

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE
INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO
INTEGRAL REGIONAL**

UNIDAD SINALOA



Evaluación de la efectividad de *Trichoderma harzianum* (Hartz) y *Bacillus subtilis* (Khön), para el control de la sarna de la papa *Streptomyces* spp.

T E S I S

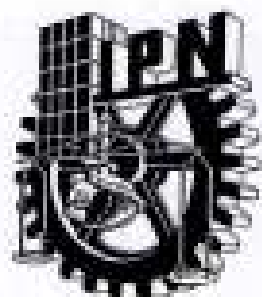
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN RECURSOS
NATURALES Y MEDIO AMBIENTE**

P R E S E N T A

OLIMPIA CASTRO RODRÍGUEZ

GUASAVE, SINALOA, MEXICO 2011.



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

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la ciudad de Guasave Sinaloa el día 24 del mes Noviembre del año 2011, el (la) que suscribe Olimpia Castro Rodríguez alumno (a) del Programa de MAESTRÍA EN RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE con número de registro B091632 adscrito a CIIDIR-Sinaloa, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Cipriano García Gutiérrez y cede los derechos del trabajo intitulado Evaluación de la efectividad de *Trichoderma harzianum* (Hartz) y *Bacillus subtilis* (Khón) para el control de la sarna de la papa *Streptomyces* spp., al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráfico o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección c.olimpia@hotmail.com, cgarciaag@ipn.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Olimpia Castro R.
I. B. Olimpia Castro Rodríguez
Nombre y firma



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIPI-13

**ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS
Y DESIGNACIÓN DE DIRECTOR DE TESIS**

Guasave Sinaloa a 18 de Noviembre del 2011.

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR Sinaloa en su sesión ordinaria No. 11 celebrada el día 03 del mes de Noviembre conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

Castro
Apellido paterno

Rodríguez
Apellido materno

Olimpia
Nombre (s)

Con registro:

B	0	9	1	6	3	2
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: **MAESTRÍA EN RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE**

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
Evaluación de la efectividad de *Trichoderma harzianum* (Hartz) y *Bacillus subtilis* (Khon), para el control de la sarna de la papa *Streptomyces* spp."

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:
Evaluación de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* en laboratorio e invernadero contra el agente causal de la sarna común de la papa *Streptomyces* spp. para un mejor manejo de la enfermedad en la región.

2.- Se designa como Director de Tesis al C. Profesor:
Cipriano García Gutiérrez.

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:
CIIDIR SINALOA que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios del proyecto: búsqueda, aislamiento y selección de hongos y nematodos entomopatógenos para el control de plagas de cultivos agrícolas en Sinaloa. Clave:20101207

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

El Director de Tesis


Dr. Cipriano García Gutiérrez

El Aspirante


Ing. Olimpia Castro Rodríguez

El Presidente del Colegio


Dr. Jorge Montiel Montoya



CIIDIR - IPN
CENTRO DE INVESTIGACIÓN E INVESTIGACIÓN DE INVESTIGACIÓN
CIIDIR - IPN



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-04

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa siendo las 11:30 horas del día 24 del mes de Noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-Sinaloa para examinar la tesis de titulada:

Evaluación de la efectividad de *Trichoderma harzianum* (Hartz) y *Bacillus subtilis* (Khön) para el control de la sarna de la papa *Streptomyces* spp.

Presentada por el alumno:

<u>Castro</u>	<u>Rodriguez</u>	<u>Olimpia</u>							
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)							
Con registro:									
<table border="1"><tr><td>B</td><td>0</td><td>9</td><td>1</td><td>6</td><td>3</td><td>2</td></tr></table>			B	0	9	1	6	3	2
B	0	9	1	6	3	2			

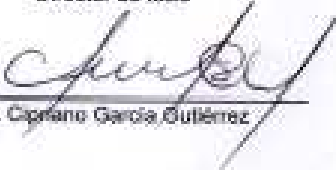
aspirante de:

MAESTRÍA EN RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE

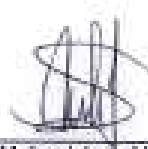
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis


Dr. Cipriano García Gutiérrez


Dr. Adolfo Dagaoberto Armenta B.


Dra. Melina López Meyer


Dr. Henry Rodríguez Garzález


M.C. Jesús Ricardo Camacho Báez

PRESIDENTE DEL COLEGIO


Dr. Jorge Montiel Montoya



CIIDIR - IPN
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE INVESTIGACIÓN E INVESTIGACIÓN DE POSGRADO

AGRADECIMIENTOS

- ✚ Primero que nada a Dios elegirme para vivir esta vida, por colocarme justo en el lugar perfecto entre el amor de familia y el placer de la vivir.

- ✚ A mis padres Bernardo Castro y María Rita Rodríguez por ser mis ejemplos a seguir, por llenarme de amor, por ayudarme a salir adelante, por apoyarme y por cuidarme cada día de mi vida, por enseñarme que no importa cual difícil sea la situación siempre saldremos adelante como la familia que somos, tal vez no la mejor pero si la más unida y la que nunca se dejara vencer por ninguna adversidad.

- ✚ A mis hermanas Laura Aidé y Clarissa por aguantarme, porque eso no es fácil déjenme les digo, quiero decirles que no las cambio por nada ni por nadie, y que siempre podrán contar conmigo, les agradezco el apoyo que me han brindado cada día de sus vidas, hermanas son la razón de mi vida, las amo.

- ✚ A mi toda mi familia, tengo tantos nombres que no se qué hacer con ello, a mi abuelita Rosario porque bien dicen no hay amor más grande que el de una abuela y ella me lo deja claro día a día y yo la quiero muchísimo más, gracias a todos mis tíos, mis primos en especial a Juanjo, Marianito, Denis que haría yo sin ti, Cintia, Claudia, Tatichi lo de nosotros no es cosa de primos es cosa de amigos, de hermanos, los amo muchísimo, no creo tener espacio para ponerlos a todos pero amo mi familia y siempre será así, siempre juntos siempre aquí.

- ✚ Muy en especial a tres personas que perdí durante el proceso de mi maestría, a mi abuelo Mariano el mejor de los mejores, nadie como él, y se

sentía tan orgulloso que yo le platicara mis cosas de la escuela que aun lo veo sonreír, a mi abuela Rita por su cariño y por demostrarme que no importan los años que uno tiene siempre debe seguir luchando ante la vida, a mi nina Mary porque ninguna mujer he conocido con su entereza y sus ganas de trabajar, aun con muchos años encima nunca dejo de luchar por lo que creía justo. Lamentablemente ellos ya no están conmigo en su forma carnal, pero estarán siempre en mi mente y en mi corazón, descansen en paz, pues sus obras en la tierra abrieron para ustedes las puertas del cielo.

✚ Al Dr. Cipriano García Gutiérrez por haberme brindado apoyo en todo momento en mi investigación, por creer en mí y darme la oportunidad de entrar a su grupo de trabajo, creo que no lo defraude y aquí está mi resultado.

✚ A mis sinodales por su apoyo y entera disposición a colaborar en mi trabajo de investigación, Dra. Melina López Meyer, Dr. Dagoberto Armenta, M.C. Jesús Ricardo Camacho y Dr. Hervey Rodríguez.

✚ Agradezco infinitamente a mis amigos, en especialmente Nadia Douriet, Alejandra González, Karla María Cota y Analilia Rete, porque Dios ya había juntado nuestros caminos en el pasado, pero hoy compartimos ese camino, ¡¡Y QUE CAMINO!!, Odette López aunque fue poco el tiempo de tu maestría que estuviste cerca de nosotras nuestra amistad seguirá por siempre, a todas les agradezco tantas cosas: las risas, el apoyo, la compañía, la amistad, el hombro para llorar, el disco de Zoe que nos saco del hoyo, hay dios no terminaría de escribir cosas, solo les diré que lo que he vivido con ustedes nunca lo voy a olvidar, JAMAS, porque me han demostrado que su amistad es sincera y aunque uno se equivoque los amigos perdonan y apoyan no importa lo que pase, siempre estaré para ustedes, espero esto no quede en las paredes del BIOTEC SIN si no que trascienda al mundo entero, las adoro. Por supuesto que me falta agradecer

a Gustavito, Damián y Alejandro, con quien compartimos momentos inolvidables y espero seguir compartiéndolos, como dijo el gordito “nunca había tenido un grupo tan unido como este que no quede ahí”, los quiero mucho amigos.

✚ Agradezco a los miembros de mi laboratorio a todos, porque todos de alguna u otra manera influyeron en mi trabajo Luis, Arturo, Arely, Miguel, Claudia, Gerardo Macillas, Rey, gracias también por hacer más amena mi estadía en este laboratorio, y muy especialmente a mi amiga Nadia Vázquez Montoya, gracias Nadia inmensamente por haberme ayudado tantas veces en todo, no tengo palabras suficientes para expresarte lo agradecida que estoy contigo, sabes que te quiero mucho y que siempre estaré para ti.

✚ A los miembros del laboratorio de la Dra. Melina por haberme aguantado durante un mes, especialmente a Claudia María y Hugo, quienes me ayudaron a cumplir uno de mis objetivos.

✚ A mis compañeros de generación, alumnos y personal de la institución que de alguna manera fueron parte de mi estancia: Rocio, Lalo, Camila, Rogelio, Luky, Abraham, Héctor, Lucy, Juan Jesús (D.E.P.), Mauricio, Carlos, Eimer, Juan José, Erica, Marcos, Wuendy, Tino, Richard, Herlinda, Elvira, don Roberto, Dorín, Anais, Ana Lucia, mil gracias a todos.

ÍNDICE

Glosario	I
Índice de Figuras	III
Índice de Cuadros	IV
Resumen	V
Abstract	VI
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
2.1. Papa <i>Solanum tuberosum</i> (L.)	2
2.1.1. Generalidades	2
2.1.2. Ubicación taxonómica	3
2.1.3. Variedades	3
2.1.4. Siembra de la papa	4
2.1.4.1. Monocultivo	5
2.1.5. Importancia de la papa	5
2.1.5.1. Nutricional	5
2.1.5.2. Económica	6
2.1.6. Problemática económica	6
2.1.7. Distribución y comercialización	7
2.1.8. Norma Oficial Mexicana para la comercialización de la papa	8
2.1.8.1. Inocuidad	8
2.1.8.2. Calidad	8
2.1.9. Enfermedades que afectan al cultivo de la papa	8
2.1.9.1. Producidas por hongos	9
2.1.9.2. Producida por virus	9
2.1.9.3. Producida por bacterias	10
2.2. Sarna común de la papa (SCP)	10
2.2.1. Ciclo de vida de <i>Streptomyces</i> spp.	12
2.2.2. Morfología del cultivo <i>in vitro</i>	13
2.2.3. Tipos de control o manejo de la enfermedad	13

2.2.3.1. Químico	13
2.2.3.2. Cultural	14
2.2.3.3. Control biológico	14
2.3. Antagonistas usados en el control biológico de patógenos de plantas	15
2.3.1. Mecanismo mediante los cuales los antagonistas ejercen su acción	16
2.3.1.1. Antibiosis	16
2.3.1.2. Competencia	16
2.3.1.3. Parasitismo	17
2.3.1.4. Predación	17
2.3.1.5. Inducción de resistencia a la enfermedad	17
2.3.2. Estudios con microorganismos antagonistas	18
2.3.3. <i>Trichoderma harzianum</i> (Hartz)	20
2.3.3.1. Morfología	20
2.3.3.2. Requerimientos nutricionales y condiciones óptimas de crecimiento	21
2.3.3.3. Mecanismos de acción	21
2.3.3.4. <i>T. harzianum</i> como controlador biológico	22
2.3.4. <i>Bacillus subtilis</i> (Khön)	23
2.3.4.1. Morfología	23
2.3.4.2. Requerimientos nutricionales y condiciones óptimas de crecimiento	23
2.3.4.3. Mecanismos de acción	24
2.3.4.4. <i>B. subtilis</i> como controlador biológico	24
III. JUSTIFICACIÓN	25
IV. OBJETIVO	26
4.1. Objetivo general	26
4.2. Objetivos específicos	26
4.3. Hipótesis	26
V. MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1. Aislamiento del patógeno causante de la sarna común	27

5.1.1. Postulado de Koch	27
5.1.2. Aislamiento de <i>Streptomyces</i> spp	27
5.2. Bioensayos <i>in vivo</i> (Patogenicidad de aislados)	28
5.3. Identificación molecular a nivel de género	29
5.3.1. Extracción de DNA genómico	29
5.3.2. Electroforesis en gel de agarosa	30
5.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	30
5.4. Bioensayos <i>in vitro</i> (pruebas de antagonismo en placa)	31
5.5. Pruebas de patogenicidad en invernadero	32
5.5.1. Producción de inoculos de antagonistas para pruebas de patogenicidad	32
5.5.2. Efectividad biológica de <i>B. subtilis</i> y <i>T. harzianum</i> contra <i>Streptomyces</i> spp. en papa	33
5.5.2.1. Preparación del inoculo de <i>Streptomyces</i> spp.	33
5.5.2.2. Preparación de inoculo y método de aplicación de <i>B. subtilis</i> y <i>T. harzianum</i> en invernadero	34
5.5.2.3. Evaluación de variables experimentales en papa (altura de planta, número de tubérculos cosechados, incidencia de sarna común, severidad de la enfermedad)	35
VI. RESULTADOS	36
6.1. Aislamiento de microorganismos de suelo y tejido infectado	36
6.2. Bioensayo <i>in vivo</i>	38
6.3. Caracterización a nivel género de <i>Streptomyces</i> spp.	39
6.3.1. Extracción de DNA	39
6.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PRC)	39
6.4. Bioensayo <i>in vitro</i>	40
6.5. Resultados de la medición de variables evaluadas en invernadero	42
6.5.1. Altura de planta	43
6.5.2. Número total de tubérculos cosechados	45
6.5.3. Tubérculos con sarna común de la papa	46

6.5.4. Incidencia de sarna común de la papa	48
6.5.5. Severidad de las lesiones	50
VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	52
VIII. CONCLUSIONES	55
IX. LITERATURA CITADA	56

GLOSARIO

Antagonismo: se refiere a la interacción entre organismos o sustancias que causa la pérdida de actividad de uno de ellos.

Bacterias: Organismo microscópico unicelular procariota, carente de núcleo, que se multiplica por división celular sencilla o por esporas.

Biocontrol: Capacidad de organismos vivo para controlar otros organismos.

Cepas: colonia de microorganismos aislados y caracterizados molecularmente hasta género y especie.

Conidios: Cada una de las esporas que nacen por gemación en el extremo de una hifa especializada o no.

Controlados biológico: Microorganismo con la capacidad de controlar el desarrollo o interrumpir el ciclo de vida de otro microorganismos, disminuyendo o eliminando su población

Electroforesis: Fenómeno de migración que presentan las partículas cargadas cuando se someten a la acción de un campo eléctrico.

Esporas: Unidad reproductiva, típica de la reproducción asexual que puede ser unicelular, y que no necesita fecundarse para originar un nuevo individuo.

Hifas: Cada uno de los filamentos que constituyen el aparato vegetativo de algunos hongos, que sirve para tomar los nutrientes del suelo.

Hongos: Organismo pluricelular heterótrofo que vive fijo en la tierra o en la superficie en la que crece, generalmente en lugares húmedos; carece de clorofila, se alimenta principalmente de materia en descomposición y se reproduce de forma sexual o asexual.

Materia orgánica: Materiales que se encuentran en el suelo y cuyo origen son, residuos vegetales o animales precedentes de organismos muertos en diferentes etapas de descomposición.

Microorganismo: Especies o grupos constituidas por individuos, que son distinguidos únicamente con el uso de un microscopio. Se separan en microflora y microfauna.

PCR (del ingles “polymerase chain reaction”). Reacción en cadena de la polimerasa: Sistema de amplificación genética que permite obtener millones de copias de un determinado fragmento de ADN o ARN del que simplemente se conozcan dos secuencias que lo flanqueen.

pH (Potencial hidrógeno): Abreviatura que indica el grado de acidez o alcalinidad de un medio. Las soluciones son ácidas cuando el valor de pH comprende entre 0 y 7 en orden decreciente; las soluciones son alcalinas cuando el valor de pH oscila entre 7 y 14 en orden creciente. Las soluciones son neutras cuando el valor de pH es de 7.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo de vida de <i>Streptomyces</i> spp.	12
Figura 2.	Primers específicos para <i>Streptomyces</i>	29
Figura 3.	Daño causado por <i>Streptomyces</i> spp.	37
Figura 4.	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la extracción de DNA	38
Figura 5.	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para la identificación a nivel género de <i>Streptomyces</i> spp.	39
Figura 6.	<i>T. harzianum</i> mostrando antagonismo vs <i>Streptomyces</i> spp.	40
Figura 7.	<i>B. subtilis</i> limitando el espacio de crecimiento de <i>Streptomyces</i> spp.	40
Figura 8.	Control (+) de <i>Streptomyces</i> spp.	40
Figura 9.	Mejores resultados generales en invernadero	42
Figura 10.	Número de tubérculos cosechados	44
Figura 11.	Tubérculos infectados con sarna común de la papa	46
Figura 12.	Número de tubérculos cosechados en los tratamientos 9 y 16	48

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Escala de severidad del daño de sarna común de la papa	34
Cuadro 2.	Características morfológicas de los 10 aislados capaces de crecer en antibiótico	36
Cuadro 3.	Resultados de variables evaluadas en invernadero	41
Cuadro 4.	Comparación de medias en altura de plantas	43
Cuadro 5.	Comparación de medias en el número total de tubérculos cosechados	45
Cuadro 6.	Comparación de medias de tubérculos con sarna común de la papa	47
Cuadro 7.	Comparación de medias de la incidencia de sarna común de la papa	49
Cuadro 8.	Comparación de medias de la severidad de los tratamientos	50

RESUMEN

Los tubérculos de la papa son afectados por patógenos en el suelo, un ejemplo es *Streptomyces spp.*, agente que causa la sarna común de la papa; estos actinomicetos disminuyen la calidad de la papa, debido a las lesiones que causan en el exterior de ella (acorchamiento), disminuyendo su comercialización. El biocontrol, es la utilización de microorganismos antagonistas para el control o eliminación de patógenos. Existen varios agentes antagonistas conocidos, en esta investigación utilizamos dos, *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum*, para ello se aisló el patógeno de la región, en suelos agrícolas donde anteriormente se presentó la enfermedad y se trabajó con ese aislado nativo patogénico, además se utilizaron cepas comerciales y nativas aisladas e identificadas como antagonistas en el laboratorio de bioinsecticidas del CIIDIR Sinaloa. Se realizó la identificación molecular hasta género del patógeno a través de un PCR como complemento a la identificación morfológica, el cual resultó ser *Streptomyces spp.* Una vez realizados los bioensayos de antagonismo e infección en el laboratorio, se realizaron las pruebas en invernadero, utilizando concentraciones conocidas de los antagonistas (*B. subtilis* 1×10^4 , 1×10^6 , 1×10^8 UFC/ml, *T. harzianum* 1×10^5 , 1×10^8 , 1×10^{10} esporas/ml) y del patógeno (3×10^3 esporas/kg) aplicado en el sustrato. Los antagonistas fueron aplicados de igual forma. Se realizaron mediciones cada 15 días durante el desarrollo fenológico de la planta. Los datos de las variables se analizaron usando el paquete estadístico SAS, y aplicando un ANOVA y una prueba de TUKEY. Se encontró que la mejor cepa fue la número 3 de *B. subtilis* (cepa comercial) la cual presentó la mejor producción de tubérculo, así como una nula incidencia de la enfermedad. En conclusión *B. subtilis* en general tuvo mejores resultados que *T. harzianum*, no obstante ambos pueden ser usados como biocontroladores contra la sarna común de la papa.

ABSTRACT

Potato tubers are affected by pathogens in the soil, an example is *Streptomyces* spp. Which one is the agent of common scab of potato; these actinomycetes diminish the quality of potatoes, causing injuries on the outside, decreasing their marketing. Biocontrol is the use of antagonistic microorganisms to control or eliminate pathogens. There are several known antagonists, this research used two, *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum*, for this investigation the pathogen was isolated in the region, in agricultural soils where previously the disease was introduced and worked with tentative isolated pathogenic strains were used in addition commercial and native isolated and identified as antagonists in the laboratory of bioinsecticidas in CIIDIR Sinaloa. We perform the molecular identification of the pathogen to genus through a PCR to complement the morphological identification, which turned out to be *Streptomyces* spp. Once the antagonism bioassays and infection in the laboratory were tested, we probe the antagonistic action in a greenhouse, using known concentrations of the antagonist (*B. subtilis* 1x10⁴, 1x10⁶, 1x10⁸ CFU / ml, *T. harzianum* 1x10⁵, 1x10⁸, 1x10¹⁰ spores / ml) and the pathogen (3x10³ spores / kg) applied on the substrate. The antagonists were applied in the same way. Measurements were made every 15 days during the phenological development of the plant. Data variables were analyzed using the SAS statistical package, and applying ANOVA and Tukey's test. It was found that the best strain was the number 3 of *B. subtilis* (commercial strain) that presented the best potato production and none incidence of the disease. In conclusion *B. subtilis* generally acted better than *T. harzianum*, however both can be used as biocontrol against common scab of potato.

I. INTRODUCCIÓN

Desde tiempos remotos la agricultura forma parte básica de la supervivencia del ser humano, desde las recolecciones y primeras siembras hechas por nuestros antepasados, hasta la fabricación de estructuras y la creación de atmósferas controladas para mejorar la calidad y producción de los cultivos.

El hombre siempre ha buscando superarse así mismo por lo que ha experimentado con nuevos métodos y técnicas de producción agrícola lo cual ha llevado al desarrollo de la agricultura protegida, ya sea como un invernadero, una casa sombra, túneles o acolchados, con el fin de proteger al cultivo de condiciones adversas del clima y de diversos patógenos. Aún así, existen microorganismos causantes de enfermedades que se encuentran tanto en el ambiente como en la rizosfera del cultivo, es por ello que algunos son más susceptibles a estas enfermedades, como los tubérculos, los cuales se exponen a un medio que contiene patógenos que generan enfermedades.

Los tubérculos de la papa son afectados por algunos de estos microorganismos patógenos como *Streptomyces spp.*, agente causante de la sarna común de la papa. Estas enfermedades provocan en el cultivo importantes pérdidas de rendimiento y calidad comercial en su cosecha, lo cual es un resultado no grato para los agricultores que se enfrentan a retos mayores para controlar las enfermedades causadas por patógenos en el suelo; además las normas de inocuidad alimentaria exigen alimentos sanos para el consumo.

Por lo anterior, en el presente trabajo se han evaluado microorganismos como *B. subtilis* y *T. harzianum* como posibles antagonistas contra microorganismos patógenos y en particular contra *Streptomyces spp.*

II. ANTECEDENTES

2.1. Papa *Solanum tuberosum* (L.)

2.1.1. Generalidades

La papa es una planta originaria del altiplano Andino en una área que coincide aproximadamente con el Sur del Perú, donde ha sido cultivada y consumida al menos desde el VIII milenio A.C. Fue introducida a Europa por los conquistadores españoles, tardó miles de años en incorporarse a la dieta por contener sustancias tóxicas en sus partes verdes, pero posteriormente se convirtió en uno de los principales cultivos en distintas regiones del planeta.

Las especies de papa cultivadas son tetraploides que pertenecen a la especies *Solanum tuberosum* (L.) es una planta anual, herbácea, dicotiledónea, de tallo erecto, que con el tiempo tienden a desarrollarse pegada al suelo, puede medir hasta 1m de altura, sus hojas están compuestas con 7 folíolos de forma lanceolada; las flores tienen forma de estrella y sus pétalos están fusionados; el color de la flor puede ser blanco, rosado o violeta con el centro amarillo. En los tallos subterráneos se producen los tubérculos, que pueden ser de forma oval, redondeada o claviforme, esta es la parte comestible el tallo subterráneo y un reservorio de energía para la planta. Es una especie autógama pese a que posee individuos altamente heterocigotos, su fruto es una baya verde pequeña que tiene forma semejante a un tomate. Los tubérculos están cubiertos por una “exodermis” que aparece al romperse la “epidermis” que va engrosándose con el tiempo. Sobre la superficie existen “ojos” (que son orificios por donde brotan raíces y tallos de planta) o hundimientos en forma helicoidal. Además, hay orificios que permiten la respiración, llamados lenticelas (Román y Hurtado, 2002).

2.1.2. Ubicación taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Solanales

Familia Solanacea

Género: *Solanum*

Especie: *S. tuberosum*

2.1.3. Variedades

En el mundo se cuenta con una gran cantidad de variedades, las cuales se pueden dividir en industriales, para consumo fresco y variedades llamadas finas. En nuestro país existe un importante número de variedades entre las que destaca la Alpha, que se utiliza en el 44% de la superficie nacional cosechada y más de la mitad de la producción total del país; además de que se cuenta con otras como la Atlantic, Gigant, Criolla, Mondial, entre otras (SAGARPA-ASERCA, 1998).

La papa se puede clasificar de acuerdo con su uso en tres diferentes variedades:

- a). Variedades industriales: Se caracterizan por su alto contenido de féculas (alrededor del 20 por ciento); son resistentes al frío y a las enfermedades, generalmente tardías; la pulpa está formada por células grandes y de color blanco.
- b). Variedades de gran consumo: Tienen la pulpa blanca formada por células pequeñas, son utilizadas tanto en la alimentación humana como en la de algunos animales domésticos, también se emplean para la extracción de fécula.

c). Otras variedades consideradas como finas tienen la pulpa amarilla y está formada por células pequeñas y apretadas, suelen ser precoces y de rápido desarrollo (SIAP, 2008).

2.1.4. Siembra de la papa

Las plantas de papa prefieren un suelo de tipo arenoso, fértil y ácido (pH de 5.0 a 5.5). No se recomienda modificar el suelo con cantidades grandes de estiércol y otros tipos de materia orgánica. La adición de materia orgánica puede incrementar la incidencia de la sarna. Esta enfermedad también es un problema en suelos alcalinos o “dulces”. Se recomienda comprar papas certificadas libres de enfermedades. Generalmente las papas que sobran de la cosecha del año anterior pueden transmitir enfermedades no visibles. Antes de la siembra (en invernadero), se deben cortar los pedazos con un cuchillo filoso, y cada uno de ellos debe contener al menos 2 ojos, los pedazos de papa son propensos a descomponerse en suelos frescos y húmedos, para prevenir esto, se tratan los pedazos cortados con un fungicida o se almacenan a una temperatura de 60 a 70 °F a humedad relativa alta por varios días. Esto permite que la superficie cortada se cure antes de sembrarse, lo cual reduce las pérdidas ocasionadas por el deterioro de las semillas. Las papas pequeñas se pueden sembrar enteras. La siembra de papas es en algunos lugares en otoño. Se siembran los pedazos de papa y papas pequeñas enteras a una distancia de un pie en un surco a una profundidad de 4 a 3 pulgadas, debe haber una distancia de 2 a 3 pies entre las hileras (Hynes, 2000).

Superficie Sembrada

En México se siembran aproximadamente 65 mil hectáreas, de las cuales Sinaloa ocupa el segundo lugar en cuanto a superficie con un total de 12 mil hectáreas, tan solo por debajo de Sonora, quien siembra aproximadamente 13.5 hectáreas, con un total de 300 mil toneladas.

Aunque la papa es originaria de América, actualmente ésta se cultiva en todo el mundo y en muchos países es el alimento básico, como lo es el arroz, el maíz o trigo. Los principales países productores son China, Rusia, India, Ucrania, Estados Unidos y Polonia. Rusia es el país con mayor superficie cultivada, ocupando el 30% del total mundial dedicado a este cultivo, seguido de China, Ucrania, India, Polonia y Estados Unidos, que en conjunto aportan en 76% del total de la producción (SIAP, 2008).

2.1.4.1. Monocultivo

Un monocultivo se refiere a la plantación o reproducción de una sola especie de plantas en un terreno que puede o no ser delimitado. Este sistema de cultivo a largo plazo disminuye los nutrientes del suelo erosionándolo, lo cual debilita al mismo permitiendo la entrada de organismos patógenos que llegan a causar una enfermedad, este tipo de problema se presenta con gran severidad en los cultivos de papa, ya que es recomendable dejar un tiempo de 3 a 4 años entre ciclos de producción, es por ello que enfermedades como la roña de papa, entre otras enfermedades, son tan severas en algunos lugares (Shiva, 1994).

2.1.5. Importancia del cultivo de la papa

2.1.5.1. Nutricional

Según la FAO, aunque depende de la variedad cultivada, el tubérculo se compone básicamente de 72-75% de agua, 16-20% de fécula en forma de almidón, 2.0-2.5% de sustancias nitrogenadas, 0.15% lípidos y 1.0-1.8% de fibra dietética como celulosa. Otro compuesto contenido en el tubérculo es la solanina, producida en pequeñas cantidades (menos de 0.2 mg/g de producto). En general, la papa es un alimento rico en carbohidratos, ya que tiene un alto contenido de almidón, el cual conforma el 80% de la materia seca. A través del consumo de papa hay una importante contribución de proteínas y minerales como el hierro y el fósforo, y de otras vitaminas como las de complejo B, de gran importancia en la nutrición del ser

humano. La papa cruda es muy toxica por la solanina lo cual se pierde al momento de la cocci3n al igual que se pierde cierto contenido de la vitamina C. La solanina aumenta con la exposici3n a luz solar d3ndole a la papa un sabor muy desagradable y amargo el cual se mantiene incluso despu3s de la cocci3n.

2.1.5.2. Econ3mica

La producci3n de papa en los pa3ses desarrollados, especialmente en Europa y en la Comunidad de Estados Independientes, ha disminuido en promedio un 1 % al a3o en los 3ltimos 20 a3os. Sin embargo, la producci3n en los pa3ses en desarrollo ha aumentado a una tasa promedio del 5% anual. Los pa3ses Asi3ticos, en particular China y la India, han impulsado este crecimiento. En 2005, la participaci3n de los pa3ses en desarrollo en la producci3n mundial de papa fue del 52 por ciento, con lo que super3 la del mundo desarrollado. Hace 20 a3os los pa3ses en desarrollo apenas produc3an poco m3s del 20%. Aun as3, hoy en d3a la producci3n y el consumo mundial de papas crece a tasas inferiores que la poblaci3n. El consumo de papas frescas, que antes era como se utilizaba b3sicamente este producto, est3 disminuyendo en muchos pa3ses, sobre todo en las regiones en desarrollo. Actualmente se elaboran m3s papas para satisfacer una demanda en aumento de las industrias de los alimentos r3pidos, aperitivos y alimentos de f3cil preparaci3n. Las principales razones de esta tendencia son el crecimiento de la poblaci3n urbana, el aumento de los ingresos, la diversificaci3n de la alimentaci3n y el tiempo necesario para preparar el producto fresco para el consumo (SIAP, 2008).

2.1.6. Problem3tica econ3mica

Por lo general, en M3xico las papas se consideran un producto voluminoso, perecedero y cuyo transporte es costoso, con poco potencial de exportaci3n, que se limita mayormente al comercio transfronterizo. Estas limitaciones no han obstaculizado el comercio de la papa, que se ha duplicado en volumen y cuyo valor

casi se ha cuadruplicado desde mediados del decenio de 1980. Este crecimiento se debe a la demanda internacional sin precedentes de productos elaborados, en particular productos de papas congeladas y papas deshidratadas. Hasta hoy, los países en desarrollo no se han beneficiado de este crecimiento comercial. El comercio internacional de papas y productos de papa sigue siendo inferior a la producción, ya que sólo un 6% de la producción nacional llega al mercado internacional. El elevado costo del transporte, así como el de la refrigeración, son importantes obstáculos para ampliar el comercio internacional de este producto. La gran demanda mundial lleva a productores a intentar explotar al máximo la producción de este tubérculo, lo cual se maneja como un monocultivo, acarreando serios problemas entre ellos enfermedades derivadas del aumento de la densidad de microorganismos en la rizosfera que rodea a la planta (SIAP, 2008).

2.1.7. Distribución y comercialización

Los mecanismos de comercialización en nuestro país se llevan a cabo dependiendo de la región donde se produzca, la organización de los productores, el tamaño de las unidades productivas y de la infraestructura para almacenaje con que se cuente. En Sinaloa, una gran parte de los productores cuentan con grandes bodegas en las distintas centrales de abasto del país, lo que les permite comerciar directamente el producto. Los que no tienen bodegas envían directamente su producto a las centrales de abasto en donde previamente se fija el precio. La industria compra directamente a los productores bajo el esquema de agricultura por contrato; lo mismo ocurre en toda la zona norte del país. En el Estado de México el mediador es fundamental. Los medieros comparten la mitad de los gastos de producción, pero también les corresponde la mitad de las ganancias, bajo este esquema, los productores o medieros venden directamente en las centrales de abasto con base en un contrato previo; en éste se establece el precio de venta y las condiciones de la hortaliza; también se vende utilizando el mecanismo de oferta y demanda para fijar el precio en las centrales de abasto. Igualmente existen los intermediarios, los cuales

compran a pie de parcela el producto y después ellos lo venden en las centrales de abasto o pequeños mercados. En general, la comercialización empieza cuando la producción es llevada a los centros de abasto, ya sea por los propios productores o por los intermediarios que la adquieren a pie de parcela. Después de la central de abasto, se distribuye a los diferentes mercados, tianguis y centros comerciales. Para que finalmente la adquiera el consumidor final (SIAP, 2008).

2.1.8. Norma Oficial Mexicana para la comercialización de la papa

2.1.8.1. Inocuidad

NOM-012-FITO-1996

Establece la cuarentena exterior para prevenir la introducción de plagas de la papa.

NOM-025-FITO-2000

Para el establecimiento de zonas bajo protección y zonas libres de plagas cuarentenadas de la papa.

NOM-040-FITO-2002

Requisitos y especificaciones para la producción y movilización nacional de papa comercial.

NOM-041-FITO-2002

Requisitos y especificaciones fitosanitarias para producción de material propagativo asexual de papa (Diario oficial de la federación).

2.1.8.2. Calidad

NMX-FF-022-SCFI-2002

Esta Norma Mexicana establece las especificaciones mínimas de calidad que deben cumplir los tubérculos de papa *S. tuberosum* (L.), en todas la variedades cultivadas, para ser cultivadas en estado fresco y en territorio nacional después de su acondicionamiento y envasado (Diario oficial de la federación).

2.1.9. Enfermedades de que afectan al cultivo de la papa

Existen muchas enfermedades que pueden atacar a la papa, las cuales pueden ser causadas por bacterias, hongos, nemátodos, entre otros, esto debido a que el tubérculo está en contacto directo con la rizosfera, la cual es albergue de millones de microorganismos, tanto patógenos como benéficos.

2.1.9.1. Producidas por hongos

- Sarna polvorienta

Organismo causal: *Spongospora subterranea* (Wallr.) Lagerh. f.sp.

- Costra negra o rizoctoniasis

Organismo causal: *Rhizoctonia solani* (Khün)

- Marchitez por *Verticillium* o verticiliosis

Organismo Causal: *Verticillium* spp. Reinke and Berth.

- Tizón tardío

Organismo Causal: *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary

- Tizón Temprano o mancha negra de la hoja

Organismo causal: *Alternaria solani* (Sorauer)

- Cenicilla, Oidiosis

Organismo causal: *Erysiphe cichoracearum* (D.C. ex Merat.)

2.1.9.2. Producida por virus

- Enrollamiento, enrollado de las hojas

Agente Causal: *Potato leafroll Virus* (PLRV)

- Mosaico rugoso

Agente causal: *Potato Virus Y* (PVY)

- Mosaico Latente o mosaico suave

Agente causal: *Potato Virus X* (PVX)

- Amarillamiento de venas de la papa

Agente causal: *Potato Yellow Vein Virus* (PYVV)

2.1.9.3. Producidas por bacterias

- Pudrición blanda

Organismo causal: *Erwinia carotovora* Var. *Carotovora* Dye

- Moco o dormidera

Organismo causal: *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabunchi *et al.*

Existen otros microorganismos como los fitoplasmas los cuales causan la punta morada en papa.

2.2 Sarna común de la papa (SCP)

Organismo causal: *Streptomyces* spp. (Thaxter) Waksman and Henrici.

La sarna es una enfermedad del tubérculo que se encuentra en casi todo el mundo donde se cultiva papa, menos donde el suelo es muy ácido. Los tubérculos son los más afectados y los síntomas más comunes son: Pústulas o lesiones levantadas de forma circular, aspecto corchoso, color marrón y entre 5-10 mm de diámetro en la superficie de los tubérculos, las pústulas pueden unirse y formar superficies afectadas más grandes, lesiones hundidas o cavidades semi profundas (0.5 a 1 cm), lesiones necróticas en forma de figuras poliédricas y/o lesiones necróticas de forma reticular o estrellada, los diferentes síntomas que muestran los tubérculos de papa están asociados a la tolerancia o susceptibilidad de las variedades. Los síntomas pueden cubrir el 100% de la superficie de los tubérculos afectados. No se han observado síntomas en el follaje, pero experimentalmente se ha obtenido infección en hojas de papa y otras plantas (Hooker, 1981).

Los tubérculos semillas infectados no están considerados como la fuente principal de infección. Estudios realizados determinaron que no existe correlación entre la severidad en los tubérculos de una nueva progenie y el inóculo del tubérculo semilla, en todo caso, sólo se produce una ligera infección cuando se usa semilla infectada (Adams y Hide, 1981). Los tubérculos se infectan principalmente por el inóculo presente en el suelo y esto se produce después de tres años de sembrar tubérculos infectados (Pavlista, 1996. Fischl, 1990).

Análisis genéticos recientes han postulado un mecanismo común de patogenicidad en actinomicetos. Este mecanismo involucra varios genes de virulencia asociados incluyendo a los relacionados en la biosíntesis de taxtomina (*txtAB*). La taxtomina se encuentra involucrada en la inhibición de la síntesis de celulosa e induce los síntomas de la SCP a través de la necrosis y de la hipertrofia. Otro de los genes involucrados es *nec1* que codifica una proteína que participa en la necrosis y se ha

comprobado que existe una fuerte correlación entre la producción de taxtomina y la presencia de *nec1* en cepas patogénicas (Lazarovits *et al.*, 2007).

2.2.1. Ciclo de vida de *Streptomyces* spp.

Streptomyces es un microorganismo poco común que tiene una forma de crecimiento similar a los hongos filamentosos. Sin embargo, sus filamentos son mucho menores que las hifas de estos hongos. Este actinomiceto sobrevive en el suelo en forma de esporas y en el tejido infectado, se propaga a través del agua, el material vegetal infectado, y que puede ser levantado por el viento. *Streptomyces* infecta los tejidos jóvenes (como los tubérculos en desarrollo) directamente y obtiene acceso a mayores tejidos a través de heridas y aberturas naturales, también produce una toxina, y una vez que ha entrado en el tubérculo crece tanto que entre las células de la epidermis genera la formación de múltiples capas de corchosas, que se traduce en la aparición de costras de las lesiones (Lehtonen *et al.* 2004). En la figura 1 podemos observar el ciclo de vida desde el momento de infección hasta la generación de hifas y esporas.

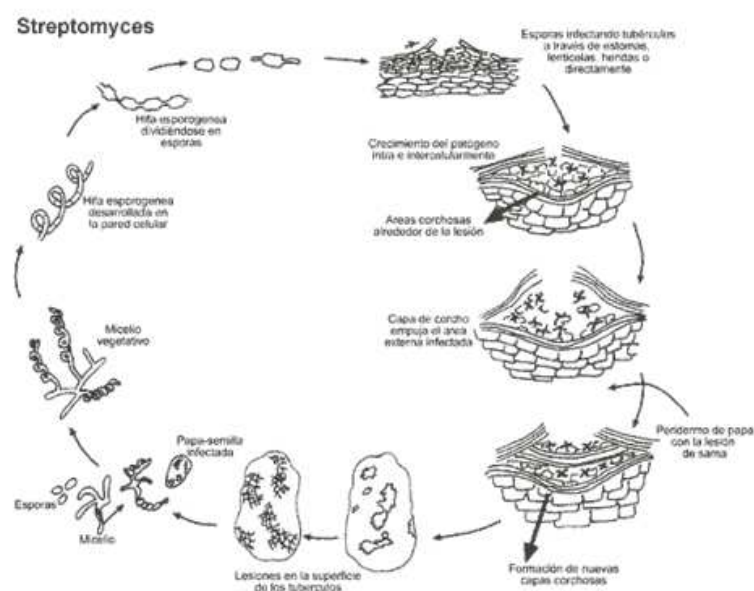


Figura 1. Ciclo de vida de *Streptomyces* spp.

2.2.2. Morfología del cultivo *in vitro*

En 1989 Lambert y Loria observaron a *Streptomyces scabies* y *Streptomyces acidiscabies* los cuales presentan las siguientes características:

Las dos especies son Gram-positivas. En cultivos de laboratorio, vistas las placas por el reverso, las colonias son de color amarillento, rojizo o blanquecino de acuerdo al medio de cultivo usado y la especie de bacteria presente. Las colonias son de crecimiento lento, pero con el tiempo van desarrollando un sobre crecimiento aéreo a manera de micelio ramificado, de color plomo y aspecto pulverulento que contiene masas de esporas.

En medio de cultivo Agar-Tirosina (AT), las colonias producen el pigmento melanina. La especie *S. scabies* muestra cadenas de esporas en forma helicoidal, mientras que *S. acidiscabies* muestra cadenas de esporas en forma flexuosa. Por otro lado, *S. acidiscabies* se desarrolla en suelos ácidos en pH de 4.5 y *S. scabies* en suelos con pH 5.2 a 7. *S. scabies* produce dos fitotoxinas, taxtomina A y taxtomina B (Loria *et al.*, 1997).

2.2.3. Tipos de control o manejo de la enfermedad

2.2.3.1. Químico

Para el control químico de esta enfermedad actualmente se utilizan productos que atacan o previenen infecciones o infestaciones fungosas, como es el caso de MANCOZEB el cual está en el grupo de los ditiocarbamatos. Mancozeb es un fungicida que actúa como una película de protección en la semilla de papa, impidiendo o disminuyendo el ataque de hongos a la semilla, su accionar se basa en la alteración de la respiración celular del agente patogénico, interrumpiendo ciertos procesos metabólicos (Protección de cultivos, información técnica).

Otro tipo de control químico que se ha utilizado para la sarna común de la papa es el uso de bromuro de metilo, el cual es un contaminante altamente residual y no se recomienda usarlo (International Standards For Phytosanitary Measures).

2.2.3.2. Cultural

Haynes *et al.*, 2003 recomiendan realizar las siguientes prácticas culturales:

- Usar como semilla tubérculos sanos, procedentes de campos sanos.
- Rotar el cultivo con maíz, trigo, cebada, alfalfa.
- Evitar las rotaciones con plantas hospedantes como: remolacha, betarraga, zanahoria y trébol rojo. *S. acidiscabies* no sobrevive en plantas no hospedantes.
- Mantener el pH del suelo entre 5 a 5.2, utilizando fertilizantes que producen acidez como el sulfato de amonio, especialmente para controlar *S. scabies*
- Evitar o limitar las aplicaciones de estiércol de ganado vacuno en suelos infestados. El estiércol mantiene la sobrevivencia del patógeno y favorece el desarrollo de *S. scabies*.
- Mantener la humedad del suelo, al nivel de capacidad de campo, desde el inicio de la tuberización hasta 6 semanas después.

2.2.3.3. Control biológico

El control biológico es una herramienta útil para tratar de erradicar o controlar plagas en suelos agrícolas, más cuando los microorganismos que utilizamos pueden darle cierto beneficio al suelo o a las mismas plantas. Lo podemos definir de forma generalizada con el concepto enunciado por Baker y Cook (1974) hace más de 30 años, según estos autores se entiende por control biológico la reducción de la densidad o de las actividades inductoras de enfermedades de un patógeno o parásito, en su estado activo o latente, lograda de manera natural o a través de la

manipulación del ambiente, del hospedante o de antagonistas del patógeno o plaga que se quiere controlar.

Otra definición sería: la utilización de microorganismos antagonistas para el control de enfermedades, entendiéndose por antagonistas, aquellos organismos que interfieren en la supervivencia o desarrollo de los patógenos. Por ello es muy importante que éstos colonicen el cultivo en el número necesario y en el momento adecuado. Esto no es obligatorio así si no intervenimos para asegurarlo; la colonización puede ser demasiado tardía o ser insuficiente y corregir esa situación puede implicar la modificación tanto del hábitat agrícola como el no-agrícola asociado. Antes de finalizar el siglo XX ya había una clara conciencia, avalada por varias estimaciones, de que las pérdidas de cosecha por la acción de plagas, enfermedades y malas hierbas habían aumentado en la segunda mitad del siglo a pesar de haber multiplicado por diez el empleo de productos fitosanitarios. También se había anunciado repetidamente la necesidad de introducir criterios de sostenibilidad en las prácticas agrícolas, incluidos aquellos criterios tendentes a disminuir sus impactos en el medio ambiente. De ello se derivó en la misma época una creciente actividad de investigación científica, basada fundamentalmente en la ecología, orientada a conocer mejor, por una parte, nuestros agrosistemas y, por otra, a aumentar la eficacia de métodos de control distintos al uso de plaguicidas (Arnó, 2005).

2.3. Antagonistas usados en el control biológico de patógenos de plantas

Existe un grupo importante de hongos y bacterias que presentan efectos antagónicos contra otros microorganismos y esta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos vegetales. Entre los microorganismos más importantes que se han utilizado para el control biológico se encuentran las bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y hongos de los géneros *Gliocladium*, *Fusarium* y *Trichoderma*. Este último es el más utilizado para

el control de un grupo importante de patógenos del suelo. En la naturaleza existe una interacción continua entre los patógenos potenciales y sus antagonistas, de forma tal que estos últimos contribuyen a que en la mayoría de los casos no se desarrolle la enfermedad. En condiciones naturales los microorganismos están en un equilibrio dinámico en la superficie de las plantas (Larrea., 2001).

2.3.1. Mecanismos mediante los cuales los antagonistas ejercen su acción

No es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los patógenos sobre la planta. En general los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de modos de acción no es una característica a seleccionar en un antagonista. Se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas para controlar el desarrollo de fitopatógenos. Estos son: antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo, lisis enzimática), e inducción de resistencia (Cook and Baker, 1983).

2.3.1.1. Antibiosis

Se refiere a la producción de sustancias tóxicas por parte de un microorganismo contra otros microorganismos, las cuales actúan en bajas concentraciones (menores a 10 ppm). La antibiosis es el mecanismo de antagonismo más estudiado entre microorganismos (Larrea, 2001).

2.3.1.2. Competencia

Se puede definir competencia como el desigual comportamiento de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. Un factor

esencial para que exista competencia es que haya "escasez" de un elemento, si hay exceso no hay competencia. La competencia más común es por nutrientes, oxígeno o espacio. Existen dos tipos de interacciones directas entre los antagonistas y los patógenos ellas son el parasitismo y la predación. (Larrea, 2001).

2.3.1.3. Parasitismo

El término parasitismo se refiere al hecho de que un microorganismo entre o penetre a otro. Puede ser definido como una interacción antagónica entre organismos. El parasitismo consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. Generalmente se ven implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas, b-1-3-glucanasas y proteasas que lisan o digieren las paredes de los hongos (Meligarejo, 1989; Ulhoa, 1996).

2.3.1.4. Predación

En el caso de la predación el antagonista se alimenta de materia orgánica entre la cual ocasionalmente se encuentra el patógeno. No ha sido un mecanismo de acción muy importante en el desarrollo de agentes de biocontrol. Los reportes más conocidos citan la presencia de amebas en suelos supresores de enfermedades las cuales se alimentan de las hifas (cuerpos) de hongos patógenos entre otras fuentes de alimento (Campbell, 1989).

2.3.1.5. Inducción de resistencia a la enfermedad

Las plantas presentan mecanismos bioquímicos y físicos o estructurales de resistencia endógena regulados genéticamente. Se puede inducir resistencia en plantas mediante el uso de diferentes inductores como bajas dosis de luz ultravioleta, compuestos naturales de las plantas como quitosano (producto de la de

acetilación de la quitina), y también mediante el uso de microorganismos antagonistas. (Larrea, 2001).

2.3.2. Estudios con microorganismos antagonistas

- Control biológico de la sarna común de la papa en campo con antagonistas de *Streptomyces Scabies*.

Liu *et al.* (1995) llevaron a cabo el control de la sarna de la papa utilizando dos cepas supresivas de *Streptomyces* (cepas PonR y PonSSII) en cuatro años de experimentos. La cepa supresora fue cultivada en una base de caldo de harina de avena y mezclada con suelo y vermiculita que favoreciera formación de sarna en 1, 5, y 10% (v/v). Los tratamientos correspondientes del 1 al 5 y con 10% se utilizaron para ver el porcentaje de sarna y el control de la infección y los controles sin antagonistas se dispusieron para investigar la dilución y efecto de los nutrientes en el control de la sarna. Ambas cepas disminuyeron significativamente la sarna en los tubérculos de papa en comparación con el tratamiento sin antagonistas. En el primer año de esfuerzo de supresión del nivel de infección, el 1% no fue significativamente diferente al control de la sarna de los niveles de 5 y 10%. No se observaron diferencias consistentes en el nivel de control de la enfermedad proporcionada por las cepas PonR y PonSSII. Para la primera cepa, el control de la enfermedad después de la inoculación aumentó cada año en el nivel del 1%, mientras que el control de la enfermedad con la inoculación de un 10% se mantuvo constante. Los efectos de la dilución en caldo de cultivo de nutrientes de avena al 10% fue la reducción de la sarna significativamente durante los primeros 2 años, pero no en los últimos dos años. La cepa supresora no afectó el rendimiento del tubérculo y se aislaron nuevamente de los tubérculos cultivados en suelo inoculado en los cuatro años del experimento.

- *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento *Capsicum annuum* (L.)

En los ensayos de control biológico en pimiento ejercido por *Trichoderma harzianum* (T.h.) sobre *Phytophthora capsici*, agente causal de la podredumbre de pimiento, se ha optimizado la producción de la biomasa del antagonista *T. harzianum* al comparar su desarrollo en tres diferentes medios y soportes de cultivo. El método de producción de la biomasa de *T. harzianum* en Agua-Avena-Vermiculita resultó ser el más rentable por su rápido y abundante crecimiento, viabilidad y bajo costo para utilizarlo como inóculo del suelo, al compararlo con los crecidos en Czapek líquido y PDA (Papa Dextrosa Agar). La prueba del antagonismo *in vitro* contra *T. harzianum* en medio PDA enriquecido con Laminarina-glucosa (3:1, v/v), mostró que *T. harzianum* aumentó los niveles de enzimas hidrolíticas β -1,3- glucanasa (lisis enzimática), ejerció una mayor competencia por espacio y nutrientes e interactuó directamente con el patógeno (micoparasitismo), todo esto juega un papel importante en la reducción y destrucción del patógeno. El filtrado del medio PDA donde se había cultivado *T. harzianum* afectó al crecimiento de las radículas de las semillas *in vitro*. En ensayos *in vivo* las plantas crecidas a partir de semillas tratadas mostraron un peso seco mayor a las plantas testigo. En conclusión, el tratamiento con *T. harzianum* fue capaz de reducir hasta un 65% la “tristeza” causada por el patógeno en plantas de pimiento (Mohammed *et al.*, 2004).

- *Bacillus spp.*, como Biocontrol de *Fusarium spp.*, *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el Desarrollo y Rendimiento del Cultivo de chile *Capsicum annuum* (L.)

Guillén *et al.*, 2006 dieron a conocer el potencial del biocontrol de cuatro aislados de *Bacillus* y la mezcla de éstos (B1, B3, B9 y B13) sobre los patógenos causantes de pudriciones de raíz en campo, así como su efecto en el desarrollo y rendimiento de cultivo de chile. La aplicación de las bacterias incrementó la altura de planta en 20%

y el rendimiento al final del cultivo mejoró 2.7 veces. Además que la severidad de pudrición de raíz se redujo en 39% respecto al testigo. La identificación molecular de los bacilos se realizó por pruebas bioquímicas, placas, y por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con oligonucleótidos específicos para el gen ribosomomal 16S. El aislado de *Bacillus* B1 se identificó como *Bacillus amyloliquefaciens*, B3 como *B. lincheniformis* y B9 y B13 como *B. subtilis*. En un árbol filogenético estos *Bacillus* fueron agrupados por separado con otros aislados de la bacteria del mismo género.

2.3.3. *Trichoderma harzianum* (Hartz)

Pertenece a la subdivisión deuteromycotina, siendo un hongo imperfecto que carece de estructuras de reproducción sexual. Estas especies se encuentran ampliamente distribuidos en el mundo, estando presente en casi todos los suelos y hábitat naturales, especialmente los que contienen materia orgánica. Su distribución está asociada a condiciones de pH, temperatura, humedad, materia orgánica y presencia de otros hongos del suelo. Son agentes de biocontrol de fitopatógenos del suelo y de la parte foliar, que pueden degradar una amplia gama de metabolitos secundarios entre ellos, una variedad de antibióticos. Son potencialmente agentes de control biológico. Tienen requerimientos nutricionales mínimos y crecen muy rápidamente con abundante esporulación (Harman *et al.*, 2004.)

2.3.3.1. Morfología

Es un hongo anamorfo perteneciente a la clase *Hyphomycetes*, cuyo estado sexual o telomórfico correspondería a *Hypocrea*, caracterizándose por la formación de peritecios (Alexopoulos, 1996).

Su estructura de esporulación son conidios asexuales, y su estructura de resistencia, clamidosporas, estas son similares a las de otros hongos, siendo cinco a 10 veces

más grandes que los conidios, por sus grandes reservas de lípidos (Cohen *et al.*, 1983). Posee conidióforos erectos o arrastrados, altamente ramificados, más o menos cónicos en los que al final se agrupan en forma de pelotas. Las colonias de esporas son de rápido crecimiento, con micelio compacto y de coloración blanco a verde (Cook, 1983).

2.3.3.2. Requerimientos nutricionales y condiciones óptimas de crecimiento

Para su establecimiento, requieren de humedad entre 87 y 97%, un pH ácido para su buen desarrollo en el suelo, y una fuente de alimentación (materia orgánica con actividad microbiológica alta) (Cook, 1989). Las distintas especies del género *Trichoderma* tiene buen crecimiento frente a un amplio rango de temperaturas. Sin embargo, su óptimo, se sitúa de 15°-35°C. La temperatura máxima se encuentra entre los 30 y 36°C y el pH óptimo entre 3.7 y 4.7 a concentraciones normales de CO₂. Un Potencial osmótico de -40 bares en el medio es tolerado por el hongo (Domsch *et al.*, 1990).

2.3.3.3. Mecanismos de acción

Los mecanismos de acción que utilizaría *Trichoderma* en la planta son: competencia, producción de antibióticos y micoparasitismo. Aunque no todos estos pasos ocurren en una interacción en particular en todos los organismos involucrados, la clave es la transferencia de los nutrientes desde el microorganismo objetivo al micoparásito (Infante *et al.*, 2009).

Según Cook y Barker (1983) la forma de acción de *T. harzianum* es por competencia y predación, enrollando su micelio en las hifas del patógeno blanco evitando el paso de nutrientes y deteniendo su desarrollo. Se ha visto además que hifas susceptibles de los microorganismos blanco son penetradas, siendo vacuoladas, colapsando y siendo finalmente desintegradas. Por lo tanto el daño causado por *Trichoderma* al

microorganismo blanco que es colonizado es severo; altera y degrada la pared celular, desorganiza el citoplasma, retrae la membrana plasmática de la pared, afecta además la replicación celular inhibiendo la germinación de esporas y la elongación del tubo germinativo. Existen también algunas especies y razas de *Trichoderma* capaces de producir antibióticos especialmente a pH bajo (Cook, 1989). Este se puede encontrar dentro de la rizosfera y también fuera de ella, también coloniza y protege las raíces de las plantas.

2.3.3.4. *T. harzianum* como controlador biológico

El hongo comenzó a ser utilizado en 1960 como degradador de celulosa y desde ese momento se ha utilizado en la industria química, textil, alimenticia y la de control biológico. Las razones para utilizar hongos de este género se debe al alto grado de adaptabilidad demostradas por su distribución cosmopolita, en casi todos los suelos del mundo, bajo diferentes condiciones ambientales y su capacidad de utilizar distintos substratos utilizables por su carácter de saprófito (capaz de degradar materia orgánica en descomposición). Esto genera capacidad competitiva. Además, sus mecanismos de interacción con el patógeno y planta, varían dependiendo del patógeno a controlar, de la especie de *Trichoderma* utilizada e incluso del aislado. Todo lo anterior, unido al nivel más bajo de riesgo que representa para los mamíferos y el ecosistema, lo hace uno de los mejores biocontroladores que existen en el mundo. Muchos investigadores destacan sus propiedades como controladores biológicos, de múltiples patógenos de plantas. Esto ha implicado un alto grado de desarrollo tecnológico, que ha dado como resultado en los últimos años la aparición de múltiples formulados comerciales de distintas cepas para el control biológico de enfermedades (González *et al.*, 2005).

2.3.4. *Bacillus subtilis* (Khön)

Señala que la bacteria *Bacillus subtilis* no es potencialmente patógena, no produce endotoxinas y secreta proteínas al medio, algunas de ellas con propiedades antifúngicas, como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las iturinas. Se utiliza industrialmente como insecticida y fungicida. La subtilina liberada por *B. subtilis* actúa sobre la pared celular de los hongos (González *et al.*, 2002).

2.3.4.1. Morfología

Según Gonzales y Fragosó en 2002 *Bacillus subtilis*:

- Corresponde a una bacteria Gram positiva.
- Producen endoesporas, las que son termo resistente y también resisten factores físicos perjudiciales como la desecación, los ácidos y los desinfectantes químicos.
- Muchos bacilos producen enzimas hidrofílicas extracelulares que descomponen polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, permitiendo que el organismo emplee estos productos como fuentes de carbono y donadores de electrones.
- Producen antibióticos y son ejemplo de estos la bacitracina, polimixinina, tirocidina, gramicidina y circulina.
- Son fermentativas, usualmente fermentan caseína y almidón.

2.3.4.2. Requerimientos nutricionales y condiciones óptimas de crecimiento

Son el género más abundante en los suelos vírgenes. Los bacilos en general crecen bien en medios sintéticos que contienen azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes, etc., como las únicas fuentes de carbono y el amonio como una única fuente de

nitrógeno. Viven dentro los límites de temperatura de 55 a 70°C , el límite inferior de pH para el género *Bacillus* es de 2 a 3 (Gonzales *et al.*, 2002).

2.3.4.3. Mecanismo de acción

Sumando al antagonismo, la competencia y la liberación del contenido celular, *B. subtilis* también ha demostrado inducir la resistencia sistémica natural de la planta contra patógenos bacterianos y fungosos, propiedad llamada Resistencia Sistémica Adquirida (Butt *et al.*, 1999).

2.3.4.4. *B. subtilis* como controlador biológico

B. subtilis es conocido por ser antagonista de muchos hongos patógenos vegetales. Este antagonismo es logrado a través de diversos mecanismos que incluyen la competencia por nutrientes; exclusión de sitios, colonización de la bacteria en el patógeno y/o la liberación de componentes celulares durante el crecimiento, para eliminar o reducir los competidores en su medio ambiente inmediato (Butt *et al.*, 1999).

El tratamiento de semillas como los cereales, maíz dulce y zanahorias con suspensiones acuosas, pastas o polvos que contienen a las bacterias *B. subtilis*, han protegido a las plantas contra los patógenos de la raíz y ha dado como resultado un mejor crecimiento y producción de esos cultivos (Agrios, 1997). Cuando varias clases de frutos de hueso, es decir, duraznos, nectarinas, albaricoques y ciruelos fueron tratados, después de haber sido cosechados, con suspensiones de la bacteria antagonista *B. subtilis*, permanecieron libres de pudrición café causada por el hongo *Monilinia fructicola*, cuando menos durante nueve días (Agrios, 1997).

III. JUSTIFICACIÓN

En Sinaloa la sarna común de la papa es uno de los principales problemas para los productores, quienes han recurrido principalmente al control químico, el cual no ha sido suficiente para el control de este patógeno, es por esto que el uso de microorganismos antagonistas es una alternativa para reducir el problema de la sarna común de la papa sin afectar el entorno.

El control efectivo de *Streptomyces* spp. utilizando a *B. subtilis* y *T. harzianum* no está suficientemente probado, además de que al utilizar cepas antagonistas nativas podrían tener mejores resultados de efectividad contra el patógeno en la región.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar a nivel de laboratorio e invernadero la efectividad biológica de *T. harzianum* y *B. subtilis*, en el control de la infección de la sarna común de la papa *Streptomyces* spp.

4.2. Objetivos específicos

- 1.- Aislar e identificar cepas que causan la enfermedad de la sarna de la papa *Streptomyces* spp.
- 2.- Realizar pruebas moleculares para la identificación de la cepa causante de la infección de la sarna común de la papa.
- 3.- Determinar en pruebas de laboratorio el efecto antagonista e inhibitorio de *T. harzianum* y *B. subtilis* vs *Streptomyces* spp.
- 4.- Evaluar en invernadero la efectividad biológica de las cepas de *T. harzianum* y *B. subtilis* con efecto regulador de la sarna común de la papa.

4.3. Hipótesis

El uso de cepas nativas de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* tienen efectividad biológica para utilizarse como agentes de biocontrol contra *Streptomyces* spp., que es el agente causal de la sarna común de la papa, en pruebas de laboratorio e invernadero.

V. MATERIALES Y METODOS

5.1. Aislamiento del patógeno causante de la sarna común

5.1.1. Postulado de Koch

Este postulado indica los siguientes puntos:

1. EL microorganismo patógeno debe aislarse siempre de organismos enfermos y nunca de organismos sanos.
2. Cuando un organismo está enfermo la bacteria debe aislarse en cultivo puro.
3. Si la bacteria se inocula a otro organismo sano debe reproducirse la enfermedad.
4. La bacteria debe aislarse nuevamente en cultivo puro.

Estos consideramos nos sirven para corroborar que tanto en laboratorio y campo se está utilizando el mismo agente patógeno.

5.1.2. Aislamiento de *Streptomyces spp.*

Se realizó un muestreo dirigido, seleccionando muestras de papa con síntomas de la enfermedad y de suelo donde en previos ciclos agrícolas se ha presentado la incidencia de la sarna común de la papa. Se muestrearon cinco puntos dónde se presentó la enfermedad.

El muestreo se llevó a cabo el día 27 de Mayo del 2010, en un lote comercial de cultivo de papa en Guasave, Sinaloa.

Procedimiento

Para el aislamiento de *Streptomyces spp.*, a partir de lesiones de sarna en tubérculos de papa se siguió el método de Lindholm *et al.*, 1997 que consiste en:

1. Lavar los tubérculos de papa con agua corriente

2. Desinfectar los tubérculos con una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante un minuto.
3. Enjuagar con agua destilada estéril.
4. Extraer el tejido color pajizo translúcido que se encuentra inmediatamente debajo de la lesión y macerar en agua destilada estéril (1g/10ml) en un mortero esterilizado.
5. Mezclar 1 ml del macerado con 9 ml de una solución fenol-agua (1:140)
6. Hacer cuatro diluciones de la mezcla.
7. Sembrar 50 µl de cada dilución en medio agar-agua o en medio agar-agua con antibióticos con una espátula de Drigalski e incubar a 28°C durante 7 a 10 días.

Solución stock de antibióticos

Agua destilada	100.0 ml
Nystatina	500.0 mg
Sulfato de polymixina B	50.0 mg
Penicilina sódica (Sodium penicillin G)	10.0 mg
Cycloheximida	500.0 mg

La solución puede ser esterilizada por filtración y almacenada a 5°C a 20°C durante 4 semanas.

8. Purificar los cultivos a partir de una sola colonia en medio AB (agar bacteriológico) y Czapek e incubar a 28°C durante 14 días, al cabo de los cuales se pueden observar el color de las colonias y las características morfológicas del patógeno.

5.2. Bioensayo *in vivo* (patogenicidad de aislados)

La prueba *in vivo* mostró el efecto o daño que ocasionan las cepas aisladas de suelo y tubérculo donde se presentó sarna común de la papa.

La prueba *in vivo* se llevó a cabo de acuerdo a la técnica descrita por Conde y Andreu en 2005, para ello se necesitan semillas de papa libre de patógenos, que pueden ser obtenidas directamente con los productores o en comercializadoras certificadas, una vez que se obtuvieron los organismos, se llevaron al laboratorio de bioinsecticidas y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 10% por 10 minutos, una vez transcurrido ese tiempo se lavaron con agua destilada estéril.

En una campana de flujo laminar se realizaron cortes transversales de las “caras” de papas, de tamaño adecuado para ponerlas en una caja petri la cual cuenta con algodón húmedo con agua destilada estéril, se realizara el corte y se puso en la caja petri, posteriormente se le inocularon las diferentes cepas aisladas por la parte superior, correspondiente a cada tratamiento, se usaron 10 aislados y un control positivo (+) y se incubaron con condiciones controladas (28°C y 90% humedad relativa por 1 mes) para observar el desarrollo de cada inóculo, así como el efecto que tuvieron sobre el tejido vivo.

5.3. Identificación molecular a nivel género

El aislado que generó infección en la prueba *in vivo* se analizó mediante pruebas moleculares de extracción de DNA y PCR con oligonucleótidos específicos (Monclardini *et al.* 2002) para saber el género del mismo.

5.3.1. Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA de los aislados antagonistas se realizó a partir de cultivos en medio de cultivo TS caldo. Se tomaron 1.5 ml del cultivo y se colocaron en un tubo Eppendorf y se centrifugaron a 12,000 rpm durante cinco minutos hasta formar una pastilla, se decantó el sobrenadante y la pastilla se homogenizó en 200 µl de DNAzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA Cat. No. TR 118). El homogeneizado se centrifugó 10 min a 10,000 rpm, se recuperó la fase acuosa y se transfirió a un tubo

nuevo. Se agregaron 200 µl de etanol al 100%, se mezcló por inversión y se dejó incubar durante tres minutos a temperatura ambiente para facilitar la precipitación. Posteriormente, se centrifugó la muestra durante cuatro minutos a 12,000 rpm. El sobrenadante se decantó y al precipitado se le agregaron 100 µl de etanol al 75%, y se centrifugó por tres minutos a 12,000 rpm. Finalmente, se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente y posteriormente se resuspendió en 50 µl de agua destilada estéril.

5.3.2. Electroforesis en gel de agarosa

Se pesaron 0.24 gr de agarosa al 30% y se disolvieron en 30 ml de TAE 0.5X, se calentó para disolver el agar en un matraz de 250 ml. Una vez que se enfría la solución se le adicionaron 0.4 µl de bromuro de etidio. Se vertió en el molde para el gel y se dejó enfriar 30 min, se cargaron la muestra resultante de la extracción de DNA (5 µl). Los productos se visualizaron con luz UV y se fotografiaron los productos de PCR en un fotodocumentador modelo Chemi Doc (BIO-RAD).

5.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se utilizaron los oligonucleótidos P1 y P2 los cuales son específicos para el género *Streptomyces* spp. (Monclardini *et al.*, 2002).

- P1 Sm6F 5'-GGTGGCGAAGGCGGA-3'
- P2 Sm5R 5'-GAACTGAGACCGGCTTTTGA-3'

El tamaño esperado del producto amplificado es de 600 Pb

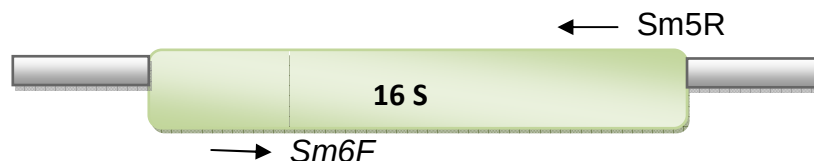


Figura no. 2. Fragmento del gen 16 S amplificado por los oligonucleótidos específicos para *Streptomyces* spp. ≈ 600 pb.

Coctel para PCR (volumen total 50 µl)

Ingrediente	1 reacción
• Buffer 10X Gotaq	10 µl
• dNTP's (10 µM)	1 µl
• P1 Sm6F 0.08 µM	2.5 µl
• P2 Sm5R 0.08 µM	2.5 µl
• Gotaq	0.5 µl
• H ₂ O	32.5 µl
• DNA	1 µl

El programa utilizado en el termociclador (BIORAD) fue el siguiente: un paso inicial a 95 °C por 5 min para desnaturalizar el DNA, 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 65 °C por 45 seg, 72 °C por 1 min, y un paso final de 72 °C por 10 minutos. Una alícuota de los productos de PCR se separó por electroforesis horizontal en gel de agarosa a una concentración de 1%, empleando como marcador de peso molecular se empleó 1 kb plus (Invitrogen, EUA, Cat. No. 15628-019) los productos se visualizaron con bromuro de etidio (0.5 mg/ml) con luz UV y se fotografiaron los productos de PCR en un fotodocumentador de luz ultravioleta modelo Chemi Doc (BIO-RAD).

5.4. Bioensayo *in vitro* (prueba de antagonismo en placa)

El aislamiento inoculado que indujo la sintomatología de la sarna común de la papa, la cuales son heridas acorchadas, estrelladas y oscuras en la orilla (Hooker W. 1981), se retó contra *B. subtilis* y *T. harzianum*, para observar si estos presentan antagonismo contra el agente causal de la sarna común de la papa.

Primero se puso a crecer el aislado de *Streptomyces* spp. en medio Czapek, por 5 días, debido a que esta tarda un poco más de tiempo en desarrollarse que los antagonistas, por otro lado se puso a crecer *B. subtilis* en agar bacteriológico y una semana después *T. harzianum* en medio PDA. Una vez que las tres cepas estuvieron totalmente expandidas en el medio de cultivo se llevaron a una campana

de flujo laminar donde se retaron las cepas colocándolas a los costados de la caja conteniendo agar-agua, con un sacabocados se tomó una muestra de cada cepa retándolos dependiendo del tratamiento correspondiente. Como control se utilizó una cepa donada por la junta de sanidad vegetal de Los Mochis, Sinaloa. El control negativo fue *Streptomyces* spp. sin antagonista, los tratamientos se llevaron a cabo por triplicado en el laboratorio de bioinsecticidas de CIIDIR-Sinaloa. El objetivo fue observar cualitativamente la posible acción antagonista de *B. subtilis* y *T. harzianum* contra *Streptomyces* spp.

5.5. Pruebas de patogenicidad en invernadero

Existen varios métodos para probar la patogenicidad de *Streptomyces* spp. en papa; en este trabajo se utilizó una metodología que consistió en adicionar los antagonistas a tratamientos inoculados previamente con el patógeno. Se tiene que producir esporas en medio agar Czapek y en medio específico para actinomicetos, además contar con tubérculos semilla libre de patógenos. Para favorecer la infección se necesita mantener la humedad del suelo lo más bajo posible durante la tuberización y la temperatura del suelo a 22°C para favorecer el desarrollo de la enfermedad.

5.5.1. Producción de inóculo de antagonistas para pruebas de patogenicidad.

T. harzianum

Para la producción de este hongo filamentoso, fue necesario hacer varias pruebas antes de encontrar un medio adecuado para producir un gran número de esporas evitando la formación de conglomerados en el medio, para posteriormente hacer las diluciones requeridas en la inoculación. En este experimento se tomó como base el trabajo realizado por Chávez-García *et al.* (2008), quienes propagaron al hongo usando un medio hecho con caldo de arroz y agua destilada, al cual se le añadió

sacarosa como una fuente extra de carbono, una vez que se tuvo el medio de cultivo este se inoculó con un ml de un pre-inóculo realizado 24 horas antes, esto se realizó con una exposición permanente de luz a 25° C y una agitación de 110 rpm. De esta manera se obtuvo una concentración de 3.8×10^{10} conidios/ml del cual se partió para realizar diluciones para obtener las concentraciones requeridas 1×10^5 , 1×10^8 y 1×10^{10} esporas/ml.

B. subtilis

Para la propagación de esta bacteria se utilizó el medio básico LB en un litro de agua. Se utilizaron 39 g de medio en polvo SIGMA y se inoculó un ml de un pre inóculo que se generó 24 horas antes en el mismo medio en tubos de ensayo. Se puso en agitación a 120 rpm por 24 horas, hasta alcanzar la producción 1×10^9 UFC/ml. Al finalizar del proceso se obtuvieron las tres concentraciones que se usaron como tratamientos. 1×10^4 , 1×10^6 y 1×10^8 UFC/ml.

5.5.2. Efectividad biológica de *B. subtilis* y *T. harzianum* contra *Streptomyces* spp. en papa

5.5.2.1. Preparación del inóculo de *Streptomyces* spp.

Método de Labruyere

1. Agregar esporas del patógeno desarrolladas en medio líquido o sólido, en una placa conteniendo perlita estéril saturada con una solución nutriente (por litro: 20 g de sacarosa, 1.2 g L-asparagina, 0.6 g K_2HPO_4 , 10g de extracto de levadura)
2. Se incuban las placas a 28°C durante 10 a 14 días, luego se mezclan en una placa de perlita (con abundante esporas y micelio) con 1 Kg de arena.
3. Se pone la arena infestada en una bolsa de plástico (un kilo de capacidad), a la cual previamente se le hacen algunos huecos en la parte inferior para permitir el drenaje, luego se coloca la bolsa dentro de una maceta de plástico con

capacidad suficiente para el desarrollo de los tubérculos. Las bolsas se llenan parcialmente con la mezcla de suelo o de arena. Se ajustaron las bolsas dejando 10 cm del nivel de las macetas para evitar la contaminación durante el riego.

4. Se desinfectaron los tubérculos semilla de papa sanos con hipoclorito de sodio al 0.5% durante 10 minutos, luego se sembraron a 5 cm debajo de la superficie de la mezcla de suelo o de arena.
5. Se regaron las plantas crecidas en la mezcla de suelo con agua corriente y las plantas crecidas en arena con solución nutritiva correspondiente al desarrollo de la planta.
6. Se dio riego al mínimo, para favorecer la infección.
7. Los tubérculos se observaron a través de la bolsa y el desarrollo de la enfermedad puede ser monitoreado durante la prueba.
8. Se cosecharon los tubérculos a las 13 semanas después de la siembra y se evaluó la presencia de lesiones de sarna.

Se observaron las plantas para ver su desarrollo en cada etapa del desarrollo fenológico.

El trabajo se realizó en el invernadero de las instalaciones del BIOTEC SIN de CIIDIR Sinaloa, en el ciclo agrícola de otoño-invierno 2010- 2011.

5.5.2.2. Preparación de inóculo y método de aplicación de *B. subtilis* y *T. harzianum* en invernadero

B. subtilis

Se aplicaron sobre el sustrato de la maceta el medio líquido que contenía a los cultivos de las tres diferentes concentraciones de *B. subtilis*, cuando las plantas estaban ya desarrolladas inicialmente. Con una concentración baja 1×10^4 UFC/ml, una media 1×10^6 UFC/ml y una alta 1×10^8 UFC/ml, utilizando 100 μ l por maceta.

T. harzianum

Se inoculó el sustrato de la maceta con medio líquido que contenía al cultivo a las tres diferentes concentraciones de *T. harzianum*. Una concentración baja 1×10^5 esporas/ml, una media 1×10^8 esporas/ml y una alta 1×10^{10} esporas/ml utilizando 100 μ l l por maceta.

5.5.2.3. Evaluación de variables experimentales en papa (altura de planta, número de tubérculos cosechados, incidencia de sarna común, severidad de la enfermedad)

Se tomó la altura de las plantas cada 15 días, al final del experimento conté el número de tubérculos en cada tratamiento, así como el número de tubérculos enfermos, y se determinó la incidencia de tubérculos con sarna común de la papa. Los valores de las mediciones se analizaron en el paquete estadístico SAS, con un α de 0.05.

La severidad de las lesiones se midió con la tabla de severidad de Hooker (1980) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Escala de severidad de acuerdo a Hooker (1981).

0	no lesiones
1	lesiones superficiales
2	lesiones ligeramente hundidas o elevadas
3	lesiones hundidas o elevadas
4	lesiones profundamente hundidas o elevadas

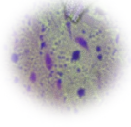
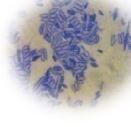
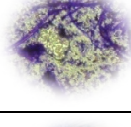
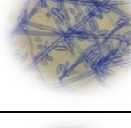
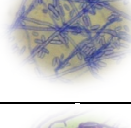
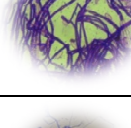
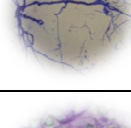
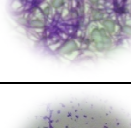
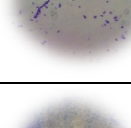
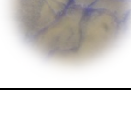
VI. RESULTADOS

Para cumplir con el objetivo 1, el cual es aislar e identificar cepas que causan la enfermedad de la sarna de la papa *Streptomyces* spp. obtuvieron los siguientes resultados.

6.1. Aislamiento de microorganismos de suelo y tejido de papa infectado

En el cuadro 2 se describen las características morfológicas de 10 aislamientos que se obtuvieron de muestras de suelo y tubérculos infectados.

Cuadro 2. CARACTERÍSTICAS MORFOLOGICAS DE LOS 10 AISLADOS

AISLADO	DESCRIPCIÓN	VISTA EN MICROSCOPIO (40x-100x)
1	Colonia color verde militar con poco micelio, abundante esporulación, esporas muy pequeñas y redondas, en microscopio presenta muchas esporas sin formaciones miceliares aparentes.	
2	Bacteria Gram positiva, colonia color rojiza en microscopio presenta gran número de cuerpos bacilares como pequeños granos de arroz que se aglomeran y gran movilidad.	
3	Colonia amarilla, gran producción de micelio, esporulación color café claro y bajo el microscopio se puede apreciar que al interior de cada espора se encuentra un punto color negro o café oscuro.	
4	Colonia color blanco alta producción de micelio sin esporulación, en microscopio podemos observar que no hay esporas, tal vez aun no ha madurado totalmente o no lo produzca.	
5	Color verde micelios largos blancos dentro de ellos se puede apreciar liquido y estos se descomponen en esporas de forma bacilar como granos de arroz pero inflados.	
6	Colonia color amarillenta con producción de una sustancia color rojiza en el microscopio se observan micelios largos y esporas de un tamaño pequeño comparada con otras observaciones.	
7	Colonia color azul con producción de micelio y esporulado blanco, en microscopio se puede observar como el micelio se enancha en algunas partes, posiblemente en la formación de esporas.	
8	Colonia con micelio algodonoso color crema, en el microscopio micelios largos como red entrelazados no presenta esporas.	
9	Colonia rosada con gran expansión, esta presenta en el microscopio gran número de organismos de tipo bacilar, alargadas y planas.	
10	Colonia grisácea con esporulado negro, al microscopio se pueden observar un gran número de esporas esféricas y micelio que se descompone en ellas.	

Se realizó una prueba para inducir la infección en tubérculos de papa y poder observar que aislado generaba la enfermedad en tejido vivo. Se utilizó un control positivo donado por la junta de sanidad vegetal de Los Mochis Sinaloa.

6.2. Bioensayo in vivo

Se realizó un bioensayo utilizando los 10 aislamientos de suelo y el control (+) en tubérculo no infectado, lo cual dio como resultado la selección de un aislado (cepa no. 10), que originó las siguientes características de la enfermedad a las dos semanas de inoculación: ruptura de la epidermis de la papa, así como el acorchado de la zona, además se observaron algunas otras cepas de hongos que colonizaban, pero estos daños no fueron característicos de la sarna común de la papa, la colonia de dichos microorganismos así como su apariencia en el microscopio se ven en la figura 3, las cuales concuerdan con la sintomatología de la enfermedad.

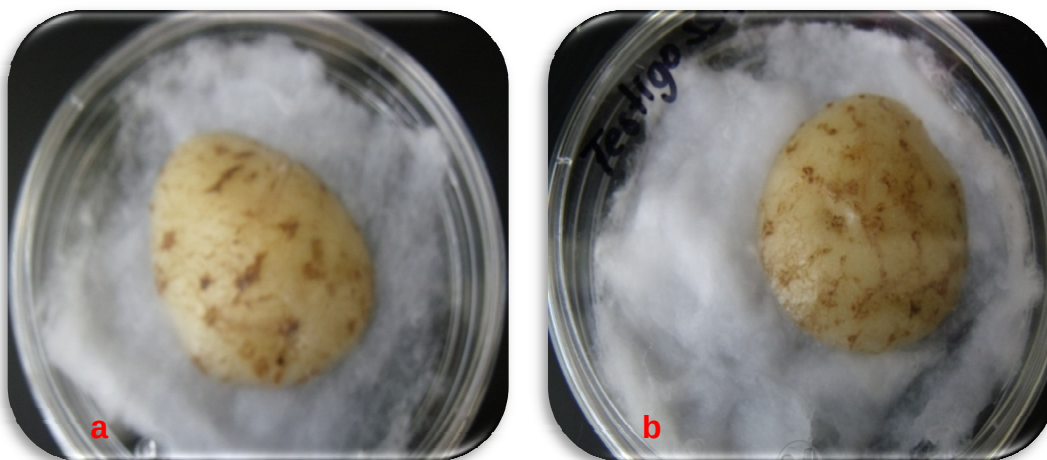


Figura 3. a) Epidermis de papa infectada con *Streptomyces* spp. aislado 10. b) Epidermis de papa infectada con *Streptomyces* spp. (control positivo).

El daño que presenta el tubérculo expuesto al aislado 10 (Figura 3a), fue representativo y característico de la enfermedad de la sarna de la papa, como herida de forma estrellada y aspecto corchoso. En la figura 3b se muestra el control

positivo, el cual presentó lesiones en epidermis similares a las ocasionadas por el aislado No. 10.

6.3. Caracterización a nivel género de *Streptomyces* spp.

6.3.1. Extracción de DNA

La extracción de DNA se llevó a cabo el reactivo DNAzol con el cual se obtuvieron bandas intensas en el gel de agarosa.

En los carriles 1 y 2 de la figura 4 se observa las bandas de DNA genómico obtenido con el reactivo DNAzol, el carril número 3 muestra la escalera de peso molecular de 1Kb.

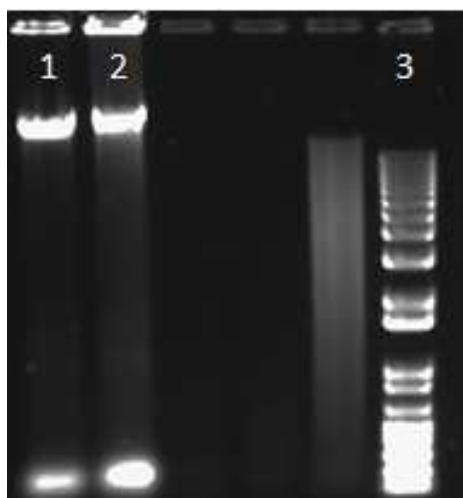


Figura 4. Resultado de la extracción de DNA.

6.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Utilizando los cocteles antes descritos en materiales y métodos se llevó a cabo la reacción de PCR donde utilizamos el juego de oligonucleótidos específicos para *Streptomyces*.

Utilizamos un control positivo con un *Streptomyces* antes secuenciado y uno negativo con agua ultra pura.

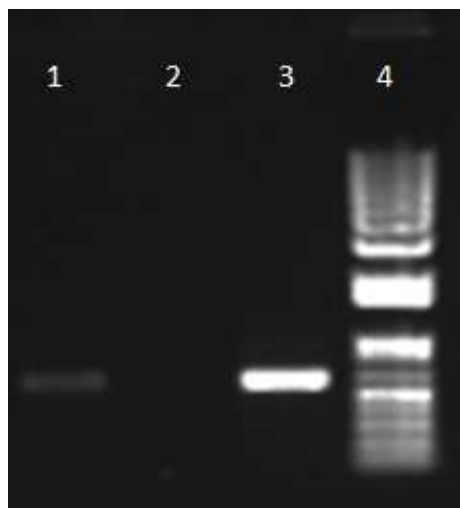


Figura 5. PCR utilizando los oligonucleótidos P1 y P2 específicos para *Streptomyces*. PCR utilizando como templado DNA obtenido del aislado 10, carril 1. (-) PCR utilizando como templado agua destilada (control negativo, carril 2) (+) PCR utilizando como templado DNA extraído de una cepa de *Streptomyces* spp. previamente identificado (control positivo, carril 3) y un marcador de peso molecular en el carril 4.

En la figura 5 podemos observar el resultado del PCR con los oligonucleótidos específicos para *Streptomyces* y con el DNA del aislado 10 (*Strp.*), el cual se obtuvo una amplificación similar a la banda del control positivo.

6.4. Bioensayo in vitro

Para Determinar el efecto antagonista e inhibitorio de *T. harzianum* y *B. subtilis* vs *Streptomyces* spp. se realizó un bioensayo in vitro para evaluar cualitativamente a *T. harzianum* y *B. subtilis* como antagonistas contra *Streptomyces* spp., los resultados que originaron antagonismo positivos contra el patógeno. Fueron llevados a las pruebas de infección en invernadero.

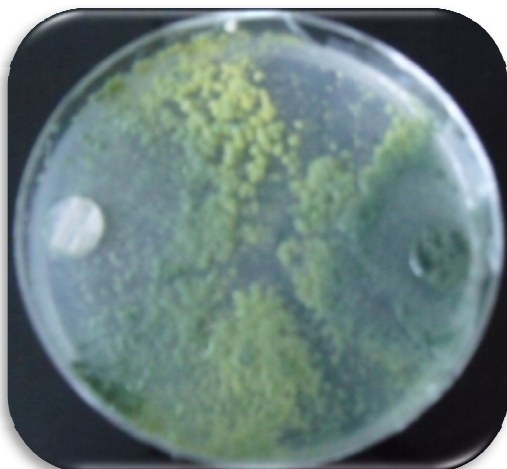


Figura 6: *T. harzianum* mostrando antagonismo vs *Streptomyces* spp.



Figura 7: *B. subtilis* limitando el espacio de crecimiento de *Streptomyces* spp.



Figura 8: Control (+) *Streptomyces* spp.

Las pruebas de antagonismo *in vitro* con crecimiento de *T. harzianum* y *B. subtilis* mostraron un efecto antagónico alto contra *Streptomyces* spp. (Figura 6 y Figura 7). Los antagonistas compitieron también entre sí (Figura 8). Se aprecia también que la acción de estos dos microorganismos puede ser por competencia de espacio y fuente de alimentación, ya que no se observó un halo de inhibición entre las colonias típico de antibiosis, cabe mencionar que *T. harzianum* compitió por espacio en la caja con *B. subtilis* por lo que se concluye que la utilización combinada de estos dos microorganismos no es un tratamiento adecuado para combatir a dicho patógeno, lo

cual ya había sido reportado por Cubedo-López (2008) en chile y tomate con el hongo *Fusarium oxysporum*.

6.5. Resultados de la medición de variables evaluadas en invernadero

En el cuadro 3 se muestran los valores correspondientes a cada variable evaluada, mientras que en la figura 9 se ven los mejores resultados de las mismas. Cepa 1 (C1), Cepa 2 (C2) y Cepa 3 (C3) de cada microorganismo.

Cuadro 3. Medidas de variables medidas en invernadero

TRATAMIENTO	ALTURA	No. DE TUBÉRCULOS	INCIDENCIA %	SEVERIDAD
C1 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁴	25	7	8.33	1
C1 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁶	31.33	21	43.6	1
C1 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁸	29	14	19.44	1
C2 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁴	31	18	46.19	2
C2 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁶	30	21	30.37	1
C2 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁸	32.67	6	16.67	1
C3 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁴	32.33	21	16.67	2
C3 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁶	32.33	23	45.24	2
C3 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁸	31.33	33	0	0
C1 <i>T. harzianum</i> 1x10 ⁵	24.67	7	8.33	1
C1 <i>T. harzianum</i> 1x10 ⁸	25.67	7	16.67	1
C1 <i>T. harzianum</i> 1x10 ¹⁰	26	9	5.56	2
C2 <i>T. harzianum</i> 1x10 ⁵	27	6	16.67	1
C2 <i>T. harzianum</i> 1x10 ⁸	25.33	8	6.67	2
C2 <i>T. harzianum</i> 1x10 ¹⁰	25	9	16.67	2
C3 <i>T. harzianum</i> 1x10 ⁵	25	5	0	0
C3 <i>T. harzianum</i> 1x10 ⁸	24	10	13.33	2
C3 <i>T. harzianum</i> 1x10 ¹⁰	29.33	16	56.94	2
<i>B. subtilis</i> 1x10 ⁸	32	14	0	0
<i>T. harzianum</i> 1x10 ¹⁰	24.67	7	0	0
<i>Streptomyces</i> spp. 3x10 ³ esporas /kg (+)	27	20	100	3
Control (-)	27.33	8	0	0

Letras iguales significa que no hay diferencia significativa entre tratamientos

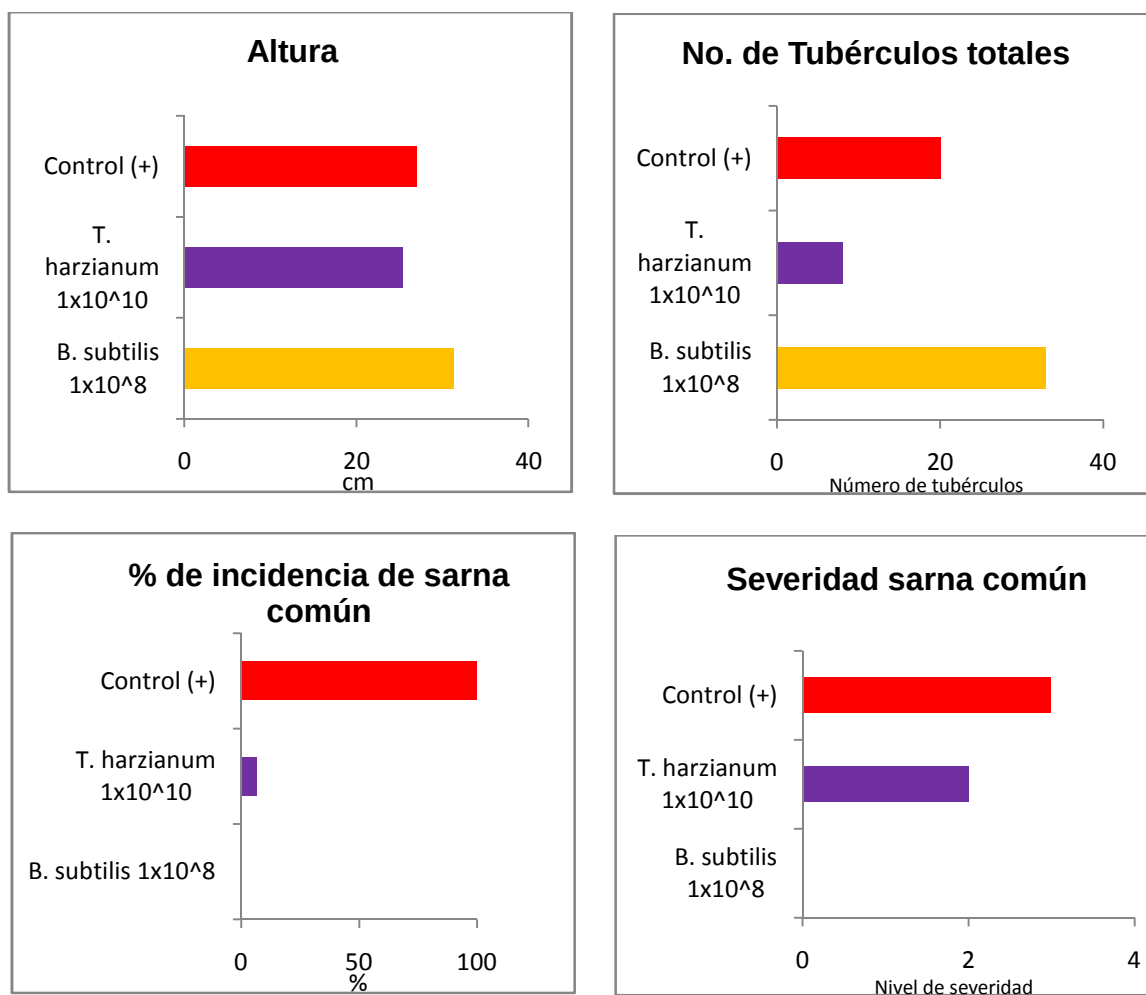


Figura 9. Mejores resultados de las variables evaluadas, en cepas comerciales de *B. subtilis* y *T. harzianum* contra *Streptomyces* spp. agente causal de la sarna común de la papa.

6.5.1. Altura de planta

Para el resultado de los análisis en invernadero, se tomó un promedio de las repeticiones.

La cepa 2 de *B. subtilis* a concentración de 1×10^8 UFC/ml tuvo el mejor resultado en cuanto a crecimiento (32.67 cm), seguido por la cepa 3 de *B. subtilis* 1×10^4 UFC/ml y 1×10^6 UFC/ml (32.33 cm), 5 y 5.33 cm por arriba de los controles positivo y negativo respectivamente. El tratamiento con menor altura fue el de las plantas inoculadas con la cepa 3 de *T. harzianum* 1×10^{10} esporas/ml, 3.33 cm por debajo de los

controles (Cuadro 3). Sin embargo, las diferencias no fueron significativas entre los tratamientos ni con los controles (Cuadro 4). El resultado coincide con lo reportado por Hooker en 1981, quien concluye diciendo que *Streptomyces* spp. no influye en el desarrollo del follaje de la planta de papa, solo en los tubérculos.

Cuadro 4. Comparación de medias en altura de planta

TRATAMIENTO	GRUPO TUKEY	MEDIA	NÚMERO
C2 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁸	A	32.667	3
C3 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁴	A	32.333	3
C3 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁶	A	32.333	3
<i>B. subtilis</i> 1x10 ⁸	A	32	3
C3 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁸	A	31.333	3
C1 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁶	A	31.333	3
C2 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁴	A	31	3
C2 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁶	A	30	3
C3 <i>T. harzianum</i> 1x10 ¹⁰	A	29.333	3
C1 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁸	A	29	3
Control (-)	A	27.333	3
C2 <i>T. harzianum</i> 1x10 ⁵	A	27	3
<i>Streptomyces</i> spp. 3x10 ³ esporas /kg (+)	A	27	3
C1 <i>T. harzianum</i> 1x10 ¹⁰	A	26	3
C1 <i>T. harzianum</i> 1x10 ⁸	A	25.333	3
C2 <i>T. harzianum</i> 1x10 ⁸	A	25.667	3
C1 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁴	A	25	3
C3 <i>T. harzianum</i> 1x10 ⁵	A	25	3
C2 <i>T. harzianum</i> 1x10 ¹⁰	A	25	3
<i>T. harzianum</i> 1x10 ¹⁰	A	24.667	3
C1 <i>T. harzianum</i> 1x10 ⁵	A	24.667	3
C3 <i>T. harzianum</i> 1x10 ⁸	A	24	3

Letras iguales significa que no hay diferencia significativa entre tratamientos

6.5.2. Número total de tubérculos cosechados

El mejor tratamiento en cuanto a número de tubérculos resultó la cepa 3 (C3) de *B. subtilis* 1×10^8 UFC/ml (33 papas), seguido por el tratamiento de la misma cepa a una concentración de 1×10^6 UFC/ml (23 papas), el tratamiento con menor número de tubérculos fue el de la cepa 3 de *T. harzianum* 1×10^5 esporas/ml, el cual generó solamente 5 papas (Cuadro 3). sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 5).



Figura 10. Tratamiento 9 (C3 *B. subtilis* 1×10^8), con mayor número de tubérculos.

Cuadro 5. Comparación de medias en número total de tubérculos cosechados

TRATAMIENTO	GRUPO TUKEY	MEDIA	NÚMERO
C3 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁸	A	11	3
C3 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁶	A	7.667	3
C3 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁴	A	7	3
C1 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁶	A	7	3
C2 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁶	A	7	3
<i>Streptomyces</i> spp. 3x10 ³ esporas /kg (+)	A	6.667	3
C2 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁴	A	6	3
C3 <i>T. harzianum</i> 1x10 ¹⁰	A	5.33	3
C1 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁸	A	4.667	3
<i>B. subtilis</i> 1x10 ⁸	A	4.667	3
C3 <i>T. harzianum</i> 1x10 ⁵	A	3.333	3
C1 <i>T. harzianum</i> 1x10 ¹⁰	A	3	3
C2 <i>T. harzianum</i> 1x10 ⁸	A	3	3
Control (-)	A	2.667	3
C1 <i>T. harzianum</i> 1x10 ¹⁰	A	2.667	3
<i>T. harzianum</i> 1x10 ¹⁰	A	2.333	3
C1 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁴	A	2.333	3
C1 <i>T. harzianum</i> 1x10 ⁵	A	2.333	3
C1 <i>T. harzianum</i> 1x10 ⁸	A	2.333	3
C2 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁸	A	2	3
C1 <i>T. harzianum</i> 1x10 ¹⁰	A	2	3
C2 <i>T. harzianum</i> 1x10 ¹⁰	A	1.667	3

Letras iguales significa que no hay diferencia significativa entre tratamientos

6.5.3. Tubérculos con sarna común de la papa

El tratamiento con menor número de tubérculos infectados en el experimento lo presento la Cepa 3 (C3) de *B. subtilis* 1x10⁸ UFC/ml, la cual no tuvo ningún tubérculo

que presentara la sintomatología. Al igual que la C2 de *T. harzianum* que no presento infecciones (Cuadro 3), para la selección del mejor tratamiento de los dos, se tomó en cuenta el mayor número de tubérculos por tratamiento, *B. subtilis* tuvo 33 papas y el inoculado con *T. harzianum* 5 papas. El control negativo no presentó ningún tubérculo con sintomatología de sarna común de la papa. Podemos apreciar también que el mayor número de tubérculos enfermos se presentó en el control positivo (Cuadro 3), el cual fue inoculado inicialmente con *Streptomyces* spp. El 100% de la producción en este tratamiento presentó síntomas característicos de la sarna común de la papa, como podemos observar en la figura 10. Hubo diferencias significativas entre los tratamientos con el control positivo (Cuadro 6), también hubo diferencias significativas respecto al control negativo, solo los tratamientos de *B. subtilis* 1×10^6 UFC/ml y *T. harzianum* 1×10^{10} esporas/ml, no fueron diferentes al control negativo, lo que significa que son tratamientos que no lograron el control del patógeno de la sarna común de la papa.



Figura 11. Control positivo (+), con los tubérculos infectados con sarna común de la papa.

Cuadro 6. Comparación de medias de tubérculos con sarna común de la papa

TRATAMIENTO	GRUPO TUKEY	MEDIA	NÚMERO
<i>Streptomyces</i> spp. 3x10 ³ esporas /kg (+)	A	6.667	3
C1 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁶	B	2.667	3
<i>T. harzianum</i> 1x10 ¹⁰	C B	2.333	3
C3 <i>T. harzianum</i> 1x10 ¹⁰	C B	2.333	3
C2 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁶	C B D	1.667	3
C3 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁶	C B D	1.667	3
C1 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁸	C B D	1.333	3
C2 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁴	C B D	1.333	3
C2 <i>T. harzianum</i> 1x10 ¹⁰	C B D	0.667	3
C3 <i>T. harzianum</i> 1x10 ⁸	C B D	0.667	3
C1 <i>T. harzianum</i> 1x10 ⁸	C B D	0.667	3
C2 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁸	C D	0.333	3
C1 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁴	C D	0.333	3
C2 <i>T. harzianum</i> 1x10 ⁸	C D	0.333	3
C3 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁴	C D	0.333	3
C1 <i>T. harzianum</i> 1x10 ¹⁰	C D	0.333	3
C1 <i>T. harzianum</i> 1x10 ¹⁰	C D	0.333	3
C1 <i>T. harzianum</i> 1x10 ⁵	C D	0.333	3
<i>B. subtilis</i> 1x10 ⁸	D	0	3
C3 <i>T. harzianum</i> 1x10 ⁵	D	0	3
C3 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁸	D	0	3
Control (-)	D	0	3

Letras iguales significa que no hay diferencia significativa entre tratamientos

6.5.4. Incidencia de sarna común de la papa

En cuanto a la incidencia que se presentó en los diferentes tratamientos, el mejor resultado lo presentaron las dos cepas comerciales de los dos microorganismos a concentraciones de 1x10⁸ UFC/ml y 1x10⁵ esporas/ml de *B. subtilis* y *T. harzianum*,

respectivamente (Cuadro 3) con cero % de incidencia, pero analizando los resultados en cuanto a número total de tubérculos cosechados observamos que el tratamiento donde se utilizó la cepa de *B. subtilis* tuvo la mejor producción de tubérculo (33 papas) y ninguno de ellos presentó síntomas característicos de la sarna común de la papa y el tratamiento donde se utilizó la cepa de *T. harzianum* solo tuvo una producción de cinco tubérculos lo cual nos muestra como mejor resultado el tratamiento con *B. subtilis*. En la figura 11 podemos observar la comparación entre el número de tubérculos cosechados de los dos tratamientos, donde podemos observar la diferencia entre ellos. Para este parámetro el análisis estadístico mostró diferencias significativas entre tratamientos (Cuadro 7), donde podemos observar que el control positivo presentó diferencias con los tratamientos, sobre todo con los que fueron inoculados con *T. harzianum*.



Figura 12. Diferencia numérica de tubérculos cosechados en los tratamientos 9 y 16. Los cuales presentaron 33 y 5 papas respectivamente.

Cuadro 7. Comparación de medias del porcentaje de incidencia de sarna común de la papa

TRATAMIENTO	GRUPO TUKEY	MEDIA	NÚMERO
<i>Streptomyces</i> spp. 3x10 ⁵ esporas /kg (+)	A	100	3
C3 <i>T. harzianum</i> 1x10 ¹⁰	B A	56.94	3
C2 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁴	B A	46.19	3
C3 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁶	B A	45.24	3
C1 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁶	B A	43.6	3
C2 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁶	B A	30.37	3
C1 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁸	B A	19.44	3
C3 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁴	B A	16.67	3
C1 <i>T. harzianum</i> 1x10 ¹⁰	B A	16.67	3
C1 <i>T. harzianum</i> 1x10 ⁸	B A	16.67	3
C2 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁸	B A	16.67	3
C2 <i>T. harzianum</i> 1x10 ¹⁰	B A	16.67	3
C3 <i>T. harzianum</i> 1x10 ⁸	B	13.33	3
C1 <i>T. harzianum</i> 1x10 ⁵	B	8.33	3
C1 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁴	B	8.33	3
C2 <i>T. harzianum</i> 1x10 ⁸	B	6.67	3
C1 <i>T. harzianum</i> 1x10 ¹⁰	B	5.56	3
<i>B. subtilis</i> 1x10 ⁸	B	0	3
<i>T. harzianum</i> 1x10 ¹⁰	B	0	3
C3 <i>T. harzianum</i> 1x10 ⁵	B	0	3

Letras iguales significa que no hay diferencia significativa entre tratamientos

6.5.5. Severidad de las lesiones

Esta prueba se realizó cualitativamente, observando las lesiones que presentaban los tubérculos enfermos, los cuales fueron más severas en el control positivo, que en los tratamientos donde se utilizaron los microorganismos antagonistas. En el cuadro 8 se muestra que sí hubo diferencias significativas en cuanto a severidad entre los

tratamientos presentando la mayor severidad el control positivo con una media de 3 y la menor fue de los tratamientos que no presentaron presencia de la sarna común de la papa.

Cuadro 8. Comparación de medias de la severidad de los tratamientos

TRATAMIENTO	GRUPO TUKEY	MEDIA	NÚMERO
<i>Streptomyces</i> spp. 3x10 ³ esporas /kg (+)	A	3	3
C2 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁴	B	2	3
C3 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁴	B	2	3
C3 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁶	B	2	3
C1 <i>T. harzianum</i> 1x10 ¹⁰	B	2	3
C2 <i>T. harzianum</i> 1x10 ⁸	B	2	3
C2 <i>T. harzianum</i> 1x10 ¹⁰	B	2	3
C3 <i>T. harzianum</i> 1x10 ⁸	B	2	3
C3 <i>T. harzianum</i> 1x10 ¹⁰	B	2	3
C1 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁴	B	2	3
C1 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁶	C	1	3
C1 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁸	C	1	3
C2 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁶	C	1	3
C2 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁸	C	1	3
C1 <i>T. harzianum</i> 1x10 ⁵	C	1	3
C1 <i>T. harzianum</i> 1x10 ⁸	C	1	3
C1 <i>T. harzianum</i> 1x10 ¹⁰	C	1	3
C3 <i>B. subtilis</i> 1x10 ⁸	D	0	3
C3 <i>T. harzianum</i> 1x10 ⁵	D	0	3
<i>B. subtilis</i> 1x10 ⁸	D	0	3
<i>T. harzianum</i> 1x10 ¹⁰	D	0	3
Control (-)	D	0	3

Letras iguales significa que no hay diferencia significativa entre tratamientos

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este trabajo se logró obtener el aislado número 10 que causó los síntomas característicos de la sarna común de la papa (Hooker, 1981) a partir de muestras de lugares donde se había presentado con anterioridad la enfermedad. La única característica que no coincidió fue que la sarna de la papa tiende a formar costras duras y oscuras sobre la herida, atribuimos este efecto a que el tubérculo expuesto apenas tuvo un mes para desarrollar la infección y no alcanzó a oscurecer la herida, además que la humedad fue alta (80%) y posiblemente por esta razón no se terminó la cicatrización de la herida. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Conde *et al.* (2007), quienes reportaron que en Argentina existen cepas patogénicas de *Streptomyces* spp. En México no existen reportes de la presencia de *Streptomyces* spp. patogénicas pero nuestros resultados indican la presencia de cepas patogénicas de dicho microorganismo que está afectando a la comercialización del producto en nuestro estado.

El resultado de las pruebas moleculares con oligonucleótidos específicos para *Streptomyces* spp. resultó positiva, indicando que el aislado que causó los síntomas característicos de la sarna común de la papa corresponde al género *Streptomyces* spp. ya que se obtuvo una banda del tamaño esperado por PCR. Sin embargo, es importante señalar que será necesario corroborar este resultado mediante la secuenciación de esta banda para identificar inequívocamente el microorganismo como una especie del género *Streptomyces*.

En laboratorio obtuvimos resultados positivos de antagonismo de *B. subtilis* y de *T. harzianum* contra *Streptomyces* spp. Los dos microorganismos por separado actuaron de una manera más rápida, *T. harzianum* creció sobre *Streptomyces*, posiblemente micoparasitándolo. En cuanto a *B. subtilis* no se presentó un crecimiento sobre la colonia de *Streptomyces*, por lo cual su modo de acción puede ser antibiosis, ya que este microorganismo es característico por secretar antibióticos como subtilina o iturinas. Cabe mencionar que *T. harzianum* compitió por espacio en la caja con *B. subtilis*; *T. harzianum* es uno de los antagonistas más utilizados

contra hongos patógenos vegetales (González *et al.*, 2005), tanto en invernadero como en campo, lo cual coincide con nuestros resultados de antagonismo positivo contra *Streptomyces* spp.. En cuanto a *B. subtilis*, actualmente se lleva a cabo una investigación en Canadá que afirma que *B. subtilis* tiene antagonismo positivo contra *Streptomyces*, en pruebas *in vitro* y plantea que podría ser efectivo también en invernadero y campo (Goyer, 2011).

En nuestros resultados podemos observar como las plantas no se vieron afectadas en cuanto a follaje ni al desarrollo fenológico, tomando en cuenta que nuestro control positivo y negativo tuvieron un comportamiento similar, en cuanto a crecimiento en los cuales no hubo diferencias estadísticas significativas con los tratamientos, esto concuerda con lo reportado por Hooker en 1981, quien expone que este patógeno vegetal no afecta al follaje ni desarrollo fenológico, solo a los tubérculos.

En cuanto al número total de tubérculos cosechados los resultados obtenidos con *B. subtilis* C3 muestran que a concentración de 1×10^8 UFC/ml se obtuvo el mayor número de tubérculos, al respecto existen reportes como el de Aguilar *et al.* (2003) quienes aplicaron un producto comercial llamado SERENADE a base de *B. subtilis*, pudiendo observar un efecto positivo de la bacteria sobre la producción de papas, a diferentes concentraciones, siendo las más altas las más efectiva, al igual que nuestros tratamientos donde utilizamos las diferentes cepas de *B. subtilis*, en las cuales a mayor concentración de la bacteria mayor fue el número de tubérculos producidos.

La incidencia de la enfermedad más baja la presentaron las cepas comerciales de *B. subtilis* C3 y de *T. harzianum* C3, a alta y baja concentración respectivamente, pero la producción de tubérculos en la cepa de *B. subtilis* fue 5.5 veces mayor que en el tratamiento donde se utilizó *T. harzianum*. Es por esto que tomamos al tratamiento con *B. subtilis* como el de mejor resultado en cuanto a incidencia; la severidad de las lesiones fueron variadas entre los tratamientos. El control positivo presentó las lesiones más severas. Esto podemos relacionarlo a una mayor presencia de *Streptomyces* spp. Este actinomiceto secreta sustancias como la taxtamina A y B,

las cuales se encuentran involucradas en la inhibición de la síntesis de celulosa e induce los síntomas de la sarna común de la papa, a través de la necrosis y de la hipertrofia. Por lo cual si no hay ningún microorganismo como antagonista que limite o inhiba el crecimiento de *Streptomyces*, como el caso del control, las lesiones provocadas al tubérculo serán más severas que cuando no le utilicen los antagonistas debido a la alta secreción de Taxtomina A y B (Lazarovits *et al.*, 2007).

VIII. CONCLUSIONES

- A nivel de laboratorio todas las cepas utilizadas de *T. harzianum* y *B. subtilis* inhibieron en una proporción alta el crecimiento de *Streptomyces* spp.
- Ninguna cepa de *T. harzianum* y *B. subtilis* tuvo efecto en la altura de planta ni en la producción de tubérculo respecto a los controles.
- La menor incidencia de la enfermedad se presentó en el tratamiento con la cepa 1 de *T. harzianum*, a una concentración de 1×10^{10} esporas/ml.
- La severidad del daño fue menor en los tratamientos donde se utilizaron las cepas comerciales en altas concentraciones (1×10^6 UFC/ml y 1×10^{10} esporas/ml) respecto al control positivo.
- De manera general, las cepas nativas con mejores resultados fueron la de *B. subtilis* C2 a concentración de 1×10^6 UFC/ml y *T. harzianum* a una concentración de 1×10^{10} esporas/ml, respecto a los resultados del control positivo.
- La cepa comercial de *T. harzianum* tuvo los mejores resultados en cuando al control de la sarna común (0% de incidencia) respecto a la cepa nativa del mismo hongo con 2% en invernadero.
- La cepa comercial de *B. subtilis* C3 tuvo los mejores resultados en cuando al control de la sarna común (0% de incidencia) respecto a la cepa nativa de la misma bacteria con 8% en invernadero.

IX. LITERATURA CITADA

- ADAMS, M.J. y HIDE, G. 1981. Effects of common scab (*Streptomyces scabies*) on potato es. *Annals of Applied Biology* 98: 211- 216.
- AGENCIA INTERNACIONAL DE ESTUDIOS CON CANCER, 2005. Bromuro de metilo y sus efectos sobre la salud humana. Disponible en http://www.avaate.org/article.php3?id_article=2161
- AGRIOS, G. 1997. Fisiología vegetal. Cuarta edición de la academia, San Diego. 635.
- AGUILAR, C., ARAU G., GRAJEDA, R., TORRES, J. 2003. Uso de bacterias benéficas para mejorar la producción de papa. *Métodos de investigación* 34-41.
- ARNÓ, J., ALOMAR, O., CASTAÑÉ, C., RIUDAVETS, J., GABARRA, R. 2005. El control biológico de plagas en la horticultura mediterránea del nordeste español. *Revista*. 18-21.
- BAKER, K., COOK, R. 1974. *Biological Control of Plant Pathogens*. San Francisco, California, EEUU. 433.
- BUTT, T., HARRIS, J., POWEL. 1999. Biopesticidas microbianos: marco europeo de los biopesticidas. 234.
- CAMPBELL, R. 1989. *Biological control of microbial plant pathogens*. Cambridge University Press, Cambridge. 218.

- CHÁVEZ, M., MONTAÑA, J., MARTÍNEZ, M., MERCADO, M., RODRÍGUEZ, X., QUEVEDO, B. 2008. Efecto del sustrato y la exposición a la luz en la producción de una cepa de *Trichoderma* sp. UNIVERSITAS SCIENTIARUM Disponible en línea en: www.javeriana.edu.co/universitas_scientiarum, 13 3:245-251.
- CONDE, M., ANDREU, A., ASCARRA, A., 2005. Detección y caracterización de los agentes causales de la sarna común de la papa. Diagnósticos vegetales S.A. México 2446. 45-52.
- COOK J., BAKER K., 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul, Minnesota. 25:67-85.
- COOK, J., BAKER, K., 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. Segunda edición. 239.
- COHEN, S., LEWIS, A., PAPAIVIZAS, G., BEAN, G. 1983. Cytological investigation o chalmydosporas of *Thrichoderma* spp. (Abstract). Phyotpatology.
- DOMSH, K., GAMS, W., ANDERSON, T. 1990. *Trichoderma* Pers ex Fr. 1821 Compendium of soil fungi. Segunda edición de la Academia. Londres Inglaterra. 1023.
- EZZIYYANI, M, PÉREZ, C., SID, A., REQUENA, M., CANDELA, M. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora*

- capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). Anales de Biología 26:35-45.
- FISCHL, G. 1990. The prospective consequences by planting seed potatoes infected by common scab. *Noventytermes*. 39: 313-323.
 - GUILLEN, R., HERNANDEZ, F., GALLEGOS, G., RODRIGUEZ, R., AGUILAR, C., PADRÓN, E., REYES, H. 2006. *Bacillus* spp. como biocontrolador en suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de chile. *Revista Mexicana de Fitopatología, A.C.* 105-114.
 - GONZÁLEZ, M., CASTELLANOS, L., RAMOS, N., PEREZ, G., 2005. Efectividad de *Trichoderma* spp. para el control de hongos patógenos de la semilla y el suelo en el cultivo del frijol. *Fitosanidad*. 9:37-41.
 - GONZALES, V. y FRAGOSO, S. 2002. *Bacillus subtilis* (en línea) Disponible en: <http://www2.cbm.uam.es/microali/pdfs/Bsubtilis.pdf>.
 - GOYER C. 2011. Harnessing the power of other bacteria *Streptomyces* to control the disease, using *Bacillus subtilis*. *Revista Top crop manager* 2011. 12-22.
 - HARMAN, G.; HOWELL, C.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species - Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review*, 2:43-56.
 - HAYNES, C., EVERHART, E., JAURON, R. 2003. El huerto domestico, papa. *Guía de Horticultura de Iowa State University*. 24-28.
 - HOOKER, W. 1981. Compendio de enfermedades de la papa. Traducido por Teresa Ames de Icochea, American Phytopathological Society. 166.

- INFANTE, D., MARTÍNEZ, B., GONZÁLEZ, N., REYES, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Revista de protección vegetal. Versión impresa. 10-27.
- LARREA, FERNANDEZ. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo integral de plagas (Costa Rica) 62:96-100.
- LAWRENCE, C. H. 1959. Aislamiento y control de *Streptomyces* spp. Method of isolating Actinomycetes from scabby potato tissue and soil with minimal contamination. Can. J. Bot. 34:44-47.
- LAZAROVITS G, HILL J, PATTERSON G, CONN K, CRUM N. 2007. Edaphic soil levels of mineral nutrients, pH, organic matter and cationic exchange capacity in the geocaulosphere associated with potato common scab. The American Phytopathological Society, PHYTO 97:9:1071.
- LINDHOLM, P., KORTEMAA, H., KOKKOLA, M., HAATELA, K., SALKINGA-SALONEN, M., VALKONEN, J. 1997. *Streptomyces* spp. Isolated from Potato Scab Lesions Under Nordic Conditions in Finland. Plant Disease 81, 11:1317-1322.
- LIU, D., ANDERSON, N., KINKEL. 1995. Biological control on potato scab in the field with antagonists *Streptomyces scabies*. The American Phytopathological Society. 85 7:827-831.

- MONCLARDINI P., SOSIO M, CAVALETI L., CHIOCHINNI C., DONADIO S. 2002. New PCR primers for the selective amplification of 16S. rDNA from different groups of actinomycetes. FEMS Microbiology Econdogy 42:419-429.
- OFICINA REGIONAL DE LA FAO PARA AMERICA LATINA Y EL CARIBE. 2008. Importancia económica de la papa. Disponible en <http://www.rlc.fao.org/es/paises/pdf/cub0708.pdf>.
- PAVLISTA, A.D. 1996. How important is common scab in seed potatoes?. Am. Pot. Journal 73:275-278.
- PRODUCCIÓN DE CULTIVO INFORMACION TÉCNICA disponible en: http://www.basf.cl/asp-local/agro_prod_fichaweb.asp?prod_id=6.
- ROMÁN, M., HURTADO G. 2002. Cultivo de la papa. El Salvador. Guía Técnica. CENTA. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal. Disponible en: <http://redepapa.org/roman.pdf>
- SAGARPA. 1996. Norma oficial mexicana NOM-012-FITO-1996: por la que establece la cuarentena exterior para prevenir la introducción de plagas de la papa. Diario Oficial de la Federación.
- SAGARPA. 2000. Norma Oficial Mexicana NOM-025-FITO-2000 Para el establecimiento de zonas bajo protección y zonas libres de plagas cuarentenadas de la papa. Diario oficial de la Federación.
- SAGARPA. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-040-FITO-2002, Requisitos y especificaciones para la producción y movilización nacional de papa comercial. Diario Oficial de la Federación.

- SAGARPA. 2002. Norma oficial mexicana NOM-041-FITO-2002: requisitos y especificaciones fitosanitarios para la producción de material propagativo asexual de papa. Diario Oficial de la Federación.
- SAGARPA-ASERCA. 1998. Papa y cebada. Revista Claridades Agropecuarias. México DF. 55-52.
- SECRETARIA DE ECONOMIA. 1995. Productos alimenticios no industrializados para uso humano tubérculo - papa *Solanum tuberosum* (L) especificaciones y método de prueba (CANCELA A LA NMX-FF-022-1995-SCFI).
- SHIVA, V. 1994. Monocultivo y biotecnología. 188.
- SIAP. 2008. Año internacional de la papa. Disponible en: <http://www.potato2008.org/es/mundo/index.html>.
- SIAP. 2008. Importancia de la papa. Disponible en: http://w4.siap.gob.mx/sispro/IndModelos/SP_AG/papa/Circuito.pdf.