

Introducción de agentes de control biológico de *Rhizoctonia solani* en suelos solarizados o encalados en condiciones de invernadero

C. Muñoz Ruiz*
G. Virgen Calleros**
A. Herrera Estrella***
V. Olalde Portugal****

RESUMEN. Se presentan los métodos de solarización y encalado como pre tratamientos de suelo para la introducción de agentes de control biológico de *Rhizoctonia solani* K.(AG-3). Los agentes de control evaluados fueron: una suspensión de *Bacillus* sp. 3×10^7 células/ml, *B. subtilis* GV-3 $1,4 \times 10^7$ células/ml, *B. subtilis* (Kodiak HB) 7×10^6 células/ml, *Trichoderma harzianum* IMI206040 4×10^8 esporas/ml y *T. harzianum* IMI206040 250 mg de micelio/ semilla de papa. Cada uno de estos microorganismos se aplicó a suelo previamente tratado: suelo solarizado, encalado, encalado-solarizado y un testigo absoluto. Los resultados mostraron que los mejores tratamientos fueron el encalado + *B. subtilis* GV-3 y el solarizado + *Bacillus* sp. con 100% de protección. El testigo absoluto tuvo una incidencia de 31,25%.

Palabras clave: *Rhizoctonia solani*, *Bacillus* sp., *Trichoderma harzianum*, Control biológico, Solarización, Encalado, Suelo.

ABSTRACT. Introduction of biological control agents of *Rhizoctonia solani* to solarized or limed soil in greenhouse conditions. Solarization and liming methods, as pre-treatments of soil for the introduction of biological control agents of *R. solani* K.(AG-3), are described. The control agents evaluated were: a suspension of 3×10^7 cells/ml of *Bacillus* sp., $1,4 \times 10^7$ cells/ml of *B. subtilis* GV-3, 7×10^6 cells/ml of *B. subtilis* (Kodiak HB), 4×10^8 spores/ml of *Trichoderma harzianum* IMI206040 and 250 mg of *T. harzianum* IMI206040 mycelia/potato seed. Each of these microorganisms was applied to soil previously treated: solarized, limed and lime-solarized soil and an absolute control. The results indicated that the best treatments were liming + *B. subtilis* GV-3 and solarization + *Bacillus* sp., with 100% protection. The incidence of *R. solani* AG-3 in the absolute control was 31.25%.

Keyword: *Rhizoctonia solani*, *Bacillus* sp., *Trichoderma harzianum*, Biological control, Solarization, Liming, Soil.

Introducción

La enfermedad conocida como costra negra de la papa, es causada por el hongo *Rhizoctonia solani* Kühn (teleomorfo: *Tanatephorus cucumeris* Frank & Donk). Este patógeno está presente en todas las áreas productoras de papa, provoca cáncer de tallo y estolón, así como costras sobre los tubérculos (Hooker 1986),

además reduce la emergencia de los brotes, el vigor de la planta y frecuentemente, los tubérculos infectados se agrietan o se deforman (Powelson *et al.* 1993). *P. solani* también puede causar lesiones en el tallo en más del 90% de las plantas y reducir significativamente el rendimiento hasta en un 31,5% (Carling *et al.*

Recibido: 25/08/2000. Aprobado: 23/02/2001.

* Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, IPN. Jiqualpan, Mich. México

** Departamento de Producción Agrícola del CUCBA. Universidad de Guadalajara. A. Postal 129 C.P. 45110 Zapopan, Jal. México. Correo electrónico: gvirgen@maiz.cucba.udg.mx

*** Departamento de Ingeniería Genética de Plantas. CINVESTAV U. Irapuato A.P. 629. C.P. 36500. Irapuato, Gto. México.

**** Departamento de Biotecnología y Bioquímica. CINVESTAV U. Irapuato A.P. 629. C.P. 36500. Irapuato, Gto. México.

1989) así como la gravedad específica de los tubérculos (Banville 1989).

Los aislamientos de *R. solani* en papa, generalmente se han identificado como miembros del grupo de anastomosis 3 (AG-3) (Bandy *et al.* 1988, Carling y Leiner 1986, Otrysko *et al.* 1985); sin embargo, otros grupos de anastomosis también se han aislado de diferentes partes de la planta, incluyendo tallos, estolones, raíces, esclerocios en tubérculos o en suelos donde recientemente se cultivó papa y quedaron éstos como inóculo (Carling *et al.* 1989). En algunas regiones productoras de papa de México (Saltillo, León y Toluca) se han aislado además del AG-3, el AG-2, AG-4, AG-5 y AG-7 (Alonso *et al.* 1994, Virgen *et al.* 1996a, Carling *et al.* 1998). En la mayoría de las regiones productoras de papa de México, el uso de fungicidas constituye la práctica más común para el control de este patógeno; sin embargo, los resultados han sido muy variables debido, posiblemente, a que los grupos de anastomosis de *R. solani* muestran diferente sensibilidad a fungicidas (Kataria *et al.* 1991).

También se han utilizado otras prácticas para el manejo de este patógeno, como son la selección de semilla, destrucción de los residuos, rotación de cultivos, manejo del agua y uso de fertilizantes (Lucas *et al.* 1985), así como el uso de cal (óxido de calcio) (El encalado de... 1966). Otros métodos, tales como el control biológico y la solarización del suelo fueron desarrollados a mediados de este siglo, y su finalidad también es la reducción de la incidencia de enfermedades del suelo. La solarización se ha usado como un método de desinfección de suelo para reducir poblaciones de patógenos, malezas y artrópodos (Katan *et al.* 1976). El proceso básico de la solarización involucra el calentamiento del suelo, usualmente entre 36 a 50°C en los primeros 30 cm de profundidad (Katan 1987). En años recientes, se han incrementado los estudios sobre control biológico de *R. solani*. Algunos de los micoparásitos que han mostrado eficiencia en la reducción de la incidencia de hongos son *Verticillium biguttatum* (Boogert y Velvis 1992), *Trichoderma harzianum*, *T. viridae*, *T. hamatum* y *Gliocadium virens* (Beagle-Ristaino y Papavizas 1985) Además *Bacillus subtilis* RB14 ha mostrado inhibición *in vitro* a *R. solani* en plántulas de tomate (Asaka y Shoda 1996). En papa, se ha evaluado también la eficacia de algunos agentes de control biológico de *R. solani* en condiciones de campo (Virgen *et al.* 1996a). Sin embargo, el empleo de la cal y la solarización, han sido poco estudiados como pre tratamiento de suelo

para la introducción de agentes de control biológico, la primera básicamente por modificación del pH. Se ha considerado que el pH favorable a *Rhizoctonia* y *Trichoderma* es en promedio de 5,5, mientras que para *Bacillus* es de 6,5 - 7,0 y la papa crece mejor en un pH ligeramente ácido (6,0 - 6,5).

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del encalado del suelo y la solarización, así como la eficacia de algunos agentes de control biológico para la supresión de *R. solani* en condiciones de invernadero.

Materiales y métodos

Características del suelo. El suelo utilizado en este estudio fue de tipo vertisol (pardo oscuro) con un pH de 6,5, densidad de 1,2 mg/L, contenido de materia orgánica de 1,75 mg/L, tomado de un campo cultivado con papa, donde la incidencia de *R. solani* era alta. El suelo se colocó en una bandeja de 3 x 2 x 0,2 m.

Incremento del inóculo del suelo. *R. solani* AG-3 se aisló de tallos y tubérculos de papa. Para el incremento del inóculo del suelo se usó la técnica descrita por Carling y Leiner (1990). La semilla-tubérculo de papa fue sembrada en la bandeja, con un espaciamiento de 20 cm entre semillas y una profundidad de 10 cm. Para cada planta, 15 días después de la siembra, se colocaron cerca de los brotes, 12 discos de 1 cm de diámetro, tomados de un medio de cultivo donde *R. solani* creció durante cuatro días, con la finalidad de inducir cáncer de tallo. Un mes después de la siembra, las plantas se cosecharon y se cuantificó el índice de la enfermedad en tallos (severidad) usando la escala propuesta por Carling y Leiner (1990); el tejido afectado de los tallos de papa se cortó y se colocó en la bandeja. Posteriormente, el suelo se homogenizó para mezclarlo con el inóculo presente en los tallos.

Testigos. En una bandeja el suelo fue dividido en cuatro secciones. Se adicionó cal Bertrán (hidróxido de calcio, la cual tiene un pH de 11,5 en solución) en una proporción de 30 t/ha en dos de las secciones. Una de estas secciones se cubrió con plástico transparente de 2 micras, de las dos secciones restantes también una de ellas se cubrió con plástico. Las secciones con plástico permanecieron cubiertas durante 35 días, período durante el cual se midió la temperatura cada cuatro días con un intervalo de 15 días entre la segunda y tercera medición. El pH se midió a diferentes intervalos de tiempo por un período de 35 días. Después de este período se retiró el plástico y se llenaron macetas de plástico con estos suelos (solarizado, encalado, encalado-solarizado y testigo absoluto).

Inoculación de los antagonistas. Los antagonistas de *R. solani* se inocularon cuando las semillas de papa fueron sembradas en las macetas. Se utilizaron tres aislamientos de *Bacillus*: *B. subtilis* GV-3, *Bacillus* sp. y *B. subtilis* (KodiakMR), así como *T. harzianum* IMI 206040 en forma de micelio y de esporas. Los aislamientos bacterianos y *T. harzianum* fueron inoculados a los tubérculos-semilla, por inmersión de éstas en una suspensión con diferentes concentraciones de los antagonistas. Posteriormente, los tubérculos se sembraron según los diferentes tratamientos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Tratamientos utilizados en la prueba de control de *R. solani*.

	Encalado y sin encalar	Concentración (cel/ml/semilla)
Suelo solarizado	<i>B. subtilis</i> (Kodiak ^{MR})	7,0 x 10 ⁶
	<i>B. subtilis</i> AG-3	1,4 x 10 ⁷
	<i>Bacillus</i> sp.	3,0 x 10 ⁷
	<i>T. harzianum</i> (esporas)	4,0 x 10 ⁸
	<i>T. harzianum</i> (micelio)	250 mg/semilla
	Testigo	—
Suelo no solarizado	<i>B. subtilis</i> (Kodiak ^{MR})	7,0 x 10 ⁶
	<i>B. subtilis</i> AG-3	1,4 x 10 ⁷
	<i>Bacillus</i> sp.	3,0 x 10 ⁷
	<i>T. harzianum</i> (esporas)	4,0 x 10 ⁸
	<i>T. harzianum</i> (micelio)	250 mg/semilla
	Testigo	—

Análisis de datos. Los datos se analizaron midiendo la magnitud de la incidencia de daño (severidad) en tallos (Carling y Leiner 1990). El experimento se realizó en condiciones de invernadero y un diseño completamente al azar, en arreglo factorial 4 x 6 con 10 repeticiones por tratamiento. La separación de medias se hizo mediante la prueba de Tukey. Los datos se transformaron con una escala inversa al porcentaje de protección (100% de protección = 0% de daño).

Resultados

Incremento de temperatura y pH del suelo. La temperatura se incrementó en un promedio de 10 a 15 grados en el suelo cubierto con plástico (Fig. 1), la temperatura fue menor en los tratamientos en los cuales se

utilizó cal, tanto en suelo solarizado como no solarizado. Con respecto al pH del suelo, este se incrementó en los primeros días después de la aplicación de la cal; determinándose un comportamiento semejante entre el suelo solarizado y el no solarizado (Fig. 2). Se observó un incremento del pH hasta 11 en un día, debido a la fuente de cal (hidróxido de calcio) que tiene un pH de 11,5 que al aplicarse al suelo dió un valor de 11, pero como se aprecia aproximadamente 20 días después de encalado (tanto suelo solarizado y no solarizado) el pH tendió a ser constante; sin embargo, siempre fue mayor en el suelo donde se utilizó cal.

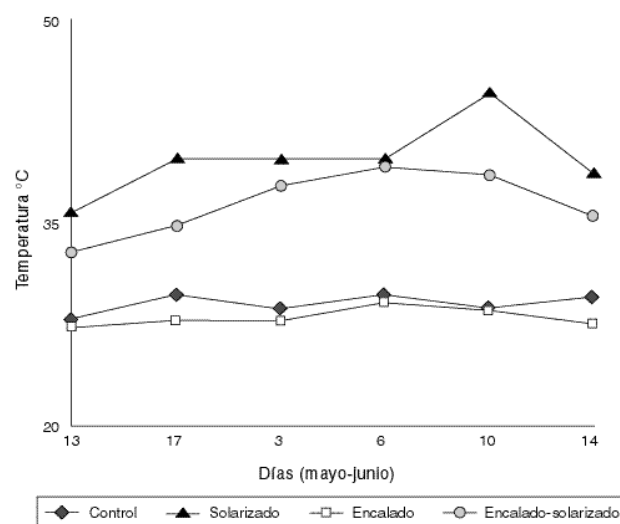


Figura 1. Temperatura del suelo durante 32 días (mayo 13 - junio 14) previos a la introducción de agentes de control biológico.

Testigo en condiciones de invernadero. El índice de daño (severidad) causado por *R. solani*, 45 días después de la siembra fue de 31,25% en el testigo, los antagonistas *B. subtilis* GV-3 junto con *Bacillus* sp. tuvieron un 100% de control sobre *R. solani*. *B. subtilis* GV-3 tuvo un mejor efecto en suelo encalado, mientras que *Bacillus* sp. fue mejor en suelo solarizado; no obstante, *B. subtilis* GV-3 alcanzó una protección de 97,9 en suelo solarizado. *T. harzianum* IMI206040 inoculado en forma de esporas dió una protección de 98,75% en suelo solarizado, no así donde se inoculó en suelo encalado (59,46% de protección). Se observa que la eficiencia de *T. harzianum* IMI206040 se reduce considerablemente en suelo encalado, tanto en esporas como micelio, siendo la protección menor que la del testigo. El efecto de los otros antagonistas en los diferentes tratamientos de suelo se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Porcentaje (%) de protección contra *R. solani* (AG-3) por diferentes microorganismos de control biológico introducidos al suelo, después del encalado o la solarización del suelo.

Tratamiento	Encalado (%)	Solarización (%)	Encalado+Solarización (%)	Control
<i>B.subtilis</i> AG-3	100,00a*	97,91a	93,75ab	81,66abcd
<i>B.subtilis</i> Kodiak ^{MR}	87,41abc	92,5abc	95,00abc	97,50a
<i>B. subtilis</i> sp.	90,16abc	100,00a	82,83abcd	73,16bcde
<i>T. harzianum</i> (espora)	59,46de	98,75a	95,12ab	52,83e
<i>T. harzianum</i> (micelio)	17,95f	95,83ab	94,00ab	86,16abc
Suelo solo	87,25abc	92,50abc	95,00ab	68,75cde

* Tukey (p = 0, 05)

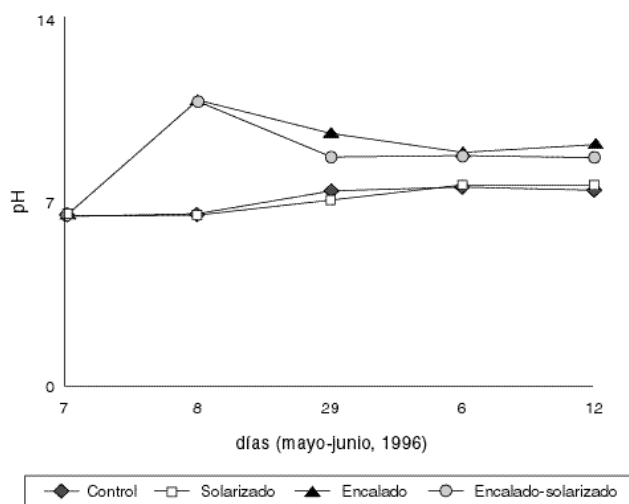


Figura 2. Cambios en el pH del suelo durante 35 días (mayo 7-junio 12) previos a la introducción de los agentes de control biológico.

Discusión

T. harzianum IMI206040, parece no establecerse eficientemente en suelo encalado, posiblemente por el efecto del incremento del pH en el suelo, lo cual puede afectar el desarrollo del hongo, debido a que se ha determinado que el pH bajo mejora la propagación de varias especies de *Trichoderma* (Chet 1987). Lo anterior, también coincide con lo informado por Chet y Baker (1981) quienes mencionan que, en un suelo de Colombia con pH de 5,1, encontraron una densidad de propágulos de *Trichoderma* de 8×10^5 /g de suelo, mientras que en Fort Collins en un suelo con pH de 8,1 la densidad fue de 10^2 /g de suelo. El género *Bacillus* muestra mayor capacidad de adaptación a valores altos de pH, dado que puede crecer hasta pH de 8,5, y mantenerse latente en forma de esporas en valores mayores (Holt *et al.* 1984). Además este mismo autor señala que este género tiene mejor adaptación a temperaturas altas, características que pueden permi-

tir una mejor adaptación y un mayor efecto en la protección contra *R. solani*, bajo esas condiciones. No obstante, *T. harzianum* IMI206040 mostró un excelente efecto cuando se inoculó en suelo solarizado, quizás debido a la reducción de microorganismos nativos y a una mayor oportunidad de colonizar rápidamente el suelo para ejercer un buen efecto de control. *B. subtilis* (Kodiak^{MR}) mostró un efecto aceptable en la protección de papa contra *R. solani* (97,5%); sin embargo, factores como la cal y la solarización afectaron en cierta medida su potencial de control. En condiciones de campo esta cepa ha mostrado un efecto intermedio de control sobre *R. solani* al compararse con otras alternativas (Virgen *et al.* 1996b).

B. subtilis GV-3 parece presentar una gran adaptación a los factores estudiados, que le favorecen considerablemente en el control sobre *R. solani*; estos resultados sugieren que existe una reducción de microorganismos nativos por efecto de la solarización, lo cual concuerda con los resultados de Katan (1987) en suelo húmedo, donde la solarización promueve la actividad biológica y mejora el control de los fitopatógenos. En esta investigación, permitió el rápido establecimiento de la cepa (*B. subtilis* GV-3), la cual puede considerarse como una buena alternativa de control de *R. solani* y con posibilidades de usarse en condiciones de campo. Estos tratamientos del suelo pueden permitir la introducción de microorganismos antagónicos a patógenos del suelo. Por otra parte, *Bacillus* sp. muestra un porcentaje considerable de control en los diferentes suelos, excepto en el suelo testigo, siendo estadísticamente diferente a *B. subtilis* (Kodiak^{MR}) y a *B. subtilis* GV-3.

Por otra parte se observa que la solarización y el encalado del suelo son tan efectivos como los microorganismos, tanto en tratamientos solos como combinados; sin embargo, el efecto de control se ve incrementado cuando se combinan estos tratamientos

de suelo con el uso de los microorganismos. Así mismo el testigo (31,25% de daño), *T. harzianum* (esporas) y *Bacillus* sp. son los tratamientos con mayor incidencia de *R. solani*.

Conclusiones

La modificación del pH (hasta 8,5) mejoró la acción de *Bacillus* y tuvo un efecto detrimento sobre *Trichoderma*.

La solarización potencia la acción de los organismos de control biológico por la reducción de los microorganismos nativos en el sustrato donde se aplican.

La solarización y encalado solo o combinados son tan efectivos como los microorganismos.

B. subtilis AG-3 tiene el mejor efecto de control en suelo encalado y solarizado

Literatura citada

- Alonso, Z; Hernández-Castillo, D; Sánchez-Arizpe, A. 1994. Grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* en Coahuila y Nuevo León. In Congreso Nacional de Fitopatología (21, 1994, Cuernavaca, México). p. 99.
- Asaka, O; Shoda, M. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. Appl. Environ. Microbiol. 62:4081-4085.
- Bandy, BP; Leach, SS; Tavantzis, SM. 1988. Anastomosis group 3 is the major cause of *Rhizoctonia* disease of potato in Maine. Plant Dis. 72:596-598.
- Banville, GJ. 1989. Yield losses damage to potato plant caused by *Rhizoctonia solani* Kühn. Am. Potato J. 66:821-834.
- Beagle-Ristaino, JE; Papavizas, GC. 1985. Biological control of *Rhizoctonia* stem canker and black scurf of potato. Phytopathology 75:560-564.
- Boogert, PHJF. van den; Velvis, H. 1992. Population dynamics of the mycoparasite *Verticillium biguttatum* and its host, *Rhizoctonia solani*. Soil Biol. Biochem. 24:157-164.
- Carling, DE; Leiner, RH. 1986. Isolation and characterization of *Rhizoctonia solani* and binucleate *R. solani*-like fungi from aerial stems and subterranean organs of potato plants. Phytopathology 76:725-729.
- Carling, DE; Leiner, RH; Westphale, PC. 1989. Symptoms, signs and yield reduction associated with *Rhizoctonia* disease of potato induced by tuberborne inoculum of *Rhizoctonia solani* AG-3. Amer. Potato J. 66:693-701.
- Carling, DE; Leiner, RH. 1990. Effect of temperature on virulence of *Rhizoctonia solani* and other *Rhizoctonia* on potato. Phytopathology 80:930-934.
- Carling, DE; Brainard, K; Virgen-Calleros, G; Olalde-Portugal, V. 1998. First report of *Rhizoctonia solani* AG-7 on potato in Mexico. Plant Dis. 82:127.
- Chet, I. 1987. *Trichoderma*: Application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In Chet, I. Ed. Innovative Approaches to Plant Disease Control. Wiley. p. 137-160.
- Chet, I; Baker, R. 1981. Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive of *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 71:286-290.
- El encalado de los suelos 1966. Centro Regional de Ayuda Técnica. Agencia para el Desarrollo Internacional. Ed. Libros de México. 35 p.
- Holt, JG; Krieg, NR; Sneath, PH; Staley JT; Williams, ST. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9 ed. Williams & Wilkins.
- Hooker, WJ. 1986. Compendium of potato diseases. APS. 125 p.
- Katan, J; Greenberger, A; Alon, H; Grinstein, A. 1976. Solar heating by polyethylene mulching for the control of disease caused by soilborne pathogens. Phytopathology 76:683-688.
- Katan, J. 1987. Soil solarization. In Chet, I. Ed. Innovative Approaches to Plant Disease Control. Wiley. p. 77-105.
- Kataria, HR; Verma, PR; Gisi, V. 1991. Variability in the sensitivity of *Rhizoctonia solani* anastomosis groups to fungicides. J. Phytopathol. 133:121-133.
- Lucas, GB; Campbell, CL; Lucas TL. 1985. Introduction to plant diseases. Identification and management. Westport Connecticut, Avi. 313 p.
- Otrysko, B; Banville, G; Asselin, A. 1985. Anastomosis group identification and pathogenicity of isolates of *Rhizoctonia solani* obtained from tuberborne sclerotia. Phytoprotection 66:17-23.
- Powelson, ML; Johnson, KB; Rowe, RC. 1993. Management of diseases caused by soilborne plant pathogens. In Rowe, RC. Ed. Potato health management. APS. p. 149-158.
- Virgen-Calleros, G; Olalde-Portugal, V; Rocha-Rodríguez, R. 1996a. Grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* K. en Guanajuato, México. Fitopatología. 42:16.
- Virgen C, G; Olalde, PV; Rocha R, R. 1996b. Biological and chemical control of *Rhizoctonia solani* on potato in Guanajuato Mexico. Phytopathology 86 (11):S118.