

**EFFECTIVIDAD DE *Bacillus subtilis* Y FUNGIBAC SOBRE
Rhizoctonia solani Kuhn EN PAPA BAJO INVERNADERO**

**EFFECTIVENESS OF *Bacillus subtilis* AND FUNGIBAC CONTROLLING
Rhizoctonia solani Kuhn IN POTATOES GREENHOUSE GROWN**

Rosalinda Mendoza V.¹

J. J. Romo Cerda¹

F. D. Hernández C.²

¹Departamento de Ciencias Básicas,

²Departamento de Parasitología,

Universidad Autónoma Agraria

Antonio Narro.

25315 Buenavista,

Saltillo, Coahuila, México

RESUMEN

El cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) es afectado por diversas enfermedades entre las que destaca la llamada "costra negra" causada por el hongo *Rhizoctonia solani*, la cual ataca desde la emergencia de plántulas hasta la producción de tubérculos. En muchas ocasiones, el control químico de la enfermedad es poco efectivo, haciéndose necesario buscar alternativas de solución como es el control biológico. En este trabajo se informa de la efectividad de tratamiento con bacterias viables y endosporas comerciales de *Bacillus subtilis* en el control de costra negra, comparado con el que proporcionan dosis de Fungibac, producto fungicida bactericida biodegradable. La experimentación se llevó a cabo bajo condiciones de invernadero, de junio a octubre de 1993, utilizando la variedad de papa alpha, 10 tratamientos, 4 repeticiones, en un diseño completamente al azar. El índice de mortalidad de plantas causado por *Rhizoctonia solani* fue evaluado a los 60, 90 y 110 días de la siembra. La comparación de medias fue con la prueba DMS al 5%. Los tratamientos de mayor efectividad a los 60, 90 y 110 días fueron, en este orden, como sigue: bacterias viables en dosis de 10^{12} células ml^{-1} ; endosporas comerciales en la cantidad de 0.15g, mientras que el de bacterias viables en 10^{14} células ml^{-1} presentó el mejor control al final del ciclo de cultivo.

Palabras clave: *Solanum tuberosum* L., var. alpha, control biológico, bacterias viables, endosporas comerciales.

ABSTRACT

The "black scurs" is among the several diseases that infects potato crops (*Solanum tuberosum* L.). This pest is produced by *Rhizoctonia solani* damaging during any time from seedlings to mature plants. The chemical control is frequently a failure and alternatives handling of the diseases is required.

This work deals with the use of *Bacillus subtilis* in the form of live bacteria or commercial endospores besides different levels of Fungibac, a biodegradable fungicide-bactericide. The experiment included 10 treatments, 4 replicates on potatoes cultivar alpha, using a complete randomized design. Evaluation of *Rhizoctonia solani* damage was registered at 60, 90 and 110 days during crop life cycle. Means treatment comparison was done through a DMS, 0.05 level test. The best control of the disease at 60 days was obtained with live bacteria 10^{12} cells ml^{-1} but 0.15g dosage of commercial endospores was so at 90 days, meanwhile the trait live bacteria 10^{14} cells ml^{-1} performed better at 110 days.

Key words: *Solanum tuberosum* L., cv. alpha, biological control, live bacteria, commercial endospores.

INTRODUCCIÓN

La papa ocupa el cuarto lugar a nivel mundial, después del arroz, maíz y trigo, en importancia para la alimentación humana. En México se producen aproximadamente 1.23 millones de toneladas anuales, en 71,000 ha. De esto, Coahuila ocupa el noveno lugar en superficie cultivada (datos promedio, combinando información de Díaz, 1990; y SAGAR-FAO, 1996).

La enfermedad llamada "costra negra" de la papa se presenta en todas las regiones donde ésta se cultiva (ambiente fresco y húmedo) y es causada por el hongo *Rhizoctonia solani* Kuhn (etapa sexual *Thanatephorus cucumeris* Frank Donk), cuya incidencia es menor en regiones cálidas y secas (Carling y Leiner, 1990).

El patógeno ocasiona lesiones en la base del tallo, en el punto de contacto con el suelo, provocando estrangulamiento del mismo; induce formación de tubérculos aéreos y costras negras (esclerocios) en los tubérculos enterrados. El tipo AG-3 es uno de las cepas más patogénicas (Carling y Leiner, 1986).

La proporción de daño ocasionado por la enfermedad en tubérculos es variable y está en función de la región agrícola de que se trate; así, la proporción de tubérculos marcados, reportados para regiones paperas de Puebla es de 75%

(Mendoza y Campos, 1991); para el estado de Hidalgo es 35% (Ponce y Mendoza, 1992); y hasta de 97% en el estado de Nuevo León (Hernández *et al.*, 1993).

Rhizoctonia solani puede controlarse por medio de control químico, biológico o por manejo del suelo agrícola. Con el primero se logran tubérculos libres del patógeno al tratarlos con un fungicida adecuado; sin embargo, el control no se logra por completo si el suelo agrícola contiene el patógeno (Platt *et al.*, 1993). El control biológico de la enfermedad puede lograrse con la utilización de bacterias *Bacillus* spp. Por otra parte, se conoce que la aplicación de estiércol, pollinaza o cerdasa a suelos infestados con *R. solani*, reduce el potencial de infección (Martinson y Al Rehiyani, 1991).

Bacterias del género *Bacillus* tienen la propiedad de controlar enfermedades. Estas bacterias producen endosporas tolerantes a temperaturas mayores de 35°C (Bryan, *et al.*, 1974) y a la desecación. Una especie de gran interés es *Bacillus subtilis* A13, que fue aislada por Broadbent *et al.* (1971), citados por Weller (1980), a partir de la disolución de *Sclerotium rolfsii*.

La mencionada cepa A13 inhibe el crecimiento *in vitro* de *R. solani*. Esta propiedad permitió su evaluación en campo, observándose que mejora el crecimiento de muchas especies de plantas en suelos naturales o esterilizados. Se tienen reportes que indican tratamientos a la semilla con la cepa A13 para aumentar la producción de cultivos, ejemplos: incremento de 48% en zanahoria y 33% en avena (Merriam *et al.*, 1974); y de 37% en cacahuete (Turner y Beckman, 1986) citados por Weller (1988).

Bacillus subtilis produce el antibiótico conocido como *iturin* que tiene acción efectiva contra fitopatógenos (Ohno *et al.*, 1993). El antagonismo bacteriano para el control biológico funciona por competencia de antibiosis o parasitismo, y depende de las enzimas líticas para la degradación de la pared celular de hongos fitopatógenos, de acuerdo con Chet *et al.* (1990).

En el presente trabajo se evalúa la efectividad de *B. subtilis* A13 y el producto Fungibac contra *R. solani* en el cultivo de papa, var. alpha, bajo condiciones de invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en invernadero de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en Buenavista, Saltillo, Coahuila, localidad de coordenadas geográficas como sigue: 25° 22' latitud Norte; 101° 00' longitud Oeste y altitud de 1743 msnm.

La variedad comercial de papa fue la alpha. La cepa de *R. solani* la proporcionó el Departamento de Parasitología¹, donde se procedió a identificarle por el número de núcleos y diámetro de hifas, a partir de un tubérculo de papa infectado, y purificado por punta de hifa.

La cepa de *B. subtilis* endosporas se adquirió como producto comercial Quantum-4000². Una parte de endosporas se repordujo en cajas Petri esterilizadas que contenían agar nutritivo a temperatura de 28°C por 24 horas, y de donde se derivaron las células bacterianas variables para utilizarse en los tratamientos correspondientes.

El hongo se reprodujo en agar-papa-dextrosa, a temperatura de 28°C, desarrollándose en cajas Petri por 15 días; al respecto, cabe mencionar que a temperaturas menores el crecimiento del hongo es más rápido; cuando los cultivos de *R. solani* ocuparon toda la caja Petri, éstas se guardaron bajo refrigeración (4°C). Posteriormente, el inóculo se preparó utilizando granos de trigo como soporte, siguiendo la técnica de Sneh *et al.* (1966). El tratamiento aséptico del trigo fue con Cloranfenicol a 250 ppm, luego se liberó la solución y los granos de trigo fueron esterilizados en autoclave.

Porciones de micelio del hongo refrigerado se aplicaron sobre el trigo esterilizado y se volvió a incubar por 15 días a 28°C con el propósito de obtener masivamente al patógeno (inóculo). El trabajo de laboratorio, para la reproducción de *R. solani* y *B. subtilis* se llevó a cabo en el Laboratorio de Apoyo a Investigación del Departamento de Ciencias Básicas de la misma universidad.

Las macetas de siembra (10 kg de capacidad) se llenaron con suelo arcilloso, previamente cribado y esterilizado con bromuro de metilo por 48 hs. La fertilización aplicada fue de 200-400-200 unidades de N-P-K, utilizando los productos comerciales: sulfato de amonio (20.5% de Nitrógeno), super fosfato triple (46% de Fósforo) y sulfato de potasio (50% de Potasio). Se establecieron 10 tratamientos (Cuadro 1); en todos los casos se inoculó al suelo con 10 semillas de trigo, portadoras de micelio de *R. Solani*, lo cual es equivalente a 56 Kg ha⁻¹ del inóculo (Sneh *et al.*, 1966).

Los tubérculos de papa utilizados fueron de aproximadamente 4 cm de diámetro, sembrándose de manera individual en la maceta descrita anteriormente.

Previo a la siembra, cada tubérculo recibió el tratamiento correspondiente, descritos en Cuadro 1.

¹ de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en la sede Saltillo.

² de la compañía Gustafson, Dallas, Texas, E.U.A.

Cuadro 1. Tratamientos para el control de *Rhizoctonia solani* en papa bajo condiciones de invernadero. UAAAN, 1993.

Tratamiento	Dosis aplicada por maceta
1. <i>B. subtilis</i> , células	8×10^{13} bacterias ml^{-1}
2. Idem	3×10^{12} bacterias ml^{-1}
3. Idem	2×10^{14} bacterias ml^{-1}
4. <i>B. subtilis</i> , endosporas	50 mg [†] + goma arábica [‡]
5. Idem	100 mg + goma arábica
6. Idem	150 mg + goma arábica
7. Fungibac	2 L ha^{-1}
8. Idem	3 L ha^{-1}
9. Idem	4 L ha^{-1}
10. Testigo	sin controles

[†] = Miligramos de endosporas por 100 ml de dilución.

[‡] = Goma arábica al 0.05 %.

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar, con cuatro repeticiones. Durante el desarrollo del cultivo se presentó la plaga "palomilla de la papa" (*Phthorimaea operculella*) y se controló aplicando el insecticida Monitor 600 (50%) en dosis de 2 L ha^{-1} .

A los 47 días de la siembra se presentaron los primeros indicios de mortalidad de plantas, fecha de partida para realizar conteos cada 10 días hasta el final del ciclo de cultivo. Se realizaron tres evaluaciones (a los 60, 90 y 110 días) para cuantificar el efecto de *B. subtilis* y Fungibac sobre *R. solani*; la variable de respuesta fue el porcentaje de mortalidad de plantas. Para el análisis de varianza, los datos en por ciento fueron transformados vía la fórmula arco seno. La comparación de medias fue a través de DMS al 0.05 de probabilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las medias de tratamientos, en cada fecha de evaluación, se detallan en los Cuadros 2 (datos originales) y 3 (datos transformados). De acuerdo a la naturaleza del tipo de control en contra del daño de *R. solani* (costra negra), los tratamientos con dosis de bacterias vivas fueron los más efectivos para reducir daño del patógeno. El grupo de tratamientos utilizando endosporas de *B. subtilis*, en las dosis practicadas fue tan poco efectivo como los diferentes niveles de Fungibac. De hecho, en estos dos grupos de tratamientos, hubo algunos tan inefectivos que fue mejor la sobrevivencia en el grupo testigo.

Cuadro 2. Índice de mortalidad de plantas por causa de infección por *R. solani*, tres fechas de evaluación. Datos originales (%).

Evaluación	Tratamientos									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A 60 días	25	0	0	50	25	25	0	25	25	50
A 90 días	50	50	0	75	100	25	50	50	100	50
A 110 días	100	50	0	100	-	50	100	50	-	100

Cuadro 3. Índice de mortalidad. Datos con transformación angular.

Evaluación	Tratamientos									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A 60 días [†]	3.2	2.4	2.4	3.9	3.2	3.2	2.4	3.2	3.2	3.9
A 90 días	3.9b	3.9b	2.4c	4.7b	5.5a	3.2bc	3.9b	3.9b	5.5a	3.9b
A 110 días	5.5a	3.9b	2.8c	5.5 ^a	5.5a	3.9b	5.5a	3.9b	5.5a	5.5a

[†] = Medias de tratamiento estadísticamente iguales.

a, b, c = Distinta literal indica diferencias entre tratamientos

CV = 20.72%

La evaluación a los 60 días post-siembra indica que en todos los tratamientos hubo plantas sobrevivientes, destacándose los tratamientos 2, 3 y 7 como los 100% sanos; los primeros dos corresponden a control biológico de bacterias vivas, mientras que el 7 corresponde a la primera dosis de Fungibac. Las pruebas estadísticas (datos transformados) no detectan diferencias entre tratamientos.

El análisis de datos a los 90 días permite señalar que los tratamientos que propiciaron mejor protección al cultivo fueron el 3 (2×10^{14} bacterias ml^{-1}) y el 6 (150 mg de endosporas) permitiendo una sobrevivencia de 100% y 75% respectivamente. Cabe destacar aquí que la dosis intermedia de endosporas y la más alta de Fungibac fallaron completamente pues la mortalidad de plantas en ellos alcanzó el 100% y por lo tanto, inexistentes en la siguiente evaluación.

Al final del ciclo experimental sólo el tratamiento 3 pareció proteger completamente al cultivo; los tratamientos 2, 6 y 8 presentaron un efecto parcial (50% de sobrevivencia) mientras que el resto fue ineficaz en su acción protectora, permitiendo que *R. solani* terminara con el cultivo. Como puede apreciarse, dos tratamientos con bacterias *B. subtilis* lograron controlar completa o parcialmente la enfermedad. El control biológico a través de endosporas

bacterianas tal vez requiera de dosis más altas, ya que la mayor de las empleadas en este trabajo sólo permitió sobrevivencia parcial de las plantas tratadas. El control químico con Fungibac fue prácticamente inefectivo pues la dosis intermedia protegió parcialmente y la dosis mayor no permitió a las plantas llegar a 90 días de edad. Un aspecto a considerar en futuros experimentos es el uso combinado de fungicida y *B. subtilis* como lo practicaron Hwong y Charkravarty (1993) utilizando las bacterias y el fungicida Anchor, en el cultivo de chícharo.

Cabe mencionar que por fallas en las instalaciones de invernadero, las temperaturas máximas durante el experimento estuvieron entre 27 y 31°C, las cuales son muy superiores a las requeridas para el desarrollo óptimo de *R. solani*, que ocurre entre 10 y 15°C. Carling y Leiner (1990) aislaron a la cepa GA-3 del hongo y observaron que éste causa más daño a raíces y brotes a temperatura de 10°C que en medios con 15.5°C ó 21°C de temperatura. La manifestación tardía (47 días postsiembra) de la enfermedad en este trabajo experimental se debió probablemente a la influencia de las altas temperaturas señaladas arriba.

CONCLUSIONES

Se confirma la posibilidad de control biológico de la enfermedad costra negra causada por *R. solani* en papa. Al respecto, se requiere explorar la aplicación de nuevas dosis de los agentes bacterianos *B. subtilis*.

LITERATURA CITADA

- Carling, D.E., R.H. Leiner, 1986. Isolation and characterization of *Rhizoctonia solani* and binucleate *R. solani* like fung, aerial stems and subterranean organs of potato plants. *Phytopathology* 76(7):725-729.
- Carling, R.E., R.H. Leiner, 1990. Effect of temperature on virulence of *Rhizoctonia solani* and other *Rhizoctonia* on potato. *Phytopathology* 80(10):930-934.
- Chet, I., A. Ordentlich, R. Shopira, A. Oppenheim. 1987. Mechanisms of biocontrol of soil borne plants pathogens by *Rhizobacteria*. *Plant and Soil* 102(1): 11-15.
- Díaz P., A. 1990. Antagonismo de *Bacillus subtilis* contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* y su eficiencia en el control del marchitamiento de la sandía en invernadero. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Buenavista, Saltillo Coahuila. México. pp.15-17.

- Hernández C., F.D., Z. Alonzo, N.A. Cornejo, S.M. Cepeda, 1993. Efecto del fungicida Flutonil (Moncut^R) en el control de *Rhizoctonia solani* Kuhn en papa. Agraria, 9(1):51-61.
- Hwong, S.F., P. Chakravariy. 1993. Potential for the integrated control of *Rhizoctonia* root rot of *Pisum sativum* using *Bacillus subtilis* and fungicide. Biol. Abstr. 95(9):970.
- Martinson, C.A., S.M. Al-Rehiayani, 1991. Supression of *Rhizoctonia solani* in soil with animal manures. Phytopathology 81 (10): 1241.
- Mendoza, Z.C., C Campos, 1991. Evaluación de Pencycuron (Monseren^R) contra la costra negra (*Rhizoctonia solani* Kuhn) de la papa. Revista Mexicana de Fitopatología 9(2):148-152.
- Ohno, A., A. Takashi, S. Makoto, 1993. Production of the antifungal peptide antibiotic iturin by *Bacillus subtilis* NB22 in solid state fermentation (SSF). Biol. Abst. 95(8):401.
- Platt, H.W., F. Canale, G. Gimenez. 1993. Effects of tuberborne inoculum of *Rhizoctonia solani* and fungicidal seed potato treatment on plant growth and *Rhizoctonia* disease in Canada and Uruguay. American Potato Journal. 70(5):553-559.
- Ponce, G.F., C. Mendoza, 1992. Evaluación del frutolanil en el control de la costra negra de la papa (*Rhizoctonia solanum*) en el estado de Hidalgo. Memorias del XIX Congreso Nacional de Fitopatología. Sociedad Mexicana de Fitopatología. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. p. 127.
- SAGAR-FAO. 1996. Base de Datos Agrícola 1960-1996. Proyecto TCP/MEX/5611. Bases de datos en 6 diskettes (3.5"). Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (SAGAR), México, D.F. Food and Agricultural Orgaization, (FAO), Roma, Italy.
- Sneh, B., J. Katan, V. Henis, I. Wahl. 1996. Methods for evaluating inoculum density of *Rhizoctonia* in naturally infested soil. Phytopathology 56(1):68-74.
- Weller, M.D. 1988. Biological control of soil borne plants pathogens in the rhizosphere with bacteria. Ann. Rev. Phytopathology. 26(3):379-407.