D. A., Slinning, P. J. y Bothast, R. J. 1997. Effects of antagonist cell concentration and two-strain mixtures on biological control of Fusarium dry rot of potatoes. *Phytopathology* 87:177-183.
- 200.- Stockwell, V. O., Jhonson, K. B., y Loper, J. E.. 1996. Compatibility of bacterial antagonists of *Erwinia amylovora* with antibiotics used to control fire blight. *Phytopathology* 86: 834-840.
- 201.- Sung, K.C., y Chung, Y. R. 1997. Enhanced suppression of rice sheath blight using combination of chitinases or antibiotics. Pages 370-372 in: *Plant Growth-promoting Rhizobacteria- Present Status int. Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*, 4<sup>th</sup>. A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, and S. Akino. eds. Nakanishi Printing, Sapporo, Japan.
- 202.- Waechter-Kristensen, B., Gertsson, U. E., Sundin, P. y Serra, G. 1994. Prospects for microbial stabilization in the hydroponic culture of tomato using circulating nutrient solution. *Acta Hort.* 361: 382-387.
- 203.- Wei, G., Kloepper, J. W. y Tuzun, S. 1996. Evaluation of induced systemic resistance and plant growth promotion with mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria strains in the field. Pages 223-226 in: *Advances in Biological Control of Plant Diseases*. T. Wenhua, R. J. Cook, and A. Rovira, eds. China Agricultural University Press, Beijing.
- 204.- Dandurand, L. M., y Knudsen, G. R. 1993. Influence of *Pseudomonas fluorescens* on hyphal growth and biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* in the spermosphere of pea. *Phytopathology* 83: 265-270.
- 205.- Hubbard, J.P., Harman, G. E., y Hadar, Y. 1983. Effect of soilborne *Pseudomonas* spp. on the biological control agent *Trichoderma hamatum* on pea seeds. *Phytopathology* 73: 655-659.
- 206.- Miller, R. H. y May, S. Legume inoculation. Successes and failures pp 123-134 en *The Rhizosphere and plant growth*. D. L. Keister y P. B. Creagan eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 1991.
- 207.- Leeman, M., den Ouden, F.M. y van Pelt, J.A. et al. 1966. Suppression of fusarium wilt of radish by co-inoculation of fluorescent *Pseudomonas* spp and rot-colonizing fungi. *Eur. J. Plant. Pathol.* 102: 21-31.
- 208.- Backman, P.A., Wilson, M. y Murphy, J.F. Bacteria for biological control of plant diseases. pp 95-109 en: *Environmentally Safe Approaches to Crop Disease Control*. N.A. Rechcigl y J.E. Rechcigl eds. CRC. Publishers, Boca Raton, Fl. 1977.
- 209.- Hhallman, J., Quadt-Hallman, A., Mahafee, W.F. y Kloepper, J.W. 1977. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43: 895-914.
- 210.- Mundt, J.O. y Hinkle, N.F. 1976. Bacteria within ovules and seeds. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 694-698.
- 211.- Trevet, I.W. y Hollis, J.P. 1984 Bacteria in the storage organs of healthy plants. *Phytopathology*. 38: 960-967.
- 212.- Philipson, M.N. y Blair, I.D. 1957. Bacteria in clover root tissue. *Can. J. Microbiol.* 3: 125-129
- 213.- Samish, Z., Etinger-Tulczynska, R. y Bick, M. 1961. Microflora within healthy tomatoes. *Appl. Microbiol.* 9: 20-25.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA



- 214.- Samish, Z., Etinger-Tulczynska, R. y Bick, M. 1963. The microflora within the tissue of fruits and vegetables. *J. Food Sci.* 28: 259-266.
- 215.- Gardner, J.M., Feldman, A.W. y Zablutowicz, R.M. 1982. Identity and behavior of xylem-residing bacteria in rough lemon rots of Florida citrus trees. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 1335-1342.
- 216.- Sturz, A.V. 1995. The role of endophytic bacteria during the seed decay and potato tuberization. *Plant Soil.* 175: 257-263.
- 217.- Chen, C., Bauske, E. M., Musson, G. Rodríguez-Kábana, R. y Klopper, J.W. 1995. Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. *Biol. Control.* 5: 83-91.
- 218.- Frommel, M.I., Nowak J., y Lazarovitz G. 1991. Growth enhancement and developmental modifications of *in vitro* grown potato (*Solanum tuberosum* spp *tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiol.* 96:928-936.
- 219.- Kempe, J y Sequeria, L. 1983. Biological control of bacterial wilt potatoes: attempts to induce resistance by treating tubers with bacteria. *Plant Dis.* 67: 499-503.
- 220.- Téliz, O.D. y Castro, F.J. 1973. El cultivo de la fresa en México. INIA, SAG. Folleto de divulgación No 48. 37 p.
- 221.- Hooker, 1986. Compendium of potato diseases. APS Press. 125 pp.
- 222.- Powelson, M.L., K.B. Johnson y R.C. Rowe. 1993. Management of discens caused by soilborne plant pathogens. En: Potato health management. APS Press. pp149-158.
- 223.- Carling, D.E., R.H. Leiner y P. C. Westphale. 1989. Symptoms, signs and yield reduction associated with *Rhizoctonia* disease of potato induced by tuberborn inoculum of *Rhizoctonia solani* AG-3. *Am. Potato J.* 66:693-701.
- 224.- Banville, G.J. 1989. Yield losses damage to potato plant caused by *Rhizoctonia solani* Kühn. *Am. Potato J.* 66:821-834.
- 225.- Mendoza, Z.C. y Pinto, C.B. 1985. Principios de Fitopatología y enfermedades causadas por hongos. UACH. Edo. de México. 311 pp.
- 226.- Herrera, T. Y Ulloa, M. 1990. El reino de los hongos, micología básica y aplicada. Instituto de Biología UNAM-FCE. Primera edición. México 522 pp.
- 227.- Katan, J. 1981. Solar heating (solarization) of soil for control of soilborne pests. *Ann. Rev. Phytopathol.* 19:211-236.
- 228.- Ramirez, V. J. 1992. La solarización del suelo, un método sencillo para controlar fitopatógenos y malas hierbas. Universidad Autónoma de Sinaloa. México. 44 pp.
- 229.- Muñoz, R.C., Ponce A. C. y Alvarado A.F. 1995. Efecto bactericida de la cal hidratada en solución acuosa. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana. Vol. 118 (4) : 302-306.
- 230.- Muñoz, R.C., Collazo P.A., Preciado, G.H., Soto, P.C., Valdespino G.J.L., Alvarado A., F.J. Efecto bactericida del hidróxido de calcio micronizado sobre *Vibrio cholerae* O1 valorado por microcitometría de flujo. Guadalajara, México: Asociación Mexicana de Microbiología, informe presentado en el XXIV Congreso Nacional de Microbiología, marzo de 1993. (Resumen M-2).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- 231.- Atlas Nacional del Medio Físico. 1981. Secretaria de Programación y Presupuesto. p 162-163.
- 232.- Escartín F.E. 1981. Microbiología Sanitaria de Agua y Alimentos. Vol I. Universidad de Guadalajara. p109-146.
- 233.- Etchevers, J. 1992. B. Manual de métodos para el análisis de suelos plantas agua y fertilizantes. Colegio de postgraduados en ciencias agrícolas. Montecillo Edo. de Méx. 96 pp
- 234.- Jiménez, D.F y Chew M. J. 1996. Periodos de solarización y su influencia en la población de hongos del suelo y producción de melón (*Cucumis melo* L.) Rev. Mex. de Fitopatol 14: 38-47.
- 235.- Agrios, G.N. 1978. Plant Pathology. Ed Academic Press. New York. p 186-187
- 236.- Jackson, M.L.. 1982. Análisis Químico de suelos . Ediciones Omega. Barcelona.. p 300-301.
- 237.- Carling, D.E. y Sumner D.R. 1992. *Rhizoctonia* En: Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. Singleton, L.L., Mihail J.D. y Rush C. M. Ed. APS Press. Minn. pp 157-165.
- 238.- Hill, C.B. y Anderson, N.A. 1989. An evaluation of potato disease caused by isolates of *Rhizoctonia solani* AG-3 Am. Potato J. 66: 709-721
- 239.- Muñoz, C., I. García y S. López. 1998. Propiedades antifúngicas del fruto inmaduro de *Lycopersicon esculentum* Mill. Var. *cerasiforme* Dunal (Alef.) rev. Mex. De Fitopat. 16(1)115.
- 240.- Romeiro, R. S., Tacatsu, A., Uesugi, C. H., Moura, A. B. Silva, H. S. A. Y Carvalho, M. G. 2000. A Simple method to select Rhizobacterias that promote root colonization and are potentially implicated in inducible systemic resistance to diseases. Resúmenes de 5º Taller Internacional de Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Córdoba Argentina.
- 241.- Jiménez, M. y Flores P. 1980. Manual de Microbiología industrial. ENCB. IPN. 78pp.
- 242.- Ogoshi, A. 1987. Ecology and Pathogenicity of anastomosis and intraespecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. Ann. Rev. Phytophol.. 25:125-143.
- 243.- Corden, C.E. 1965. Influence of calcium nutrition on Fusarium wilt of tomato and polygalacturonase activity. Phytopathology 55:222-224
- 244.- Jones, J.P. y Woltz, S.S. 1970. Fusarium wilt of tornato: Interaction of soil liming and micronutrients on disease development. Phytopathology 60:812-813.
- 245.- Waksman, S.A. 1927. Principles of soil microbiology. The Williams and Wilkins Co. Baltimore. MD. 897 pp.
- 246.- Jones, J.P. y Woltz, S.S. 1968. Field control of Fusarium wilt (race 2) of tornato by liming and stake desinfestation. Proc. Fla. State Hort. Soc. 81:187-191.
- 247.- Punja, J.K. Grogan, R.G. y Unruh, T. 1982 Chemical control of *Sclerotium rolfsii* on golf greens in northern California. Plant Dis. 66: 108-111.
- 248.- Bateman, D. y Lumsden, R. 1965. Relation of calcium content and nature of the pectic substances in bean hypocotyls of diferents ages to susceptibility to an isolate of *Rhizoctonia solani*. Phytopath. 55: 734-738.
- 249.- Kratzke, M.G. y Palta, J.P. 1985 Evidence for the existence of functional roots on potato tubers and stolons: significance in water transport to the tuber. Amer. Potato J. 62: 227-236

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- 250.- Kratzke, M.G. y Palta, J.P. 1986. Calcium accumulation in potato tubers: Role of basal roots. Hort. Science 21(4): 1022-1024.
- 251.- Rajan, S. 1975. Phosphate adsorption and the displacement of structural silica on allophane clay. J. Soil. Sci. 26: 250-256.
- 252.- Foy, C. D. 1964. Toxic factors in acid soils of the southeastern United States as related to the response of alfalfa to lime USDA Prod. Res. Rep. no 80.
- 253.- Manson, M. G. 1980. An investigation of reduction in wheat yields after use of a high level of ammonium sulphate for a number of years. Aust. J. Exp. Agric. Hort. 20 : 210-219.
- 254.- Ulrich, B., R. Mayer y Van Dieck, A. 1980. Chemical changes due to acid precipitation in a loess derived soil in central Europe. Soil Sci. 130 193-199.
- 255.- Shear, C. B. 1975. Calcium related disorders of fruits and vegetables Hort-Science 10: 361-365.
- 256.- Bangert, F. 1979. Calcium-related physiological disorders of plants. Ann. Rev. Phytopathol. 17: 97-12.
- 257.- Baumeister, W. 1958. In Encyclopedia of plant physiology, ed. W. Ruhland, Berlin: Springer IV: 5-36. 1210 pp.
- 258.- Bonhier, D. L. y L' Ecluse, R. 1962. Observations sur le bitter-pit des pommes. Acad. Agric. Fr. Cr. Seances Acad. Agric. Fr. 48: 817-820.
- 259.- Fletcher, J.T., Hims M.J., Archer F.C. y Brown, A. 1982. Effects of adding calcium and sodium salts to fields soils on the incidence of club root. Ann. Appl. Biol. 100: 245-251.
- 260.- Anderson, W.C., Gabrielson, R.L., Haglund, W.A. y Baker, A.S. 1976. Clubroot control in crucifers with hydrated lime and PCNB. Plant Dis. Rep. 60: 561-565.
- 261.- Cattelan A.J., P.G. Hartel y J.J. Fuhrmann. 1999. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. Soil Sci. Soc. Am. J. 63: 1670-1680.
- 262.- Van den Boogert, P. - Comunicación personal.
- 263.- Chet, I. 1987. *Trichoderma*: Application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In Chet, I. Ed. Innovative Approaches to Plant Disease Control. Wiley. P. 137-160.
- 264.- Chet, I y Baker, R. 1981. Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive of *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 71: 286-290.
- 265.- Holt, JG; Krieg, NR; Sneath, PH; Staley JT; Williams, ST. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9 ed. Williams & Wilkins.
- 266.- Virgen C, G; Olalde, PV; Rocha R, R. 1996b. Biological and chemical control of *Rhizoctonia solani* on potato in Guanajuato Mexico. Phytopathology 86 (11): S118.
- 267.- Glick, B.R., Karaturovic, D.M. y Newell, P.C. 1995. A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting pseudomonads. Can. J. Microbiol. 41: 533 - 536
- 268.- Oyoque, S. G. 2002. Aislamiento y caracterización biológica de rizobacterias promotoras del desarrollo vegetal. Tesis. Instituto Tecnológico de Jiquilpan.

- 269.- Isunza, V., Alström, S. y Eriksson, B. 2000 Root-associated bacteria from nematicidal plants and their suppressive effects on trichoderid nematodes in potato. Resúmenes de 5º Taller Internacional de Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Córdoba Argentina.
- 270.- Läuchli, A. 1972. Translocation of inorganic solutes. Ann. Rev. Plant Physiol. 23: 197-218.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN