

**GENÉTICA DE POBLACIONES, RESISTENCIA Y EXPRESIÓN
DIFERENCIAL DE *Rhizoctonia solani* Kühn A FUNGICIDAS, SU RESPUESTA
A ANTAGONISTAS Y FITOQUÍMICOS**

FRANCISCO CASTILLO REYES

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS EN

PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO



Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Enero de 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

GENÉTICA DE POBLACIONES, RESISTENCIA Y EXPRESIÓN DIFERENCIAL
DE *Rhizoctonia solani* Kühn A FUNGICIDAS, SU RESPUESTA A ANTAGONISTAS
Y FITOQUÍMICOS.

TESIS POR:

FRANCISCO CASTILLO REYES

Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y aprobada como requisito
parcial, para optar al grado de:

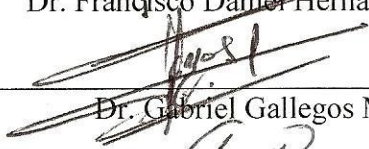
DOCTOR EN CIENCIAS
EN PARASITOLOGIA AGRICOLA

COMITE PARTICULAR

Asesor principal:


Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo

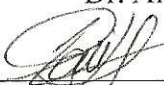
Asesor:


Dr. Gabriel Gallegos Morales

Asesor:

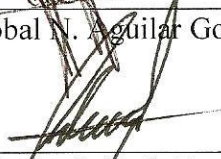

Dr. Alberto Flores Olivas

Asesor:


Dr. Raúl Rodríguez Herrera

Asesor:


Dr. Cristóbal N. Aguilar González


Dr. Fernando Ruíz Zarate
Subdirector de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila. Enero de 2012.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, por ser mi segundo hogar y haberme brindado la oportunidad de seguir formándome como profesionista.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme brindado el apoyo económico durante mi estancia doctoral.

Al Departamento de Parasitología Agrícola en general por haberme acogido tres años más durante mi formación doctoral. En especial a los maestros que integran el cuerpo docente de este gran Departamento, de los que me llevo un gran cúmulo de conocimientos y enseñanzas.

A mi cuerpo de asesores

Un profundo agradecimiento al Dr. Daniel Hernández Castillo por haber confiado en mí, por la paciencia, dedicación y tiempo invertido en la elaboración de artículos y revisión de esta tesis. De quien me llevo un gran aprendizaje.

Al Dr. Gabriel Gallegos Morales. Por su gran apoyo en la realización de esta tesis, así como, por su contribución en la revisión y elaboración de los artículos científicos.

Al Dr. Alberto Flores Olivas, por su disponibilidad, confianza y por sus grandes aportaciones hechas a este trabajo de investigación.

Al Dr. Raúl Rodríguez Herrera, Por su gran apoyo en la realización de esta tesis, así como, por su contribución en la revisión y elaboración de los artículos científicos.

Al Dr. Cristóbal N. Aguilar, por su disponibilidad, confianza y por sus grandes aportaciones hechas a este trabajo de investigación.

Al personal del laboratorio Silvia Nava Ovalle Nava y Cristina Sánchez Flores.

A mis compañeros y amigos del Postgrado de Parasitología Agrícola

DEDICATORIA

A MI FAMILIA

A mi esposa Claudia Adriana, por su impulso y comprensión. A mi Hija Valeria Rubi y Melissa por todo lo que representan en mi vida y por todo el tiempo que les debo.

A MIS PADRES

Don Horacio y Doña Carmen, a quien debo lo que soy, por su amor, consejos, cuidados y sacrificios.

A MIS HERMANOS

Maria Elena, Mirtha Arelly, José Soriel y Víctor Ramón.

A MIS MAESTROS DE TODA LA VIDA

Por tenderme la mano y sus conocimientos.

COMPENDIO

GENÉTICA DE POBLACIONES, RESISTENCIA Y EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE *Rhizoctonia solani* Kühn A FUNGICIDAS, SU RESPUESTA A ANTAGONISTAS Y FITOQUÍMICOS

POR:

FRANCISCO CASTILLO REYES

DOCTORADO EN CIENCIAS

PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. DICIEMBRE 2011.

Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo -Asesor-

Palabras clave: Genética de poblaciones, resistencia genética, fitoquímicos, antagonistas, inhibición micelial.

Se determinó la variabilidad genética de 57 cepas a nivel de grupo de anastomosis (GA) de *R. solani*, aislados de planta y tubérculos procedentes de lotes comerciales del cultivo de papa en las zonas agrícolas de los estados: Coahuila (Huachichil, San José del Vergel, San Juan del Prado, La Purísima), Nuevo León (Arramberry, El Potosí, Lucio Blanco, San Rafael, San Joaquín, Lote 17 y Lote 28), Chihuahua (Janos y Nuevo Casas Grandes), Sonora (Obregón) y de tubérculos importados de Canadá, a través de la

amplificación de la región 18's del rADN usando los Iniciadores RS1 (5'-CCTGTGCACCTGTGAGACAG-3') y RS4 (5'-TGTCCAAGTCAATGGACTAT-3') (Camperota *et. al.* 2000) y su posterior restricción con 4 enzimas (*MseI*, *AvaII*, *HincII*, y *MunI*). Así como bioensayos para determinar los niveles de resistencia a los fungicidas Pencycuron y Tiabendazol y el comportamiento de los individuos resistentes y susceptibles a antagonistas microbianos y a fitoquímicos extraídos de plantas.

Los resultados obtenidos con los diferentes patrones de restricción indican que 5.26% pertenecen a AG11, el 14.03% a AG1-1B y 80.7% a AG3 este último porcentaje coincide con lo señalado en la literatura científica por otros autores (Alonso *et. al.* 1994; Virgen *et. al.* 1996; Carling *et. al.* 1998). La alta presencia del AG3 puede estar correlacionada con la diseminación de dicho grupo por el tubérculo semilla.

La determinación de la susceptibilidad con los fungicidas Pencycuron y Tiabendazol, muestra que el crecimiento de todas las cepas de *R. solani* fue inhibido a una CI_{50} de 0.014 a 0.039 mg de i.a./l de pencycuron, la consideración bibliográfica señala que la CI_{50} de una cepa susceptible de *R. solani* es de 0.01 mg/L, con estos datos se determinó que el factor de resistencia (FR) de las cepas estudiadas que fluctuó entre 1.4 a 3.945. Para el Tiabendazol todas las cepas se inhibieron con CI_{50} de 0.82 a 2.91 mg de i.a./L, por lo que se consideran susceptibles ya que de acuerdo a Leach y Murdoch (1985) los valores de CI_{50} inferior a 3 mg/L son sensibles al fungicida. Los diferentes AG mostraron heterogeneidad en la sensibilidad a los fungicidas pencycuron y thiabendazol, siendo más tolerantes los grupos AG1-1B y AG11. Así mismo se

observa que hay una pérdida de sensibilidad en todos los grupos de anastomosis de *R. solani* a el fungicida pencycuron.

Los estudios de respuesta de *R. solani* moderadamente resistente al pencycuron con extractos obtenidos de plantas de *Larrea tridentata* (G), *Flourensia cernua* (H), *Agave lechugilla* (L), *Yucca filifera* (Y), *Carya illinoensis* (R), *Opuntia ficus-indica* (N) y *Lippia graveolens* (O) con los diferentes solventes etanol (E), agua (H), lanolina (L) y manteca de cacao (M), muestran diferencias en la inhibición micelial del fitopatógeno desde 0% hasta 100%, observándose que conforme se aumenta la dosis, se reduce significativamente el crecimiento micelial de *R. solani*. La prueba de medias de Tukey (0.05) indica que los tratamientos: *Carya*/etanol a 3000 ppm, *Lippia*/lanolina, *Opuntia*/etanol, *Agave*/etanol y *Flourensia*/etanol con dosis mayores a 200 ppm, *Flourensia*/manteca con dosis >1000 ppm, *Larrea*/lanolina con dosis >2000 ppm de polifenoles totales tienen un efecto del 100 % en la inhibición micelial de *R. solani*. La CI₅₀ de cada extracto sobre *R. solani* fue muy variable, la CI₅₀ más baja se obtuvo con *F. cernua* en etanol a 16.3 ppm y la más alta con *O. ficus-indica* en manteca de cacao a 9.9×10^6 ppm.

Por otra parte, los estudios para la recuperación de microorganismos con efecto antagonista de rizosfera *Larrea tridentata*, *Agave lechugilla*, *Yucca filifera*, *Opuntia ficus-indica*, *Agave sp.* y *Prosopis sp.* permitió la recuperación de 16 cepas de *Bacillus*, identificado a nivel de género por caracterización morfológica, tinción de endospora y tinción de Gram. Los resultados de inhibición in vitro por crecimiento dual expresan una

variación de 40.4 a 67% en la inhibición micelial de *R. solani* resistente al fungicida. Siete de las cepas de *Bacillus* se identificaron por secuenciación del ADNr 16'S y se clasificaron en las especies de *B. subtilis* (con cinco aislamientos), *B. pumilus* y *B. atrophaeus* con un aislamiento cada una.

ABSTRACT

**POPULATION GENETICS, RESISTANCE AND DIFFERENTIAL
EXPRESSION OF *RHIZOCTONIA SOLANI* KÜHN TO FUNGICIDES AND
THEIR RESPONSE TO ANTAGONISTS AND PHYTOCHEMICALS**

BY:

FRANCISCO REYES CASTILLO

DOCTOR OF SCIENCE

IN AGRICULTURAL PARASITOLOGY

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. DECEMBER 2011.

Dr. Francisco Daniel Hernandez-Castillo -Advisor

Keywords: population genetics, genetic resistance, phytochemicals, antagonist, inhibited mycelia.

In this study was determined the genetic variability of 57 strains at anastomosis group (GA) level of of *R. solani*, isolated from plants and tubers from commercial batches potato in different agricultural areas: Coahuila (Huachichil, San Jose del Vergel, San Juan del Prado, La Purisima), Nuevo Leon (Arramberry, El Potosi, Lucio Blanco, San Rafael, San Joaquin, Lot 17 and Lot 28), Chihuahua (Janos and Nuevo Casas Grandes),

Sonora (Obregon) and imported tubers from Canada. *Rhizoctonia* groups were identified PCR amplification of rDNA 18's using the follow primers RS1 (5'-CCTGTGCACCTGTGAGACAG-3 ') and RS4 (5'-TGTCCAAGTCAATGGACTAT-3') (Camperota *et. al.*, 2000) and subsequent restriction with 4 enzymes (*Mse* I, *Ava* II, *Hinc* II, and *Mun* I). Bioassays were performed to determine the *Rhizoctonia* resistance levels to the Thiabendazole and Pencycuron fungicides and behavior of resistant and susceptible individuals to microbial antagonists and phytochemicals extracted from semidesert plants.

The restriction patter resulted that the *Rhizoctonia* strains were identified as AG11 5.26%, AG1-1B 14.03% and AG380.7%, this classification coincides with the percentages reported by Alonso *et. al.* 1994, Virgin *et. al.* 1996, Carling *et. al.* 1998. The high presence of GA3 can be correlated with the spread of group by tuber seed.

The susceptibility determination of the *Rhizoctonia* strains to thiabendazole and Pencycuron fungicides shows that the growth of all strains of *R. solani* was inhibited with an IC₅₀ of 0.014-0.039 mg ai / L pencycuron, reports literature indicates that the IC₅₀ of a susceptible strain of *R. solani* is 0.01 mg / L, with these data it was determined that the resistance factor (FR) of studied strains fluctuated between 1.4 to 3.945. For thiabendazole all strains were inhibited with IC₅₀ of 0.82 to 2.91 mg ai / L, so it is in concordance to results reported by Leach and Murdoch (1985), where strains with IC₅₀ values of less than 3 mg / L are sensitive to thiabendazole fungicide. Different AG showed heterogeneity in sensitivity to the thiabendazole and pencycuron fungicides being AG11 and AG1-1B the most tolerant groups.

The response of moderately resistant to pencycuron *R. solani* was evaluated against extracts from *Larrea tridentata* (G), *Flourensia cernua* (H), *Agave lechugilla* (L), *Yucca filifera* (Y), *Carya illinoensis* (R), *Opuntia ficus-indica* (N) and *Lippia graveolens* (O) obtained using different solvents (ethanol (E), water (H), lanolin (L) and cocoa butter (M)). In this study were found differences on mycelia growth inhibition from 0% to 100%. Mycelia growth inhibition was extract dose dependent, as extract concentration increase, Tukey mean comparison indicates that: *Carya* / Ethanol 3000, *Lippia* / Lanolin, *Opuntia* / ethanol, *Agave* / ethanol and *Flourensia* / ethanol at doses higher than 200, *Flourensia* / butter with doses > 1000, *Larrea* / lanolin at doses > 2000 ppm of polyphenols have an effect of 100% inhibition of *R. solani* mycelia. The IC₅₀ of each extract on *R. solani* was highly variable; the lowest IC₅₀ was obtained with *F. cernua* in ethanol to 16.3 ppm and the highest with *O. ficus-indica* in cocoa butter to 9.9 X10⁶ppm.

Studies for isolation antagonist microorganisms from cactus, agave, palm, governor, mesquite and lechuguilla rhizosphere against *R. solani* allowed the identification of 16 *Bacillus* strains, which were identified by morphological, Gram and endospore staining and rDNA 16's sequencing. The results of growth inhibition *in vitro* by dual technique express a range of 40.4 to 67% on the growth mycelia inhibition of fungicide resistant *R. solani* strains. Seven of these strains were identified by 16S rDNA sequencing, five on *B. subtilis*, one on *B. pumilus* and one on *B. atrophaeus*.

ÍNDICE GENERAL

	Pagina
ÍNDICE GENERAL	xii
ÍNDICE DE CUADROS	xv
ÍNDICE DE FIGURAS	xvi
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	5
Generalidades.....	5
El género <i>Rhizoctonia</i>	6
La especie <i>R. solani</i>	8
Anastomosis.....	9
Mecanismos y tipos de Fusión hifal.....	11
Grupos de anastomosis, grupos intraespecíficos	12
Determinación de grupos de anastomosis.....	14
Condiciones de temperatura y humedad en crecimiento y desarrollo de <i>R. solani</i>	15
Descripción y composición físico-química de pared celular de <i>R. solani</i>	16
Métodos de control	16
Cultural	16
Químico	17
Biológico	18

Fito-químico	19
Variabilidad genética de <i>Rhizoctonia solani</i>	20
Sensibilidad y Resistencia de los grupos anastomosis de <i>Rhizoctonia solani</i> a Fungicidas	21
Efectividad de fitoquímicos en la inhibición de <i>Rhizoctonia solani</i>	24
<i>Bacillus</i> en el control de <i>Rhizoctonia solani</i>	27
Descripción de <i>Bacillus</i>	27
Eficacia de <i>Bacillus</i> en el control de <i>R. solani</i>	28
Ciclo biológico de <i>Bacillus</i>	30
Factores que afectan la formación de la endospora	33
Técnicas de aislamiento	33
 ARTICULO CIENTIFICO I	
Genética de poblaciones de <i>Rhizoctonia solani</i> Kühn y su resistencia a fungicidas	37
 ARTICULO CIENTIFICO II	
Efecto antagónico de <i>Bacillus</i> spp aislado de rizosfera de plantas del semidesierto chihuahuense sobre <i>Rhizoctonia solani</i> kühn.....	64
 ARTICULO CIENTIFICO III	
<i>In vitro</i> Antifungal Activity of Plants Extracts Obtained with Alternative Organics Solvents Against <i>Rhizoctonia Solani</i> Kühn.....	83

ARTICULO CIENTIFICO IV

<i>Lippia graveolens</i> and <i>Carya illinoensis</i> Organic Extracts and their <i>in vitro</i> Effect Against <i>Rhizoctonia Solani</i> Kühn	103
CONCLUSIONES GENERALES	120
LITERATURA CITADA	122

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadros		Página
1	Clasificación de reacción de anastomosis para delimitar los grupos de anastomosis en <i>R .solani</i>	10
2	Efectividad de diferentes fungicidas sobre la especies de <i>Rhizoctonia</i>	17
3	Lista de grupos de anastomosis del complejo <i>Rhizoctonia solani</i> , con información acerca de sistema de apareamiento, marcadores moleculares y estructura de la población.....	20
4	Actividad fungicida in vitro CI 90 (mg i.a./ l) contra diez grupos de anastomosis de <i>Rhizoctonia solani</i> (Kataria, <i>et. al.</i> , 1991).....	21

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ciclo de vida de <i>B. subtilis</i> ,	31

INTRODUCCIÓN

En el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.), el hongo *Rhizoctonia solani* Kühn telomorfo de [*Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk] es uno de los patógenos que inciden provocando síntomas y signos en diferentes partes de la planta: raíz, brotes, tallos, estolones y tubérculos (Carling *et. al.*, 1989). Su incidencia durante el cultivo provoca pérdidas en producción que varían entre un 7 y 64% Hernández *et. al.* (2001) y hasta un 100% en calidad. *R. solani* incide de forma endémica durante todo el ciclo del cultivo por lo que su control depende de la aplicación de fungicidas desde su establecimiento, mas sin embargo, el uso indiscriminado de estos tiene consecuencias ya que se han detectado aislamientos resistentes a los ingredientes activos de Pencycuron (Hernández, *et. al.*, 2005), además también hay evidencias importantes de una grave contaminación derivada de estas aplicaciones, que no sólo afecta a la flora y la fauna, sino también contribuye al deterioro en la calidad del aire, agua, suelos y alimentos, así como en la salud humana, (Albert, 2004) . La búsqueda de maximizar la eficiencia del control de las enfermedades en campo, es determinante los estudios sobre el monitoreo de las poblaciones a la sensibilidad de los fungicidas empleados, que permitan el conocer el comportamiento del grado de sensibilidad de dichas poblaciones del hongos en campo. Así mismo, la necesidad de encontrar mecanismos que eleven la productividad del campo ha impulsado el desarrollo de nuevas estrategias de control de enfermedades agrícolas que sean alternativas eficientes al control químico y que además

disminuyan bajar el riesgo ambiental y sanitario sin arriesgar la salud humana, (Gallegos *et. al.*, 2004; Zavaleta, 1999). En el suelo existe una gran variedad de microorganismos, formada por una mezcla de actinomicetos, hongos, bacterias, protozoarios, etc. Siendo mayor su distribución en la zonas adyacentes de la rizosfera y fisiológicamente más activa (Guetsky *et. al.*, 2001). La gran diferencia en la diversidad biológica entre un ecosistema natural y un agro ecosistema es causado por la declinación de la biomasa en este último. Esta reducción, es usualmente causada por una disminución en el contenido de materia orgánica y por la pérdida en la diversidad en las plantas dadas por el monocultivo. Las comunidades microbianas que ocurren naturalmente en la rizosfera juegan un papel en la sanidad del sistema radical. Esta interrelación entre el tejido de la raíz y la comunidad microbiana del suelo es significativamente más intensa que la encontrada en la parte aérea (Vilich and Sikora, 1998). Por otra parte, el estudio de la estructura genética de poblaciones de fitopatógenos de suelo tanto a nivel de frecuencia y variación genética dentro y entre poblaciones es importante para entender la biología y el comportamiento de las poblaciones de patógenos para la mejor implementación de las estrategias de control de estos. Dicha información puede ser usada para inferir el relativo impacto de las diferentes fuerzas evolutivas que influyen la biología de las poblaciones de patógenos y con esto predecir el potencial de evolución de las poblaciones dentro de ecosistemas agrícolas (Leung *et. al.* 1993), La información generada puede contribuir a una mejor comprensión del patosistema *Solanum tuberosum- R. solani* y por consiguiente coadyuvar al diseño de nuevas estrategias de manejo.

Objetivos

- 1.- Determinar la estructura genética de la especie y grupos de anastomosis de *R. solani* más comunes en las diferentes regiones productoras de papa (*Solanum tuberosum*) en México.
- 2.- Estimar el grado de resistencia de los grupos de anastomosis más comunes de *R. solani* a los fungicidas pencycuron y tiabendazol.
- 3.- Medir la actividad antifúngica *in vitro* de microorganismos aislados de la rizosfera y fitoquímicos de plantas del semidesierto contra cepas de *R. solani* resistentes a los fungicidas Pencycuron y tiabendazol.

Hipótesis

- 1.- Existe diferencias en la estructura genética de las poblaciones de *R. solani* dependiendo del manejo del cultivo y las condiciones ambientales de las distintas regiones productoras de papa en México, por lo tanto las poblaciones con un mayor potencial evolutivo tendrán una mayor probabilidad de generar genotipos fúngicos más resistentes a los fungicidas o que puedan escapar a programas de control de enfermedades.
- 2.- Los microorganismos aislados de la rizosfera de plantas del semidesierto coahuilense pueden actuar como agentes de biocontrol en la supresión de la enfermedad costra negra del cultivo de la papa.

3. Los polifenoles totales extraídos de especies vegetales del semidesierto obtenidos con solventes alternativos tendrán efecto en la inhibición del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani*.

REVISION DE LITERATURA

Generalidades

La pudrición de raíz es una enfermedad común en muchos de cultivos en todo el mundo; dentro de los agentes causales, se encuentra el hongo *Rhizoctonia solani* (teleomorfo: *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk; Sin. *Pellicularia filamentosa*) (Hooker, 1990). En México se le encuentra atacando el cultivo de la papa (Carling, *et. al* 1988; Hernández *et. al.*, 1993, 2006; Virgen *et. al.*, 2000), frijol (López, *et. al.*, 2005), Chile (Guillen, *et. al.*, 2006). En la naturaleza, *R. solani* existe principalmente como micelio vegetativo y/o esclerocio, ataca principalmente las partes subterráneas tales como semillas, hipocotilos, raíces, estolones, pero también es capaz de infectar partes aéreas como yemas, frutos, hojas y tallos (Agris, 2005).

El síntoma más común de infecciones por *Rhizoctonia* es referido como damping-off, caracterizado por la no germinación de semilla severamente infectada. Las plántulas infectadas pueden morir antes y después de la emergencia, mientras que las plántulas que sobreviven presentan canchales, que son lesiones café rojizas sobre tallos y estolones (López, *et. al.*, 2005). De esta manera el género *Rhizoctonia* se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo, tanto en suelos cultivados como no cultivados. Ecológicamente, estas especies están diversificadas y pueden ser patógenos

de numerosas especies vegetales o desarrollarse como saprofitos en el suelo (Ogoshi, 1987). El principal problema atribuido a *Rhizoctonia* es el causar importantes pérdidas en la mayoría de las plantas anuales, incluyendo malezas, casi todas las hortalizas, numerosos cultivos y también en las plantas perennes como pastos para césped, plantas de ornato, arbustos y árboles (Agrios, 1997).

El género *Rhizoctonia*

Este género fue descrito por primera vez por De Candolle en 1815, quien designó a *R. crocorum* (Pers.) DC como la especie tipo, mientras que *R. solani*, la más importante de las especies de este género, fue descrita por Kühn en 1858. Las especies de este género presentan estados teleomorficos pertenecientes a diferentes familias, órdenes e incluso clases. Hay actualmente alrededor de 120 especies, variedades o formas especiales descritas. Algunas han sido erróneamente identificadas y no corresponden a éste género (Holliday y Punithalingam 1988, citado por NCBI, 2010), mientras otras se consideran sinónimos de especies descritas anteriormente (Ogoshi, 1996). Así mismo se señala que los teleomorfos de estas especies reconocidas se encuentran en cinco géneros distintos. Estos teleomorfos relacionados son *Helicobasidium*, *Tanatephorus*, *Ceratobasidium*, *Waitea*, *Tulasnella* y *Sebacina*. *Helicobasidium* solo contiene el tipo de especie *R. crocorum* (Ogoshi, 1996).

Las características taxonómicas importantes de este género incluyen de acuerdo (Blazier y Conway, 2004):

1. Ausencia de esporas asexuales o conidios

2. Ramificación de las hifas vegetativas cerca del septo distal de las células jóvenes.
3. Constricción de la ramificación.
4. Célula hifal binucleadas y multinucleada.
5. Micelio pigmentado.
6. Esclerocios presentes a ausentes color café oscuro, redondos, pequeños (menor 1 mm).
7. Formación de un septo en la ramificación cerca del punto de origen.
8. Septo tipo doliporo.
9. Precencia de células moniloides (no son consideradas conidios).
10. Esclerocios no diferenciados en corteza y médula.

Basados en las características antes mencionadas, los aislamientos de este género se han dividido en tres grupos: uno es *Rhizoctonia* multinucleada, que posee tres o más núcleos por célula, hifas grandes (de aproximadamente 6-10 mm de diámetro), y el teleomorfo pertenece al género *Tanatephorus* Donk.

El segundo grupo, incluye a *R. oryzae* y *R. zaeae*, los cuales son multinucleados y tienen el teleomorfo en el género *Waitea* Warcup y Talbot (Ogoshi, 1987).

Otro grupo es el de *Rhizoctonia* binucleada, el cual tiene solamente dos núcleos por célula (raramente uno o tres), hifas pequeñas (de 4-7 mm de diámetro), y el teleomorfo pertenece al género *Ceratobasidium* Rogers. Las especies de *Rhizoctonia* binucleadas pueden funcionar como fitopatógenos; sin embargo la mayoría exhibe un hábito saprofita o menos común han desarrollo asociación simbiótica con plantas.

Muchas especies de *Rhizoctonia* binucleadas han sido descritas por Carling y Sumner (1992). El sistema más ampliamente usado para clasificación de aislamientos binucleados es el propuesto por Sneh *et. al.*, (1991) quien clasifica las *Rhizoctonia* binucleadas dentro de GA-A a la S (Tewoldemedhin, *et. al* 2006).

La Especie *Rhizoctonia solani* Kühn.

El hongo *R. solani* es el estado asexual del Basidiomycete *Tanatephorus cucumeris* (Frank) Donk. (Jager *et. al.*, 1982). Menzies (1970) señala que Julius Kühn observó en 1858 a un hongo sobre tubérculos de papa designándolo *R. solani*. Agrios (1997) señala que *T. cucumeris* se clasifica dentro del Género *Tanatephorus*, Orden Ceratobasidiales, Phylum Basidiomycota.

R. solani pertenece al grupo de las Rhizoctonias multinucleadas caracterizadas por presentar tres o más núcleos hasta 15 por célula (Hernández, *et. al.*, 2001), hifas grandes con diámetro aproximado de 7-12 μm , color variable del micelio (desde blanco, amarillo hasta café), así como forma, tamaño y color de los esclerocios variable (Hernández *et. al.*, 2001).

La identificación se realiza comprobando género y especie por el método de tinción de núcleos de hifas jóvenes de 1-3 días con algún colorante y su observación al microscopio a 100X (Burpee *et. al.*, 1978). Determinado por las siguientes características:

- Células multinucleadas (presencia de 3 o mas núcleos)
- Diámetro de hifa (7-12 um).

Los colorantes más utilizados son azul de anilina, tripano, diamina fenil indol, giemsa, naranja de acridina, orceina y safranina O, quienes tienen propiedades diversas y se refleja en la observación final, al permitir un mayor o menor contraste en la visualización de núcleos, (Cedeño, 2008).

La metodología más empleada es la desarrollada por Sneh *et. al.* (1991), que hace uso del colorante safranina O (que consiste en mezclar 6 ml de safranina al 5%, 10 ml de KOH al 3%, 5 ml de glicerina y 79 ml de agua destilada estéril), la tinción se realiza en portaobjetos, y se observa al azar con el objetivo 100X.

Anastomosis.

Debido a la diversidad o heterogeneidad de características en esta especie, su principal forma de clasificación es a nivel de grupos más homogéneos a través de su reacción de anastomosis (GA). En 1970 Parmeter y Whitney hicieron un reconocimiento general de la reacción de anastomosis hifal como método para dividir cepas de *R. solani* en grupos más homogéneos y más comprensibles. Carling y Summer (1992) señalan que los primeros reportes de la reacción de anastomosis datan desde hace más de 60 años en los escritos de Matsumoto, quien utilizó por primera vez esta característica, de reacción de hifas de anastomosis, para diferenciar cepas de *Hypochnus sasakii* Shirai (= *R. solani*).

Agrios (1997) define anastomosis, como la fusión de hifas que entran en contacto. Anderson (1982) la define como la manifestación de una incompatibilidad somática o vegetativa entre cepas diferentes pero relacionadas entre sí. Parmeter y Whitney (1970) definen la anastomosis no como una característica de diagnóstico por sí misma, si no como un criterio para el reconocimiento de las especies. Las hifas de los aislamientos que pertenecen a un mismo grupo de anastomosis (AG) se atraen y se conectan o fusionan una con otra sin causar su muerte, mientras que aislamientos de distintos AG reaccionan entre sí provocando muerte celular. Los mismos autores citan a Matsumoto *et. al.* (1932) quienes reconocieron, que la anastomosis en *R. solani* es un proceso complejo, y encontró que existen diversos grados de anastomosis. Se reporta que algunos de los aislamientos se fusionan para mezclar su citoplasma. Otros aislamientos fusionan sus paredes celulares pero el citoplasma de las células fusionadas no se mezcla, mientras que otros aislamientos no se fusionan. Otras observaciones han mostrado además que la mezcla de citoplasmas a menudo lleva a una muerte de las células fusionadas y en ocasiones, de las células adyacentes cuando no corresponden a un mismo grupo de anastomosis. De esta manera, según Cubeta y Vilgalys (1997) agrupan en cuatro clases de anastomosis a *R. solani*, considerando el grado de interacción (cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación de reacción de anastomosis hifal usando los criterios de MacNish *et. al.* Para de limitar los grupos de anastomosis en *R.solani*. Tomado de Cubeta y Vilgalys (1997).

Reacción	Fenotipo	Naturaleza de la relación genética entre aislados.
C0: No interacción	No hay reconocimiento.	Los aislados no tienen relación genética y pertenecen a diferentes AG.
C1: Contacto entre hifas	No hay evidencia de contacto de pared o membrana, la reacción puede o no causar muerte de célula.	Los aislados tienen distinta relación genética pertenecen al mismo o diferente AG.
C2: reacción de muerte	Fusión de pared (anastomosis) evidente, con muerte de células anastomosadas y células adyacentes, respuesta de incompatibilidad somática visible.	Los aislados representan genéticamente individuos distintos en mismo AG.
C3: fusión Perfecta	Fusión de pared y membrana evidente, punto de anastomosis no claramente visible, muerte celular ausente.	Los aislados son genéticamente idénticos o cercanamente relacionados, los individuos pertenecen al mismo AG y pueden representar un clon.

Una anastomosis exitosa sin embargo, se puede considerar como evidencia de que los micelios representan a una misma especie, particularmente en especies como *R. solani*, en la cual la anastomosis involucra factores de compatibilidad (Parmeter y Whitney, 1970).

Mecanismos y Tipos de Fusión de Hifas.

En el proceso de fusión de hifas se distingue, una fusión perfecta y una imperfecta, radicando la diferencia en que en la última de éstas, concretada la fusión de las hifas, se produce muerte celular (Ogoshi, 1987).

La fusión perfecta de las hifas de *R. solani* se resume como sigue: crecimiento de las hifas, secreción de una o más sustancias atrayentes, atracción a las sustancias, contacto entre las hifas, cese del crecimiento de las hifas, formación de proyecciones tipo rama, disolución de las paredes celulares y conexión del protoplasto. Un aislamiento de un AG puede reconocer y fusionarse sólo con miembros del mismo AG. Una hifa puede ser atraída por otra desde una distancia de 100 mm, cuando la punta de la hifa cambia su dirección de crecimiento hacia la otra hifa hasta establecer contacto físico. Esta atracción sólo podría ser causada por sustancias secretadas por una hifa del mismo AG y se asume que estas sustancias son distintas entre los AGs (Ogoshi, 1987).

Grupos de Anastomosis, Grupos Intraespecíficos.

De lo anterior podemos definir un grupo de anastomosis (AG) como una colección de aislamientos cercanamente relacionados, agrupados en base a la capacidad de anastomosarse (Carling, 1996).

La determinación de la reacción de anastomosis entre aislamientos de *R. solani* se efectúa al enfrentarse a una distancia de 2-3 cm sobre placas Petri con medio de cultivo agua agar, discos con los micelios de una cepa de referencia y el micelio de la cepa a identificarse, se incuban para que crezcan y se sobrepongan (entrelacen), lo cual puede ser observado con un microscopio de luz. De ocurrir una fusión de hifas, se sostiene que los aislamientos confrontados corresponden al mismo AG, observándose a menudo que posterior a la fusión de las hifas se produce una muerte de células adyacentes a la zona de contacto. Si la atracción y fusión de hifas ocurre, pero no se

produce una muerte celular, los aislamientos en confrontación también pertenecen al mismo AGs, por lo que atracción y muerte de células son confiables y seguras evidencias para detectar fusión de hifas y establecer AGs (Ogoshi, 1987).

Esta acción destructiva “killing reaction” entre los aislamientos de un mismo grupo de anastomosis es la expresión de una incompatibilidad somática o vegetativa. Dicha incompatibilidad somática limita la exogamia (mezcla de cepas) a unos pocos apareamientos compatibles. La existencia de los grupos de anastomosis representan el aislamiento genético de las poblaciones en cada grupo (Agrios, 1997). Carling (1996) explica que usando la reacción de anastomosis de hifas uno puede colocar todos los aislamientos de *R. solani* en uno u otro AG, sin embargo, está también la existencia de aislamientos puente que dificultan la colocación de un aislamiento en un AG apropiado. Los aislamientos puente son aislamientos que presentan hifas de anastomosis las que reaccionan con aislamientos de más de un AG. Estos AGs puente son descritos genéticamente para diferenciarlos uno de otro, sin embargo, su existencia indica que la separación por grupos no es una vía definitiva.

Así mismo se han desarrollados otros métodos basados en ADN con técnicas moleculares sobre el análisis de restricción del ADN ribosomal para la determinación de estos grupos de anastomosis (Guillemout *et. al.*, 2003).

De esta manera tenemos dos técnicas para separación de los grupos y subgrupos de anastomosis: la tradicional por confrontaciones de los aislados de campo con cepas de

referencia o colección y la otra por análisis de restricción del ADN ribosomal. El estudio de la anastomosis ha permitido diferenciar varios grupos y subgrupos en *R. solani*.

Los estudio de anastomosis en el hongo *Rhizoctonia solani* (Kühn) ha permitido diferenciar esta especie heterogénea compuesta de grupos subespecíficos llamados grupos de anastomosis (GA) definidos sobre la base de reacción de anastomosis hifal. De los que se han descrito 14 grupos que son: AG-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, y -BI (Carling *et. al.*, 2002b; González, 2002; Guillemaut *et. al.*, 2003).

Determinación de los Grupos de Anastomosis

La determinación de los grupos de anastomosis, como ya se señaló anteriormente se puede efectuar por dos técnicas:

1. Por el método de confrontación con cepas de referencia- método desarrollado por Parmeter *et. al.*, (1989) el cual consiste en extraer con un sacabocado un disco de 4 mm de diámetro del aislamiento de referencia y del aislamiento a identificar y colocarlo en un portaobjeto estéril a 3 cm de separación uno de otro, se cubrirá con medio agua-agar al 2% e incubara a 24°C por 48 h en oscuridad para el traslape de puntas de hifa (anastomosis) y observar al microscopio compuesto a 100X, tiñendo previamente con floxina-B considerando al menos 5 puntos de fusión hifal perfecta como una reacción de anastomosis positiva.

2. Análisis de restricción del ADN ribosomal por PCR. Se requiere el aislamiento de ADN, para ello ya existen protocolos optimizados, el desarrollo de iniciadores (Primer) para amplificación en PCR (primers: RS1 (5'-CCTGTGCACCTGTGAGACAG-3') and RS4 (5'-TGTCCAAGTCAATGGACTAT-3') (Camperota *et. al.*, 2000).

Descripción y Composición Físico-Química de la Pared Celular de *Rhizoctonia*.

Los componentes principales que forman parte de la pared celular del hongo *R. solani* y de la mayoría de los hongos, son los carbohidratos quitina, *B*-1,3-glucano y proteínas, conteniendo significativamente más *B*-1,3-glucano que quitina (Russell *et. al.*, 1994; Cornelia *et. al.*, 2000).

La quitina, es un compuesto similar a la celulosa; constituye el soporte de los tejidos de los organismos como el exoesqueletos de los artrópodos (crustáceos y los insectos), tegumento de nematelmintos (lombrices intestinales), y en las membranas celulares de ciertos grupos de bacterias y hongos.

Ambos componentes son degradados por otros microorganismos tanto hongos como bacterias que producen estas enzimas líticas (quitinasas y *B*-1,3- glucanasa) y que son utilizados en control biológico.

Variabilidad Genética de *Rhizoctonia solani*.

Desde el punto de vista genético *R. solani* presenta una gran variación que se manifiesta en la separación de los diferentes grupos de anastomosis presentes en la especie (14 Grupos). Estas diferencias se observan a nivel de morfología de crecimiento de la colonia, tasa de crecimiento, color de micelio, forma de esclerocios (Hernández *et. al.*, 2006), así mismo, cada grupo por si mismos expresan diferencias en características fenotípicas, de patogenicidad, de sensibilidad a fungicidas, de compatibilidad genética, de adaptabilidad geográfica, y tipo de apareamiento. Dichas diferencias se han obtenido al estudiar la diversidad de la población por diversas pruebas de patogenicidad, características morfológicas, enzimas y proteínas intra y extracelular, ácidos grasos celulares y técnicas moleculares, como los fragmentos de restricción polimorfismo de longitud (RFLP), secuencia simple repetidas de reacción en cadena de polimerasa (PCR-SSR), amplificación al azar ADN polimórfico (RAPD), y el elemento repetitivo PCR (Rep-PCR) (Taheri *et. al.*, 2007).

A pesar de que la mayoría de grupos presentan un sistema de cruce homotalico y su estructura poblacional es clonal con probabilidad de efectuarse entrecruzamiento (Cuadro 3), no hay estudios acerca del comportamiento del flujo genético y del efecto de este en la resistencia a fungicidas.

Cuadro 3. Lista de grupos de anastomosis del complejo *Rhizoctonia solani*, con información acerca de sistema de apareamiento, marcadores moleculares y estructura de la población.

Grupo de anastomosis	Sistema de Apareamiento	Marcadores Genéticos empleados	Estructura de la Población
AG1	Principalmente heterotalico ^b	Izoenzimas, rADN y RAPD RFLP	Entrecruzamiento
AG2	Presumiblemente homotalico	Izoenzimas, rADN y RAPD RFLP	Clonal / Entrecruzamiento
AG3	Presumiblemente homotalico	Isoenzimas, Huellas de ADN, rADN, scn ADN RFLP	Clonal / Entrecruzamiento
AG4	Principalmente heterotalico ^b	rADN y RADP RFLP	Entrecruzamiento
AG5	?	rADN RFLP	?
AG6	?	rADN RFLP	?
AG7	?	rADN RFLP	?
AG8	Principalmente heterotalico ^b	Isoenzimas. Huellas de ADN, rADN y RAPD RFLP	Clonal / Entrecruzamiento
AG9	?	Isoenzimas y rADN RFLP	?
AG10	?	rADN RFLP	?
AG11	?	?	?
AGBI	?	?	?

^a RAPD = amplificación al azar del ADN polimórfico; rADN = ADN ribosomal, RFLP = restricción de los fragmentos de longitud polimórfica; scn ADN = ADN nuclear de simple copia; ? = Datos no disponibles.

^b AG con sistema de cruce heterotalico aunque puede exhibir un comportamiento homotalico, así como el proceso conocido como fructificación homocariótica.

Condiciones de Temperatura y Humedad en el Crecimiento y Desarrollo de *Rhizoctonia solani*.

En condiciones favorables de temperatura y humedad, los esclerocios del hongo germinan y producen crecimiento del micelio capaz de extenderse 7-10 cm hasta llegar

a una fuente de alimentación. Las condiciones cálidas y húmedas son más propicias para el desarrollo de la enfermedad. A temperaturas de 25-27°C, el intervalo de infección a desarrollo inicial puede ser 36 a 48 h. Las temperaturas mínimas y máximas para el crecimiento del micelio son 5 y 36°C (Michael y Staff, 2000), con una temperatura optima de crecimiento de entre 20 a 30°C (Blazier y Conway, 2004).

Estudios de laboratorio sobre la infección de fríjol por *Rhizoctonia* se que ocurre con un nivel máximo a 27 ° C y un 20% de la capacidad de retención de la humedad del suelo en estudios de laboratorio. Sin embargo, en otros estudios se demostró que los niveles de la humedad del suelo 0,1 a 1,5 MPa, tuvieron poco efecto sobre *R. solani* AG-2-1 en la infección de plántulas de canola tanto en campo como en invernadero (Dorrance *et. al.*, 2003).

Métodos de Control de *Rhizoctonia*

Control Cultural.

R. solani es un patógeno difícil de controlar, ya que no existen medidas de prácticas y efectivas por ejemplo; la desinfección del suelo es efectiva, pero usualmente es impráctica; la rotación de cultivos puede tener efectos benéficos, pero dada la presencia de los grupos de anastomosis del patógeno que afecta a diferentes cultivos o a un grupo de cultivos, la rotación deja de ser una práctica efectiva (Sneh *et. al.*, 1991). La resistencia genética de la planta al patógeno no se conoce actualmente, dada la gama de

hospederos y los tratamientos químicos aplicados al tubérculo no son muy eficientes, porque los diferentes grupos muestran un efecto de sensibilidad también diferente.

En México, *R. solani* ocasiona pérdidas hasta del 30% en la producción de lechuga (Gutiérrez y Romero, 1980), y superiores al 50 en el cultivo del frijol (Campos, 1987) citados por Hernández *et. al.*, 1993.

Control Químico.

Para el control de *R. solani* se emplean diversas materias activas (Cuadro 2). Con diferente grado de eficiencia tanto *in vitro* como en campo. Dicha diferencia está condicionada por el grupo de anastomosis en particular asociado a la enfermedad. Por ejemplo el tocliflosetil inhibe en un 100 % el desarrollo del hongo *in vitro*, mientras que en campo azoxystrobin y pencycuron tienen un alto grado eficacia contra el desarrollo de esclerocios sobre tubérculos (Virgen *et. al.*, 2000).

Cuadro 2. Efectividad de diferentes fungicidas sobre la especies de *Rhizoctonia*.(Tomado de Kataria *et. al.*, 1991)

Fungicida	Familia	Actividad fungicida (CE 90, mg/L)		
		<i>C. cereale</i>	<i>T. cucumeris</i>	<i>W. circinata</i>
Cyproconazole		2	4	0.4
Flusilazole		9	76	2
Propiconazole		56	34	1
Triadimenol		8	11	6
Prochloraz		>100	>100	>100
Imazalil		11	>100	11
Fenarimol		80	>100	12
Fenpropimorph		90	16	0.7
Pencycuron		>100	1	>100
Tolclofos.methyl		2	1	2
Benomyl		17	12	3
Carboxin		9	10	11
Benodanil		3	3	24
Iprodione		3	2	44

La diferencia en la efectividad de los fungicidas también es muy marcada dentro de los grupos de anastomosis de *R. solani* teniendo el caso de que aislamientos del G4 tolera más o se requiere de mayor concentración de ingrediente activo del pencycuron para inhibir su desarrollo que los aislamientos del G3 (Hernández *et. al.*, 2001)

Control Biológico.

El control biológico de *Rhizoctonia* ha sido estudiado ampliamente como una alternativa al control químico. Varios organismos como *Pseudomonas* spp., *Trichoderma* spp., *Rhizoctonia* binucleadas (BNR), *Bacillus subtilis*, *Gliocladium virens* y *Stachybotrys elegans* (Hwang y Benson, 2002; Poromarto,*et. al.*, 1998; Cornelia *et. al.*,

2000; Virgen *et. al.*, 2000; Russel *et. al.*, 1994; Hernández *et al.*,), se han identificado como agentes de biocontrol efectivo. Uno de los mayores contrastes del biocontrol para patógenos de raíz es que un agente de biocontrol puede no proveer un buen efecto, particularmente si el agente de biocontrol no presenta competencia de rizosfera (Russel *et. al.*, 1994).

El antagonismo opera por diversas formas: antibiosis, competencia, prefación o parasitismo. Este último involucra la producción de varias enzimas hidrolíticas que degradan la pared celular de los hongos. En donde las enzimas hidrolíticas clave son la quitinasa y B-1,-3 glucanasa, mismas que son producidas tanto por hongos y bacterias (Russel *et. al.*, 1994).

Fitoquímicos.

Los tejidos vegetales son muy activos en la síntesis de metabolitos secundarios o fitoquímicos (Sora, 1984; Esau, 1997; Fahn, 1974) al ser importantes para la fisiología de las plantas y contribuir a la resistencia a microorganismos, insectos y animales herbívoros que las pueden afectar (Haslam, 1996), ayudan a preservar la integridad de la planta ante una continua exposición a estresantes ambientales, incluyendo radiaciones ultravioletas, relativamente altas temperaturas y la deshidratación (Shetty, 1997; Strycharz y Shetty, 2002).

Existen reportes que mencionan que los extractos de distintas plantas tienen propiedades fungicidas sobre las especies de hongos fitopatógenos, por lo que tienen un

gran potencial agrícola (Hossein y Maldonado, 1982; Hernández *et al.*, 2011). El uso de estas plantas desde la antigüedad como medicina alternativa o tradicional es debido a que poseen ciertas características particulares que las hacen de mayor interés para su explotación y por lo tanto se les da un valor agregado al ser sometidas a procesos biotecnológicos benéficos para la salud.

Sensibilidad y Resistencia de los Grupos Anastomosis de *Rhizoctonia solani* a Fungicidas.

Como se ha mencionado anteriormente, la genética de *R. solani* es muy compleja, lo que influye en la sensibilidad a los diferentes fungicidas empleados para su control en la mayoría de los sistemas de producción agrícola, tal como se aprecia en el cuadro 4, ya existen diferencias en la sensibilidad a los fungicidas a nivel de grupo a anastomosis lo que hace complejo su manejo en campo (Kataria *et. al.*, 1991).

Cuadro 4. Actividad fungicida in vitro CI 90 (mg i.a./ l) contra diez grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* (Kataria *et. al.*, 1991).

Fungicida	Grupos de Anastomosis de <i>Rhizoctonia solani</i>									
	AG1	AG2-1	AG2-2	AG3	AG4	AG5	AG6	AG7	AG8	AG9
Carboxin	19.0	9.3	42.0	140	11.0	70.0	7.5	1.7	0.6	2.4
Fermecyclox	11.0	2.0	2.1	40	2.6	2.5	1.4	1.3	0.2	0.3
Thiabendazole	3.2	40	33.0	2.5	5.2	14.0	5.4	7.0	9.0	11.0
Pencycuron	>500	300	0.2	.02	>500	>500	0.6	>500	>500	3.6
Tolclofos metil	<0.1	0.3	0.4	0.3	0.5	0.4	0.4	0.3	1.1	0.4
Iprodione	1.8	3.4	2.7	1.9	2.7	2.5	2.1	4.0	3.0	4.6
Vinclozolin	7.5	37.5	45.0	25.0	16.0	10.0	10.0	7.8	49.0	48.0

Cuadro 4. Continuación.

Fungicida	Grupos de Anastomosis de <i>Rhizoctonia solani</i>									
	AG1	AG2-1	AG2-2	AG3	AG4	AG5	AG6	AG7	AG8	AG9
Cyproconazole	0.5	8.5	11.0	10.0	17.0	17.0	1.0	0.9	4.6	7.9
Fenpropimorph	6.0	2.2	5.0	4.7	30.0	40.0	4.0	5.1	22.0	7.0
Fenarimol	2.5	>500	>500	>500	>500	>500	170	14.0	>500	>500
Imazalil	23	>500	>500	400	>500	>500	110	>500	190	>500

L.S.D. (P= 0.01): Aislamientos 3.6; Fungicidas 3.8; interacción Aislamiento x Fungicidas 12.0

Las diferencias de sensibilidad de *R. solani* a los fungicidas demostradas en el cuadro 4 juegan un papel significativo en la evolución de los patógenos en la expresión de resistencia a fungicidas, aunado a las altas tasas de aplicación de estos productos favoreciendo la aparición de cepas resistentes como manifestación a una pérdida de sensibilidad la que ha sido reportada por diversos autores (Wolfe, 1975; Sharon y Edgington, 1982; Ross y Newbery, 1977; Davidse *et. al.*, 1983; Dowley y O'Sullivan, 1981; Hernández *et. al.*, 2001; Hernández *et. al.*, 2011).

Martin *et. al.*, (1984) reporta una CI_{50} para el PCNB de 0.19 a 215 mg /L, de esta manera señala aislamientos de *R. solani* susceptibles y moderadamente susceptibles a PCNB, mientras que reporta la tolerancia de algunos cepas binucleadas. Así mismo indica diferencias de sensibilidad al Benomilo entre los diferentes grupos de anastomosis de *R. solani solani* (desde 10 -100 mg/L) y *Rhizoctonias* binucleadas (que presento tolerancia).

Ariena *et. al.* (1984) reporta cepas de *R. solani* pertenecientes a los grupos GA1-2 y GA4 resistentes al tolclofos metil con CI_{90} >1600 mg/L.

Olaya y Abawi (1992) señala que *R. solani* se inhibía a la CI₉₀ <10 mg/L con iprodione, mientras que con pencycuron se inhibía a la CI₉₀ de <100 mg/L.

Kataria *et. al.* (1991) encontró diferencias a nivel de grupo de anastomosis de *R. solani* respecto a la sensibilidad del tiabendazol desde 2.5 a 40 mg/L, mientras que para el pencycuron los aislamientos AG 1, 4, 5, 7 y 8 fueron insensibles (CI₉₀ >500 mg/L), en su contraparte el AG3 presenta mayor sensibilidad tanto al tiabendazol y pencycuron con CI₉₀ de 2.5 y 0.2 mg/L.

Holguin (1999) reporta concentraciones de tiabendazol de CI₉₀ de 5.08 a 9.65 mg/L tanto para *R. solani* como *R. cerealis*, y para el pencycuron desde CI₉₀ de 0.13 hasta 1582.9 mg/L que equivale a 15.83 veces la cantidad de ingrediente activo para una cepa susceptible.

Ariena *et. al.*, (1984) reporta que *Rhizoctonia solani* (Kühn) ha adquirido resistencia tanto a fungicidas protectores orgánicos, como quintoceno (PCNB) (Shatla y Sinclair, 1963; Meyer y Parmeter, 1968; Kataria y Grover, 1974), captan, dichlone, maneb y tiram (Elsaid y Sinclair, 1964; Abdalla, 1975) y cloroneb (Kataria y Grover, 1974) y a los fungicidas sistémicos, tales como la oxycarboxin oxathiins y carboxin (Grover y Chopra, 1970), benomilo y tiofanato-metil (Kataria y Grover, 1974; Vanachter y Van Wambeke, 1977) y 2 - (tiocianometiltio)-benzotiazol (TCMTB) y dichlozoline (Vanachter y Van Wambeke, 1977). En la mayoría de los casos, la resistencia aparentemente es temporal y, posiblemente, debido a la adaptación enzimática (Elsaid y Sinclair, 1964; Grover y Chopra, 1970; Kataria y Grover, 1974).

Para quintocenoTCMTB, sin embargo, la resistencia se mantuvo estable (Shatla y Sinclair, 1963; Vanachter y Van Wambeke, 1977) y surgió como consecuencia de cambios genéticos, ya sea debido a heterocariosis (Meyer y Parmeter, 1968) o mutación sectorial (Vanachter y Van Wambeke, 1977).

Efectividad de Fitoquímicos en la Inhibición de *Rhizoctonia solani*.

Diversos productos derivados de las plantas han mostrado un efecto antimicrobiano. Dentro de los principales compuestos derivados de las mismas, destacan los flavonoides, fenoles, terpenos, aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos. La obtención de extractos vegetales conteniendo estos metabolitos se han realizado en agua o en otros solventes, dependiendo de su polaridad; y en forma de polvos (Bautista-Baños *et. al.*, 2003).

La enorme diversidad de metabolitos secundarios y propiedades biológicas presentes en los vegetales todavía son materia de estudio sumamente amplia. El conocimiento limitado que se tiene actualmente al respecto, da lugar a iniciar estudios con plantas de casi cualquier tipo. Sin embargo, existen algunas bases derivadas del conocimiento fitoquímico (Montes, 1996). Algunas familias de plantas pueden ser más viables para su estudio, como es el caso de las *Solanaceae* con alto contenido de alcaloides o las *Mimosaceae* con muchas especies ricas en taninos, o las *Lamiaceae* y *Meliaceae* con amplia diversidad de terpenoides (Domínguez, 1978).

Para la producción de principios activos, existen factores que determinan la variabilidad cualitativa y cuantitativa de los metabolitos. Una planta puede tener diferente concentración de un químico en sus diferentes partes: raíz, hojas, flores y fruto e inclusive puede estar ausente en una o en varias partes, por lo que al coleccionar es conveniente tomar muestras integrales (Montes, 1996); así también, conociendo el contenido químico de los vegetales, se les puede dar un amplio uso a vegetales de una región determinada, ya sea como insecticida, fungicida, nematocida, entre otros (Cruz, 1993).

Cruz y Montes (1992) reportan algunos grupos químicos responsables de la actividad antifúngica de siete extractos vegetales que estudiaron, encontrando en mayor frecuencia: glicósidos, saponinas y taninos.

Montes, *et. al.* (2000) mencionan que se han estudiado alrededor de 206 especies de plantas contra 26 especies de hongos fitopatógenos, observándose que algunas de ellas tienen efecto durante la germinación de esporas, desarrollo del micelio y esporulación en pruebas de invernadero y campo. Así mismo, mencionan que se ha logrado formular productos orgánicos a partir de las plantas en presentación de extractos acuosos y hexánicos, polvos, aceites esenciales y metabolitos secundarios antifúngicos. En términos generales, mencionan que, entre 21 y 32 % de las plantas probadas interactúan con los hongos, y las respuestas de los patógenos varían desde la estimulación biológica hasta su total inhibición.

Guerrero *et. al.* (2007) reporta el efecto en la inhibición micelial de *A. alternata*, *C. gloeosporioides*, y *P. digitatum* por acción de extractos de hojas frescas de *F. cernua* obtenidos con metanol:cloroformo 1:1, y por extracción sucesiva por exano, éter dietílico y etanol. Se demostró que los extractos más eficientes para inhibir la esporulación de *A. alternata* y *C. gloeosporioides* fueron el etanólico y el de metanol:cloroformo; este último extracto obtuvo el mayor rendimiento de resina, aunque en los extractos se presentaron los mismos grupos químicos pero a diferente concentración.

Gamboa *et. al.* (2003) reporta el efecto de los extractos metanólicos de hojaseón (*Flourensia cernua* D.C.), mejorana (*Origanum majorana* L.) y trompetilla [*Bouvardia ternifolia* (Ca.) Schlecht.] sobre la inhibición del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* Kühn desde la dosis de 4,000 a 20,000 ppm.

Lira *et. al.* (2002) reporta la inhibición total sobre el crecimiento micelial del hongo fitopatógeno *Pythium sp.* por efecto de resina (con $500 \mu \Gamma^{-1}$) de *Larrea tridentata* (Sesse and Moc. Ex D.C.) colectada en el Desierto Chihuahuense (DCh) y en el Desierto de Sonora (DS). Indicando un efecto fungicida de manera consistente, independientemente del solvente usado para la extracción o del sitio geográfico de colecta.

Bacillus* en el control de *Rhizoctonia solani

Descripción de *Bacillus*

Bacillus es un género de bacteria en forma de bastón dentro del grupo Gram positivas (Rashid *et. al.*, 1995; Beneduzi y Passaglia, 2011), son tanto aerobios estrictos o anaerobios facultativos (Longan y Halket, 2011), forma un tipo de célula llamada endoespora como una respuesta a condiciones estresantes, en la parte central, que deforma la estructura de la célula. Dicha forma esporulada es resistente a las altas temperaturas y a los desinfectantes químicos corrientes (Collins *et. al.*, 2003). Este género es muy abundante en varios nichos ecológicos que comprenden suelo, agua y aire (Zhang *et. al.*, 2009; Longan y Halket, 2011), se le encuentra también como contaminantes de alimentos. Generalmente las especies empleadas en el bio-control son móviles, con flagelos peritricos, sin embargo algunas especies son de interés en medicina humana (*B. anthracis*) que se caracterizan porque son inmóviles (Driks, 2004).

El género *Bacillus* es considerado uno de los más eficaces para controlar enfermedades de las raíces y del follaje; dada la diversidad genética y distribución del género tanto en el suelo como en la rizósfera (Larrea, 2001; Dequiedt *et. al.*, 2009) y por su capacidad de producir diversos antibióticos (Bernal *et. al.*, 2002), con gran efecto en la supresión de fitopatógenos, ya sea como tratamiento a la semillas o directamente al suelo, además influye positivamente en la germinación, desarrollo y rendimiento del cultivo debido a la producción de sustancias promotoras del crecimiento y al mejoramiento de la nutrición de las plantas. La especies de *Bacillus*, como grupo, ofrece

ciertas ventajas sobre cepas del género *Pseudomonas* y otras bacterias gram negativas para la protección contra hongos patógenos de raíz, debido a su capacidad de formar endosporas y a la actividad del amplio espectro de sus antibióticos. Otra característica que le favorece es que este grupo es capaz de utilizar una amplia cantidad de compuestos orgánicos simples (Chávez *et. al.* 2007).

Eficacia de *Bacillus* en el Control de *R. solani*

La eficacia de que demuestran el uso de *Bacillus* spp. en el crecimiento, rendimiento y control de hongos fitopatógenos se encuentran ampliamente reportados, Guillen *et. al.*, (2006) reportan la aplicación de cepas y mezclas bacterianas de *Bacillus* al cultivo de chile en un suelo infestado por *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* logrando incrementar la altura de la planta en un 20%, rendimiento final en 270%, y reducir en un 80% la incidencia de la enfermedad y un 39% la severidad de la pudrición de raíz. De igual manera semillas tratadas con cepas de *Bacillus firmus* incrementaron la germinación en 60% respecto al testigo, además de un incremento en 87.5 y 84% en el volumen radical y peso seco de la planta de jitomate cv Río Grande (Lagunas *et. al.*, 2001).

Las investigaciones sobre el efecto de *Bacillus* sobre hongos fitopatógenos del suelo han sido muchas, Muñoz *et. al.*, (2001) al combinar métodos de control, utilizo la solarización y encalado como pre tratamientos de suelo para introducción de agentes de control biológico de *Rhizoctonia solani* en diferentes formulaciones como 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. Siendo la combinación encalado + *B. subtilis* GV-3 y el solarizado + *Bacillus* sp. quienes mostraron un 100% de protección contra la enfermedad costra negra de la papa.

García (2002) confronto *in vitro* cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizosfera de papa, en Coahuila y Nuevo León contra grupos de anastomosis GA-1 y GA-6 de *R. solani* y encontró que la cepa B15 inhibió en 50% al GA-1 y 85.71% al GA-6. Mientras que la cepa B20 solo mostro un 42.85% al GA-1 y las cepas B7 y B22 inhibieron en un 69.62% al GA-6.

Hernández *et. al.* (2008) encontró una reducción significativa en el crecimiento *in vitro* de *Rhizoctonia solani* del 29.33, 35.55 y 40.44% por las cepas B15, B3 y B9 respectivamente por aislamientos de *Bacillus* spp. obtenidos de la rizosfera de plantas de chile y papa en Coahuila y Nuevo León.

Rodríguez (2002) logró inhibir en 62% el crecimiento micelial de *R. solani* y mostrar un 80% de plantas sanas, así como aumentos en el peso fresco y peso seco comparados con el tratamiento control, mediante el uso de *Bacillus subtilis*.

Montealegre *et. al.*, (2003) señala que excelentes propiedades antagónicas contra *Rhizoctonia solani* a concentraciones de 5×10^9 ufc ml⁻¹, además concluyó que el hierro disponible en el suelo (1,8 y 27 ppm) no es limitante para la actividad antagónica de estas bacterias sobre *R. solani*.

Paredes *et. al.*, (2009) determinó la actividad antagonista *in vitro* de aislamientos nativos obtenidos de la rizosfera de plantas de garbanzo (en estado de Sinaloa) contra el complejo de hongos *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani*. Encontró que las cepas nativas *Bacillus subtilis* (CIAD-940111) y *Pseudomonas fluorescens* (CIAD-990111) mostraron el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de los patógenos. *B. subtilis* mostro inhibición del 69, 27.3 y 75.4% para *R. solani*, *F. oxysporum* y *S. rolfsii* respectivamente. Mientras que *P. fluorescens* mostro 58.7, 44.1 y 56.9% de inhibición para los hongos mencionados.

El uso de *Bacillus subtilis* en el biocontrol de *Rhizoctonia solani* muestran que el control es similar al manejo químico, siendo las dosis *B. subtilis* 1720 mg. /planta que mostraron un buen desarrollo en la planta y control de la enfermedad. (Plascencia, 2008).

Ciclo Biológico de *Bacillus*

Cuando las condiciones del suelo o del medio ambiente (por ejemplo, temperatura, humedad relativa, el valor de pH y nutrientes) son favorables, las esporas germinan por un proceso de etapas sucesivas: en primer lugar, las esporas son parcialmente hidratadas, para ello, cationes (por ejemplo, Ca^{2+}) y el ácido dipicolínico (DPA), que son los componentes importantes de las esporas son liberados desde la base de la esporas, entonces la corteza se degrada y el núcleo se hidrata (Paidhungat *et. al* 2001; Cowan *et. al.*, 2004). Si las condiciones de crecimiento lo permitan, las células se multiplican y producen células hijas en el ciclo celular vegetativo (Figura 1). Para la

germinación es importante además de los nutrientes, la concentración de oxígeno, el que además es un factor en la esporulación (Sarrafzadeh y Navarro 2006; Park *et. al* 2009). Por ejemplo, *B. thuringiensis* y *B. anthracis*, requieren oxígeno para desencadenar la esporulación (Roth *et. al.*, 1955; Sarrafzadeh y Navarro 2006, citados por Hu y Mahillon, 2011)

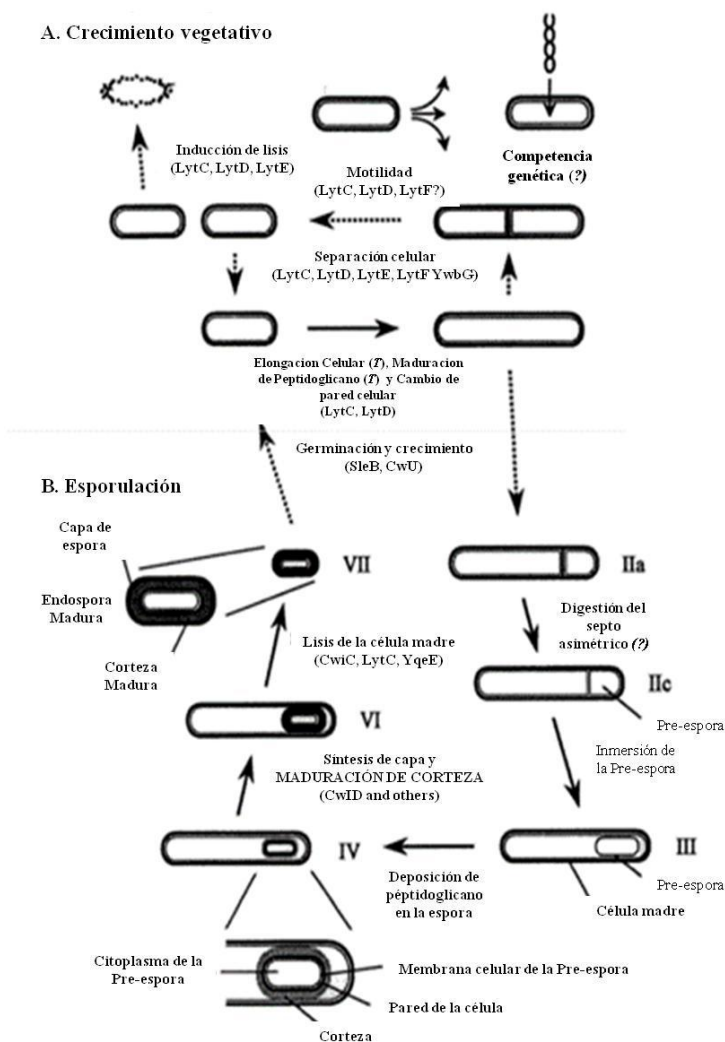


Figura 1. Ciclo de vida de *B. subtilis*, proceso que requiere la actividad autolisina están marcados en negrita, y las autolisinas involucradas se indican entre paréntesis. A) el crecimiento vegetativo. Pasos con enlace con flechas rotas no depende absolutamente del paso anterior. B) La esporulación. Los eventos

durante la esporulación están unidos por flechas continuas debido a que ocurren en un orden preciso, genéticamente controlado (Tomado de Foster y Popham, 2002).

Factores que Afectan la Formación de la Endospora

Los factores que afectan la formación de la endospora son: temperatura de crecimiento, temperatura ambiental, pH, aireación, presencia de ciertos minerales y carbón, fuentes de nitrógeno y fósforo y sus concentraciones, densidad de población. De estos, solo dos tipos de factores ambientales inducen la esporulación, uno al existir una carencia nutricional y dos ante una alta densidad poblacional (Longan y Halket, 2011).

Técnicas de Aislamiento

Las herramientas tradicionales para la determinación de la composición de la comunidad de bacterias del suelo y su diversidad se basan en gran medida en métodos de cultivo. Típicamente, se inoculan en medio de crecimiento orgánicos sólidos complejos, para lo cual se realizan diluciones de una suspensión de suelo, se incuban y las colonias obtenidas se purifican al subcultivar a otro medio nuevo (Mandic-Mulec y Prosser, 2011).

La técnica más utilizada para la selección de esporas es el tratamiento térmico o pasteurización, donde las suspensiones de muestras de suelo se calientan por momentos a temperaturas que matan a las células vegetativas, lo que hace que esta técnica sea eficiente porque es muy selectiva, al eliminar todos los microorganismos que no forman

esporas. El tratamiento más adecuado es el calentamiento con temperaturas oscilantes entre 65 - 80°C durante 15 minutos. Claus y Berkeley (1986) propusieron calentar las muestras a 80°C durante 10 minutos, siendo este último el procedimiento ampliamente reportado en la literatura. Sin embargo, el tratamiento térmico tiene que ser adaptado para algunos tipos de especies formadoras de esporas, ya que las endosporas de algunas cepas de bacterias no son tan resistentes al calor. El tiempo de incubación utilizado puede variar de 3 a 30 min (Jara *et. al.* 2006). Se recomienda comenzar a calentar a una temperatura relativamente baja (por ejemplo, 70 o 75°C) y progresivamente aumentar hasta logra una temperatura óptima (Berge *et. al.*, 2011).

Algunos autores han aprovechado la tolerancia de las esporas a diferentes condiciones de estrés, por ejemplo, Koransky *et. al.* (1978) concluyeron que el tratamiento con etanol al 50% durante 1 h es una técnica efectiva para aislar selectivamente bacterias formadoras de esporas de un cultivo mixto, y que es tan eficaz como el tratamiento térmico de 80°C durante 15 minutos. Patel *et. al.* (2009) confirmó este hallazgo mediante el aislamiento de las cepas de *Bacillus* a partir de residuos de alimentos, tanto por calentamiento a 65°C durante 45 minutos y el uso de la incubación con etanol. El secado del suelo también puede ser utilizado como una presión selectiva, como las endosporas producidas tienen una notable tolerancia a la desecación por lo tanto pueden sobrevivir por largos períodos de tiempo en esas condiciones. El secado es probablemente el tratamiento más suave que el calentamiento o la incubación con etanol.

Otra manera para el aislamiento de *Bacillus* en las muestras de suelo es según Eman *et. al.* (2006) es matar a las células vegetativas mediante la adición de cloroformo

(1% v / v), sin embargo, esta técnica no ha sido validada. Un proceso de selección interesante diferente al tratamiento térmico clásico, fue desarrollado por Travers *et. al.* (1987) para el aislamiento de *Bacillus thuringiensis*, el cual hace uso de acetato (selección de acetato), la germinación de las esporas de *B. thuringiensis* se inhibe selectivamente por el acetato de sodio (0,25 M), mientras que la mayoría de las especies formadoras de esporas no deseado se deja germinar. En seguida, todas las bacterias no esporuladas fueron eliminadas por tratamiento térmico a 80°C durante 3 min. Posteriormente, las esporas sobrevivientes se ponen a germinar en un medio de agar enriquecido. Incluso si algunas otras especies de *Bacillus* también son seleccionadas por este método, tales como *Bacillus sphaericus* y *B. cereus*, esta técnica se utiliza con frecuencia para estudiar la diversidad de *B. thuringiensis* en todo el mundo (Martin y Travers, 1989; Helgason *et. al.*, 1998; Hongyu *et. al.* 2000; Uribe *et. al.* 2003, citados por Berge *et. al.*, 2011). Una modificación del método promueve una mayor producción de esporas por estimulantes de esporulación antes de aplicar el shock de estrés. Por ejemplo, algunos autores sugieren la suspensión de un gramo de suelo en 50 ml de un medio de esporulación, luego de incubar a 37°C bajo agitación durante 48 horas antes de matar a las células vegetativas por el tratamiento térmico (Eman *et. al.* 2006), mientras que otros propusieron incubar el suelo en suspensiones de caldo de cultivo a diferentes temperaturas por 5 días, para permitir una mejor maduración de las esporas (Walker *et. al.* 1998, citado por Berge *et. al.*, 2011).

A diferencia de un tratamiento térmico para seleccionar esporas, Bizzarri y Bishop (2007) estaban interesados en recuperar específicamente las células vegetativas de *B. thuringiensis*. Tanto las esporas y células vegetativas se producirán, si las muestras

son sembradas en medios de cultivo convencionales, de modo que, seleccionaron las formas vegetativas en un medio que contiene el inhibidor de la germinación TAME (Na-p-tosilo-L-arginine éster metílico) y demostraron que estas bacterias existen en forma activa en el filoplano.

ARTÍCULO I

GENÉTICA DE POBLACIONES DE *Rhizoctonia solani* Kühn Y SU RESISTENCIA A FUNGICIDAS.

Francisco Castillo¹, Francisco Daniel Hernández-Castillo^{1*}, Gabriel Gallegos¹, Alberto Flores-Olivas¹ y Raúl Rodríguez².

¹ *Departamento Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, 25315, Saltillo, Coahuila, México.*

² *Departamento de Investigación en Alimentos, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, 25000, Saltillo, Coahuila, México.*

RESUMEN

Para evaluar la diversidad genética de *R. solani* en México, se determinaron los grupos de anastomosis (AG) de 57 aislamientos de diferentes regiones de la República Mexicana mediante el uso de la técnica PCR-RFLP, amplificando la región 18's del rADN con los iniciadores S1 y S4, cortando el fragmento amplificado con las endonucleasas *Mse* I, *Ava* II, *Hind* cII y *Mun* I. El 81 % de los aislamientos se identificaron como AG3, un 14% como AG1-1B y 5% a AG11. Esta alta presencia del AG3 puede estar correlacionada con la diseminación de dicho grupo por el tubérculo semilla ya que no se logra aislar de planta. Los bioensayos para determinar los niveles de resistencia a los fungicidas Pencycuron y Tiabendazol, muestra que el crecimiento de todas las cepas de *R. solani* fue inhibido a una CI_{50} de 0.014 a 0.039 mg de i.a./l de Pencycuron, con valores de FR que fluctúan entre 1.4 a 3.945 y para el Tiabendazol con CI_{50} de 0.82 a 2.91 mg de i.a./L con FR de 0.27 a 0.97, por lo que se consideran susceptibles al fungicida Tiabendazol. Los diferentes AG mostraron heterogeneidad en la sensibilidad a los fungicidas Pencycuron y Thiabendazol, siendo más tolerantes los grupos AG1-1B yAG11. En cuanto a la susceptibilidad hay una pérdida de esta en todos los grupos ante el fungicida Pencycuron.

Palabras clave: Resistencia genética, fungicidas, grupos de anastomosis.

INTRODUCCION

Rhizoctonia solani Kühn (teleomorfo *Thanatephorus cucumeris* [Frank] Donk) infecta por lo menos 200 especies de plantas y es uno de los patógenos del suelo más comunes en cualquier cultivo (Lehtonen *et. al.*, 2008; Priyatmojo, *et. al.*, 2001; Jones y Belmar, 1989). *R. solani* es una especie muy compleja que contiene grupos relacionados pero distintos genéticamente, que pertenecen al menos a 14 poblaciones diferentes, genéticamente definidas como grupos de anastomosis (AG), determinados por anastomosis entre las hifas de cepas pertenecientes a la misma AG (Carling *et. al.*, 2002b, González, 2002; Guillemaut *et. al.*, 2003). Cada grupo de anastomosis (AG) se considera una entidad independiente, evolutiva o filoespecies (Cubeta and Vilgalys, 1997; Carling *et. al.*, 2002b) ya que solo ocurre el intercambio de núcleos y recombinación entre cepas compatibles (Anderson, 1982). La Papa (*Solanum tuberosum* L.) es en su mayoría afectada por *R. solani* independientemente de las condiciones climáticas donde se desarrolla el cultivo, normalmente el grupo AG-3 es el más comúnmente asociado a las áreas de producción de papa en los climas fríos (Lehtonen *et. al.*, 2008, Hernández *et. al.*, 2003). Desde el punto de vista práctico, el concepto de anastomosis es de gran importancia para realizar un mejor manejo de la enfermedad, pues cada grupo presenta diferencias variables en su patogenicidad, respuesta a la temperatura, textura de suelo (Carling y Leiner, 1990) y sensibilidad a fungicidas (Kataria *et. al.*, 1991). En relación a este último concepto, el estudio sobre el conocimiento de la estructura genética de poblaciones en lo que se refiere a la cantidad y distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones es importante para entender la biología de las poblaciones de patógenos e inferir el relativo impacto de las

diferentes fuerzas evolutivas que influyen su biología y con ello predecir el potencial de evolución de las poblaciones dentro de ecosistemas agrícolas (Leung *et. al.* 1993). Estos estudios además, además generaran información que contribuya a una mejor comprensión del patosistema *Solanum tuberosum*- *R. solani* y por consiguiente ayudar al diseño de nuevas estrategias de manejo mediante el conocimiento de su estructura genética y monitoreo de sensibilidad a fungicidas. Para ello se establecieron los objetivos 1) determinar la estructura genética de la especie y grupos de anastomosis de *R. solani* más comunes en las diferentes regiones productoras de papa (*Solanum tuberosum*) en México y 2) Estimar el grado de resistencia de los grupos de anastomosis más comunes de *R. solani* a los fungicidas pencycuron y tiabendazol.

MATERIALES Y METODOS.

Sitios de muestreo. Se realizaron muestreos en lotes comerciales del cultivo de papa, dirigidos a plantas con síntomas de la enfermedad durante el cultivo y a tubérculos con presencia de esclerocios durante la cosecha en los estados Nuevo León, Coahuila, Sonora, Jalisco y Chihuahua. Las muestras obtenidas se identificaron y trasladaron en hieleras al departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Aislamiento de cepas de *R. solani*. El aislamiento de las cepas de *R. solani* se hizo de tejido vegetal con los síntomas característicos de la enfermedad causada por este patógeno y de esclerocios presentes en tubérculos. Se cortaron fragmentos adyacentes a las lesiones y de tejido esclerosado, el cual se desinfecto con hipoclorito de sodio al 3%

por dos minutos, se enjuaga tres veces con agua destilada estéril, se dejó secar y se sembró en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) e incubó a $24 \pm 2^\circ\text{C}$, hasta la observación de tejido fungoso. Se realizó la purificación por punta de hifa de todas aquellas colonias con características propias del hongo *R. solani*. Cada cepa de *Rhizoctonia* aislada por punta de hifa se identificó y clasificó de acuerdo al lugar de origen y estado.

Caracterización de grupo de Anastomosis. Se realizó la identificación a nivel grupo de anastomosis por la técnica PCR-RFLP desarrollada por Guillemaut *et. al.* (2003) y Camperota *et. al.* (2000). Se extrajo ADN de *R. solani* con la técnica Dellaporta (1983) y se determinó la calidad por electroforesis en geles de agarosa 1 %, tinción con bromuro de etidio y visualización con luz UV; se efectuó PCR del ADN extraído bajo el siguiente programa: 94° por 5 min, 35 ciclos a 94° por 1 min, 56° por 1 min, 72° por 1 min, utilizando los iniciadores S1 y S4 desarrollados por Camperota *et. al.* (2000), bajo las siguientes concentraciones: 2 ul ADN, 2.5 ul buffer 10x, 1 ul de MgCl_2 a 50 mM, 2 ul dntp's a 2 mM, 1.5 ul iniciador a 10 pM, 0.25 ul de ADN taq polimerasa a 5U/ul. Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis y tinción con bromuro de etidio.

Cada uno de los productos de PCR obtenidos, se cortó con las endonucleasas: *Mse I*, *Ava II*, *Hind cII* y *Mun I* al incubar a 37°C por 3 horas. Estas enzimas son específicas para diferenciar todos los grupos de anastomosis de *R. solani*. Cada patrón generado con cada enzima de las cepas analizadas se codificó y se comparó con el código específico obtenido para cada cepa de referencia (Guillemaut *et. al.*, 2003).

Monitoreo de la Resistencia de los Grupos de Anastomosis de *R. solani* a Fungicidas

Cada una de las cepas de *R. solani* obtenidas de los diferentes sitios de muestreo se hizo crecer en medio envenenado con cada uno de los fungicidas a las concentraciones de 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 para Pencycuron y de 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 y 5.0 para Tiabendazol para determinar su grado de resistencia. Después de preparar las concentraciones de cada fungicida, se realizó la colocación directa de un disco (0.5 cm) con micelio de 5 días de crecimiento activo de cada cepa de *R. solani*, se selló e incubó a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ hasta que el testigo (sin tratamiento) cubrió completamente la caja Petri. La variable medida fue el crecimiento radial; el que se transformó a por ciento de inhibición del crecimiento radial. Con el porcentaje de inhibición micelial, se realizó un análisis probit de máxima verosimilitud con ayuda del programa de computadora (SAS V.8.0). Se obtuvo las dosis de 1 a 99% para la inhibición micelial y sus límites fiduciales, con una probabilidad del 95%. De este modo se obtuvo la concentración inhibitorias al 50% (CI_{50}) y al 90% (CI_{90}) de cada cepa. El factor de resistencia (FR), se estimó al dividir la CI_{50} de la cepa resistente sobre la CI_{50} de la cepa susceptible. El FR indica el número de veces en que un individuo es más tolerante a una materia activa en relación a un individuo susceptible (Leroux, 1987).

PCR de los Elementos Palindrómicos Extragénicos Repetitivos (Rep-pcr) del genoma de *Rhizoctonia solani*.

Se realizó la amplificación de los elementos Palindrómicos Extragénicos Repetitivos del ADN de los diferentes aislamientos a través de la reacción en cadena de la polimerasa utilizando el iniciador ERIC 1 en un volumen final de reacción de 25 µl (2 µl ADN a 100 ng, 2.5 µl buffer 10x, 1 µl de MgCl₂ a 50 mM, 2 µl dntps a 2 mM, 1.5 µl iniciador a 10 pM, 0.25 µl de ADN taq polimerasa a 5U/µl), bajo el siguiente programa una temperatura de desnaturalización inicial de 7 min a 95°C, 30 ciclos por 1 min a 94°C, 1 min a 53°C y 8 min a 72°C. Por último una extensión final de 10 min a 72°C. Los fragmentos amplificados se separaron en geles de agarosa a 1% a 65 V por una 1.4 h y se visualizaron con tinción de bromuro de etidio. Una matriz binaria (1=presencia, 0=ausencia) fue preparada basada en el patrón de bandas. Los datos se analizaron con el software Info-Gen (Balzani y Di-Rienzo, 2003) para determinar la diversidad genética, análisis de varianza molecular, conglomerados y PCA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de grupo de Anastomosis. Se aislaron e identificaron a especie 57 cepas de *R. solani* de diferentes orígenes agrícolas de México. Se logró la amplificación de un fragmento de 500 a 550 pb (Figura 1) con los iniciadores S1 y S4 en todas las cepas analizadas, debido a que este peso está en el rango de amplificación (475 y 550 pb) por las cepas de *R. solani* de referencia (Guillemout *et. al.*, 2003).

El Análisis de restricción de los productos de PCR con las enzimas (*Mse I*, *Ava II*, *Hind cII* y *Mun I*) revelo diferentes patrones de peso molecular (FNAN =AG3, BNAN=AG3, BNNN= AG1-1B y BNAA=AG11) que al ser comparados con los patrones de las cepas de referencia reportados por Guillemout *et. al.* (2003) permitió identificar cada cepa a nivel de grupo de anastomosis (Cuadro 1).

En el cuadro 1, se aprecia que el grupo de anastomosis AG-3 se encontró en mayor proporción y representa el 81 % del total de los aislamientos, seguido del AG1-1B con un 14 % y finalmente el AG-11 con un 5 %. Nuestros resultados coinciden con la mayoría de los reportes que indican que el AG3 es el grupo más comúnmente asociado al cultivo de la papa (Carling y Leiner, 1990; Bandy *et. al.*, 1988), aunque también se encuentran los grupos AG1, AG2-1, AG2-2, AG4, AG5 y AG9 en este cultivo (Carling y Leiner, 1990). Para México, los grupos reportados en el cultivo de la papa son el AG3, AG2, AG4, AG5 y AG7 (Alonso *et. al.* 1994, Holguin, 1999; Virgen *et. al.* 2000; Hernández *et. al.*, 1993; Hernández *et. al.*, 2001; Hernández *et. al.*, 2005). Este es el primer reporte que señala a los grupos AG1-1B y AG11 presentes en el cultivo de papa. La mayor incidencia del AG3 en papa puede estar relacionada con el origen del esclerocio en el tubérculo progenitor que fue de donde se obtuvieron nuestros aislamientos, estos resultados parecen coincidir con las observaciones obtenidas por Platt *et. al.*, (1993), al reportar el AG3 en los aislamientos obtenidos de tubérculos y los grupos de anastomosis diferentes del AG3 aislados de suelo y de tallos infectados.

Resistencia de los Grupos de Anastomosis de *R. solani* a Fungicidas.

La CI_{50} de las cepas *R. solani* al pencycuron varia de 0.014 a 0.039 (Cuadro 2). La consideración bibliográfica señala que la CI_{50} de una cepa susceptible de *R. solani* es de 0.01 mg/L (Kataria *et. al.*, 1989). Con estos datos se determinó que el factor de resistencia (FR) de las cepas estudiadas fluctuó de 1.4 a 3.945. Los resultados de FR de las cepas muestran que son superiores a la unidad, por lo se considera que los aislamientos presentan resistencia al Pencycuron (Koller y Scheinpflug, 1987; Leroux, 1987). La resistencia al pencycuron ya ha sido reportada por otros autores para cepas de *R. solani* AG3 aislado de papas procedente de Chihuahua con CI_{50} de 0.37 a 1.04 y con CI_{50} 0.002 a 0.045 para cepas de diferentes regiones de México (Holguin, 1999; Hernández *et al.*, 2005; Chavéz *et al.*, 2011).

Para el fungicida Tiabendazol se obtuvieron valores de la CI_{50} menor a 2.91 mg de i.a./L, por lo que se considera que todas las cepas estudiadas son susceptibles. De acuerdo a Leach y Murdoch (1985) una cepa es susceptible al tiabendazol si el valor de CI_{50} es inferior a 3 mg/L como sucedió en nuestras cepas (Cuadro 3). Los resultados obtenidos coinciden con los de Holguin (1999) quien no encontró cepas de *R. solani* resistentes a este fungicida.

Diversos reportes indican que existen diferencias entre los de grupos anastomosis en cuanto a la tolerancia a ambos fungicidas evaluados. Para los grupos de anastomosis aislados, se observa que el grupo AG11 más tolerantes a ambos fungicidas que el AG3,

este comportamiento ya ha sido señalado previamente por diversos autores indicando que cada grupo de anastomosis tolera diferentes concentraciones de fungicidas. Para el fungicida pencycuron Hernández *et. al* (2005), Chavez *et al.* (2011) reportan un FR para AG4 de 225.9 y para el AG3 de 104.4 para el Pencycuron, estos valores son mayores que nuestros resultados, sin embargo la tendencia es la misma.

Variabilidad Genética de *Rhizoctonia solani*.

El análisis de varianza molecular (AMOVA), no detecto diferencias significativas ni entre poblaciones (P-valor 0.3225) ni dentro de estas (P-valor 0.3275).

El análisis del polimorfismo de 28 bandas obtenidas por REP-PCR (Eric 1) que incluyo 48 aislamientos provenientes de 7 regiones geográficas mostró rangos de variación en loci polimórficos de 0.43 (Chihuahua) a 0.86 (Referencia) con un valor total de 0.89 (Tabla 4). La población considerada como referencia mostro el valor mas alto de diversidad genética de (0.34) (Tabla 4) esto es debido a que los individuos que integran la población son genéticamente distintos (AG6, AG8, AG3, AG11) mientras que la poblaciones de Chihuahua mostró la mas baja variabilidad genética (0.17), la que puede ser debido a que las regiones productoras de Chihuahua se mantuvieron aisladas de la introduccion de túbiculo semilla de papa procedentes de Canadá en la década de los 90's, por lo tanto existen menos genotipos de *Rhizoctonia*; además esta es una región con condiciones climáticas mas fría que el resto de las áreas agrícolas en que se siembra papa en México,, por lo que los individuos menos aptos pueden desaparecer con lo que se reduce la variabilidad genética. Los valores mas bajos de heterosis inssegada lo

presento la población de Chihuahua con 0.19 y los valores más altos la población de referencia (integrada por AG6, AG8 y aislamiento de colección) con 0.37. Estas diferencias son atribuidas a lo discutido en el párrafo anterior. El promedio de alelos vario de 1.43 a 1.86 entre las poblaciones. La mayor variabilidad genética observada en el grupo de referencia (0.34) esta dada porque en este grupo se presentan distintos grupos de anastomosis en comparación con la población de Chihuahua que presenta la menor (0.17) donde solo se identifico a un mismo grupo de anastomosis. La diversidad genética fue muy baja en la mayoría de las poblacionse esto se atribuye a que el hongo se propaga de forma asexual (micelio y esclerocios y se disemina en el túberculo semilla). Existen muy pocos reportes de parasexualismo en *R. solani* o este no ha sido completamente descifrado para esta especie a pesar de que este es un fenómeno con cierta ocurrencia (Parameter, 1970). Dado a lo anterior consideramos que la variabilidad genética de *R. solani* solo pudiera estar dada por mutacion y por flujo genético.

La media de diversidad genética observada en este trabajo (0.29) es similar a 0.2945 reportada por Ceresini *et. al.* (2002), asi mismo un valor bajo de esta medida es un reflejo de una baja recombinacion, por lo que el mayor efecto de un reproduccion asexual es la produccion de pocos genotipos recombinates con un decremento en la divesidad genética de la especie. Aunque no observo la ocurrencia de genotipos duplicados, la baja diversidad genética observada puede indicar una reproducción clonal de los asilamientos analizados, y poco parasexualismo.

Análisis de conglomerados

Se selecciono el dendrograma producido con el modelo Bray-Curtis debido a que fue el que presento el máximo coeficiente de correlación cofenética (0.965) obtenido de las distancias entre poblaciones. En este dendrograma se formaron dos grupos principales A y B. El A integrado solo por la población de Chihuahua donde su separación pudo deberse al aislamiento generado por un lado, al evitar la introducción de tubérculo semilla a esa área productiva y por el otro, a el aislamiento geográfico y condiciones climatológicas extremas lo que hace desaparezcán genotipos no adaptados y se reduzca la variabilidad genética. En el grupo B se encuentra el resto de las poblaciones estudiadas. El grupo A tuvo una distancia genética de 0.37, mientras que el B de 0.27. Dentro del grupo B la población con mayor distancia genética es la de Nuevo León con 0.27 y con la menor distancia las poblaciones de Jalisco y Coahuila con un 0.17 (Figura 2) esta cercana distancia pudo deberse a que después de la introducción de la semilla de Canadá se establecía un primer ciclo de siembra en Coahuila y enseguida un segundo ciclo en Jalisco, y posteriormente se regresaba a Coahuila. El aislamiento observado en la población de Chihuahua puede ser debido a que la región se mantuvo aislada de la introducción de tubérculos para siembra procedente de Canada en la década de los 90's, no así para la región de Coahuila, Nuevo León y Jalisco que permitieron la introducción tubérculo semilla, efectuándose entre estas regiones el intercambio de tubérculo semilla.

El coeficiente de correlación cofenética obtenida en el análisis de conglomerados para aislamientos fue de 0.931, con una distancia mayor para el aislamiento SJNL1 (AG1-1B) con cerca de 146, seguido de la cepa 76129 (AG6) con 125; las diferencias entre

estas dos y el resto de los aislamientos pueden ser a que son grupos genéticamente diferentes o a que este aislamiento puede presentar una tasa de mutación o recombinación mayor, y una distancia menor para los aislamientos A79 y TJ2.1 que presentan menos mutaciones o menos ocurrencia de parasexualismo (Figura 3). No se observó ningún patrón de bandeo duplicado, esto coincide con los reportes de Rodríguez *et al.* (2004) donde no encontraron aislamientos duplicados en *Colletotrichum lindemuthianum*, a pesar de que presenta parasexualismo.

Análisis de coordenadas principales

El árbol de recorrido mínimo obtenido (Figura 4), basado en rep-pcr incluye un 70.1% de la variación total de las siete poblaciones de *R. solani*. Se puede apreciar que los aislamientos de la población de Chihuahua se encuentran con la mayor distancia al resto de las poblaciones, esto pudiera explicarse por su situación geográfica, donde se presentan condiciones extremas en temperatura, menos flujo genético, menos parasexualismo. Así mismo, las poblaciones con un grado de interrelación mayor son Jalisco, Coahuila, Sonora y Canadá, regiones agrícolas donde se permitió el intercambio de tubérculo semilla de papa para siembra comercial.

CONCLUSIONES

Se identificaron tres grupos diferentes de anastomosis de *Rhizoctonia solani* a través del método PCR-RFLP los que corresponden en un 81% al grupo AG3, un 14% al grupo AG1-1B y un 5% para AG11; la alta presencia del AG3 puede estar correlacionada con la diseminación de dicho grupo por el tubérculo semilla.

Los diferentes AG mostraron heterogeneidad en la sensibilidad a los fungicidas Pencycuron y thiabendazol. Todos los aislamientos fueron susceptibles al fungicida thiabendazol resistentes al fungicida pencycuron, siendo más tolerantes los grupos AG11 a ambos fungicidas.

Se observó una baja distancia genética entre poblaciones y aislamientos lo que indica que los aislamientos presentan una estructura clonal

REFERENCES

- Alonso, C.Z., Hernández, C.F.D., Frías, T.G., Sanchez, A.A. 1994. Grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* en papa en Coahuila y Nuevo León, México. Memorias del XXXIV Reunion anual Soc. Amer de Fitopatol Div Caribe. El Zomorano, Honduras C.A. 30
- Anderson, N.A. 1982. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. Ann. Rev. Phytopathol, 20: 329-347.

- Bandy, B. P., Leach, S. S., and Tavantzis, S. M. 1988. Anastomosis Group 3 is the Major Cause of *Rhizoctonia* disease of Potato in Maine". *Plant Disease*, 72: 596-598.
- Carling, D. E., Baird, R. E., Gitaitis, R. D., Brainard, K. A., and Kuninaga, S. 2002a. Characterization of AG-13, a newly reported anastomosis group of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 92:893-899.
- Carling, D. E., Kuninaga, S., and Brainard, K. A. 2002b. Hyphal anastomosis reactions, rDNA-internal transcribed spacer sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-2 (AG-2) and AG-BI. *Phytopathology* 92:43-50.
- Carling, D.E. and Leiner, R.H. 1990. Effect of temperature on virulence of *Rhizoctonia solani* and other *Rhizoctonia* on potato. *Phytopathology*, 80: 930-934.
- Cubeta, M. A., and Vilgalys, R. 1997. Population biology of the *Rhizoctonia solani* complex. *Phytopathology* 87:480-484.
- Dellaporta, S. L., Wood, J. And Hicks, J.B. 1983. A plant DNA miniprep. Version II. *Plant Mol. Biol.* 1:19-21
- González, H. D. 2002. Estado actual de la Taxonomía de *Rhizoctonia solani* Kühn. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 20 (2): 200-2005
- Guillemaut, C., Edel-Hermann, V., Camporota, P., Alabouvette, C. and C. Steinberg. 2003. Typing of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* by restriction analysis of ribosomal DNA. *Can. J. Microbiol.* 49: 556–568.

- Hernández, C. F.D., Alonso, C. Z., Cornejo, N. A. y Cepeda, S.M. 1993. Efecto del fungicida flutolanil (MoncutI rn rl control de *Rhizoctonia solani* Kühn en papa. Revista Agraria 9(1):
- Hernández, C.F.D., Cepeda, S.M., García, C.J. y Pérez, Ch.A. 2001. Grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* de la región papera de Toluca estado de México y susceptibilidad in vitro a fungicidas de diferente grupo toxicológico. Agraria uaaan 17(2): 59-64.
- Hernández, F.D., Carvajal, C.R., Guerrero, E., Sánchez, A., Gallegos, G. and Lira, R.H. 2005. Susceptibilidad a fungicidas de grupos de anastomosis del hongo *Rhizoctonia solani* Kühn colectado en zonas paperas de Chihuahua, Mexico. Revista Internacional de Botanica Experimental, 74: 259-269.
- Holguin, P.R.J. 1999. Niveles de tolerancia a fungicidas de diferente grupo toxicológico y pruebas de adaptabilidad de *Rhizoctonia solani* y *R. cerealis* de las regiones paperas de Coahuila, Nuevo León, Chihuahua, Guanajuato y Toluca. Tesis de Maestría UAAAN. Pags 103.
- Jones, R. K., and Belmar, S. B. 1989. Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. isolated from rice, soybean, and other crops grown in rotation with rice in Texas. Plant Dis. 73:1004-1010.
- Kataria, H.R., Singh, H. and Gisi, U. 1989. Interactions of fungicide-insecticide combinations against *Rhizoctonia solani* in vitro and in soil. Crop protection, 8: 399-404.

- Kataria, H.R., Verma, P.R. and Gisi, U. 1991. Variability in the senetivity of *Rhizoctonia solani* anastomosis groups to fungicides. *Phytopathology*, 133(2):121-133
- Laech, S.S. and Murdoch, C.W. 1985. Evaluation of thiabendazol and pentachloronitrobenzene for control of the *Rhizoctonia* disease complex on white potato (*Solanum tuberosum* L.)
- Lehtonen, M. J., Somervuo, P., and Valkonen, J. P. T. 2008. Infection with *Rhizoctonia solani* induces defense genes and systemic resistance in potato sprouts grown without light. *Phytopathology* 98:1190-1198.
- Leroux, P. 1987. La resistance des champignons aux fongicides I. *Phytoma* 385 : 6-15.
- Leung, H., Nelson, R.J. & Leach J.E. 1993. Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. *Advances in Plant Pathology* 10: 157-205.
- Platt, H.W., Canale, E. and Gimenez, G. 1993. Effect of tuber-borne inoculum of *Rhizoctonia solani* and fungicidal seed potato treatment on plant groeth and *Rhizoctonia* disease in Canada and Uruguay. *American Potato Journal*, 70: 553-559.
- Priyatmojo, A., Escopalao, V. E., Tangonan, N. G., Pascual, C. B., Suga, H., Kageyama, K., and Hyakumachi, M. 2001. Characterization of a new subgroup of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 1 (AG-1-ID), causal agent of a necrotic leaf spot on coffee. *Phytopathology* 91:1054-1061.
- Virgen, C. G., Olalde, P. V, and Carling, D. E. 2000, Anastomosis Groups of *Rhizoctonia solanion* Potato in Central Mexico and Potential for Biological and Chemical Control. *Amer J of Potato Res* 77:219-224.

Cuadro 1. Determinación de grupo de anastomosis de *R. solani* obtenidos por comparación con el patrón de restricción de referencia (Guillemout *et. al.*, 2003).

ESTADO	CEPA	AG	ESTADO	CEPA	AG
SONORA	SO1	AG11	COAHUILA	PC4	AG3-PT
	SO2	AG3-PT		SJVC 1	AG3-PT
	SO3	AG3-PT		SJVC 2	AG3-PT
	SO4	AG3-PT		SJVC3	AG3-PT
	SO5	AG3-PT		HC1	AG1-1B
	SO6	AG3-PT		PC2	AG3-PT
	SO7	AG3-PT		HC2	AG3-PT
	SO8	AG3-PT		PC3	AG3-PT
	SO9	AG3-PT		SJVC 4	AG1-1B
NUEVO LEON	SRNL1	AG1-1B	JALISCO	JL1.1	AG3-PT
	SRNL2	AG3-PT		JL1.2	AG3-PT
	SJNL 1	AG1-1B		JL1.3	AG3-PT
	SJNL 2	AG3-PT		JL2.1	AG3-PT
	SJNL 4	AG3-PT		JL2.2	AG3-PT
	SJNL 5	AG3-PT		JL3.1	AG3-PT
	PNL 2	AG1-1B		JL3.3	AG3-PT
	PNL1	AG3-PT		JL4.1	AG3-PT
				JL4.3	AG3-PT
		JL5.1	AG1-1B		
COLLECCION	A72	AG3-PT	CHIHUAHUA	JCH51	AG3-PT
	H33	AG3-PT		NCCH 1	AG3-PT
	IS	AG3-PT		NCCH 2	AG3-PT
	A26	AG11		NCCH3	AG3-TP
	A77	AG3-PT		NCCH 4	AG3-PT
	A31	AG3-PT		NCCH 5	AG3-PT
	A79	AG3-PT		NCCH 6	AG3-PT
CANADA	CA 1	AG3-PT	Referencia	76106	AG8
	CA 2	AG11		76129	AG6
	CA 4	AG3-PT			
	CA 7	AG1-1B			
	CA 8	AG3-PT			
	CA 9	AG3-PT			

Cuadro 2. Concentraciones inhibitorias al 50 y 90 % (CI_{50} y CI_{90}) y factor de resistencia de cepas de *R. solani* obtenidas de diferentes zonas de papa en México con el Fungicida Pencycuron.

CEPA	CI_{50} mg/l	LFI	LFS	CI_{90} mg/l	FR	GA
CA1	0.014	0.011	0.018	0.066	1.436	AG3-PT
SJVC1	0.018	0.002	0.042	0.294	1.782	AG3-PT
NCCH3	0.019	0.012	0.025	0.079	1.868	AG3-PT
SRNL2	0.02	0.017	0.023	0.072	2.001	AG3-PT
TJ4.3	0.021	0.013	0.027	0.073	2.075	AG3-PT
SJVC2	0.021	0.009	0.033	0.14	2.096	AG3-PT
TJ2.1	0.021	0.01	0.032	0.112	2.138	AG3-PT
SO3	0.021	0.019	0.024	0.06	2.145	AG3-PT
CA8	0.022	0.015	0.028	0.078	2.176	AG3-PT
SO4	0.022	0.019	0.024	0.052	2.184	AG3-PT
NCCH4	0.022	0.013	0.03	0.088	2.193	AG3-PT
TJ3.1	0.022	0.019	0.025	0.075	2.248	AG3-PT
PC4	0.023	0.011	0.03	0.063	2.255	AG3-PT
A79	0.023	0.02	0.026	0.076	2.296	AG3-PT
SO9	0.024	0.02	0.027	0.088	2.35	AG3-PT
NCCH6	0.024	0.017	0.03	0.078	2.37	AG3-PT
TJ1.1	0.024	0.021	0.026	0.063	2.385	AG3-PT
TJ4.2	0.024	0.021	0.027	0.073	2.41	AG3-PT
SO8	0.025	0.015	0.034	0.122	2.451	AG3-PT
A31	0.025	.	.	0.028	2.459	AG3-PT
NCCH5	0.026	0.023	0.028	0.067	2.552	AG3-PT
TJ1.3	0.026	0.02	0.031	0.066	2.57	AG3-PT
SO2	0.026	0.023	0.029	0.086	2.605	AG3-PT
PC3	0.027	0.013	0.039	0.118	2.656	AG3-PT
TJ4.1	0.027	0.018	0.036	0.106	2.74	AG3-PT
PNL1	0.028	0.02	0.036	0.135	2.766	AG3-PT
I5	0.029	0.025	0.032	0.123	2.85	AG3-PT
NCCH1	0.029	0.013	0.045	0.18	2.857	AG3-PT
A77	0.029	0.025	0.033	0.132	2.915	AG3-PT
TJ2.2	0.032	0.026	0.038	0.105	3.222	AG3-PT
SJVC3	0.033	0.026	0.041	0.075	3.345	AG3-PT
TJ3.3	0.038	0.025	0.052	0.235	3.784	AG3-PT

Cuadro 2. Continuación

CEPA	CI50 mg/l	LFI	LFS	CI90 mg/l	FR	GA
SO6	0.027	0.019	0.035	0.103	2.724	AG3-PT
CA7	0.017	0.01	0.024	0.095	1.739	AG1-1B
SRNL1	0.027	0.023	0.031	0.163	2.691	AG1-1B
SJVC4	0.03	0.016	0.045	0.187	3.047	AG1-1B
PNL2	0.039	0.031	0.048	0.126	3.945	AG1-1B
A26	0.02	0.01	0.028	0.107	1.955	AG-11

Cuadro 3. Concentraciones inhibitorias 50 y 90 % (CI_{50} y CI_{90}) y factores de resistencia para cepas de *R. solani* obtenidas de diferentes zonas de papa en México con el fungicida thiabendazol.

CEPA	CI_{50} mg/l	LFI	LFS	CI_{90} mg/l	FR	GA
PC4	0.82	0.62	1	2.54	0.27	AG3-PT
TJ2.1	0.88	0.72	1.03	1.81	0.29	AG3-PT
TJ3.1	0.91	0.72	1.09	1.96	0.3	AG3-PT
SJVC2	0.93	0.69	1.15	2.5	0.31	AG3-PT
A31	0.93	0.77	1.08	1.86	0.31	AG3-PT
S09	0.92	0.79	1.04	1.98	0.31	AG3-PT
SO3	0.94	0.68	1.18	1.83	0.31	AG3-PT
A77	0.96	0.77	1.15	2.41	0.32	AG3-PT
SO4	0.96	0.9	1.01	2.35	0.32	AG3-PT
CA8	0.99	0.79	1.18	1.84	0.33	AG3-PT
NCCH5	0.98	0.67	1.26	2.01	0.33	AG3-PT
NCCH6	0.99	0.87	1.1	2.35	0.33	AG3-PT
TJ4.3	0.99	0.84	1.13	2.41	0.33	AG3-PT
SO8	0.99	0.82	1.16	2.36	0.33	AG3-PT
SO2	1	0.82	1.17	2.22	0.33	AG3-PT
CA1	1.01	0.82	1.18	2.5	0.34	AG3-PT
NCCH4	1.06	1.01	1.12	2.43	0.35	AG3-PT
SJVC1	1.05	1	1.1	2.29	0.35	AG3-PT
IS	1.06	1.01	1.12	2.62	0.35	AG3-PT
TJ4.1	1.06	0.87	1.24	1.93	0.35	AG3-PT
PNL1	1.06	0.73	1.38	2.39	0.35	AG3-PT
TJ1.1	1.04	0.77	1.29	2.4	0.35	AG3-PT
TJ1.3	1.11	0.9	1.32	2.63	0.37	AG3-PT
SRNL2	1.12	0.91	1.33	2.91	0.37	AG3-PT
NCCH1	1.14	0.95	1.33	2.87	0.38	AG3-PT
NCCH3	1.15	1.04	1.27	2.61	0.38	AG3-PT
TJ3.3	1.14	0.85	1.42	2.43	0.38	AG3-PT
PC3	1.18	1.01	1.36	2.44	0.39	AG3-PT
SO6	1.16	1.05	1.27	2.44	0.39	AG3-PT
A79	1.19	1.14	1.24	2.45	0.4	AG3-PT
TJ2.2	1.19	0.99	1.38	3	0.4	AG3-PT

Cuadro 3. Continuación

CEPA	CI50 mg/l	LFI	LFS	CI90 mg/l	FR	GA
TJ4.2	1.19	0.9	1.5	2.54	0.4	AG3-PT
SJVC3	1.34	1.03	1.65	2.8	0.45	AG3-PT
CA7	0.87	0.71	1.01	1.9	0.29	AG1-1B
SRNL1	2.06	1.73	2.49	5.79	0.69	AG1-1B
PNL2	2.43	2.05	3.05	31.5	0.81	AG1-1B
SJVC4	2.91	2.4	3.73	6.07	0.97	AG1-1B
A26	0.98	0.92	1.03	2.28	0.33	AG11

Tabla 4. Descriptores de la variabilidad genética de *Rhizoctonia solani*.

Estadístico	Coah	Can	Chih	Jal	Ref	NL	Son	Total
Loci polimórficos	0.68	0.79	0.43	0.71	0.86	0.75	0.75	0.89
Diversidad Genética	0.23	0.28	0.17	0.23	0.34	0.29	0.25	0.29
Heter.isesgada de Nei	0.25	0.31	0.19	0.24	0.37	0.31	0.26	0.30
Núm. promedio alelos	1.68	1.79	1.43	1.71	1.86	1.75	1.75	2.00
Número efectivo alelos	1.39	1.47	1.30	1.38	1.59	1.50	1.40	1.47

*=95; Coah= Coahuila, Can=Canada, Chih=Chihuahua, Jal=Jalisco, Ref=Referencia y

Son=Sonora

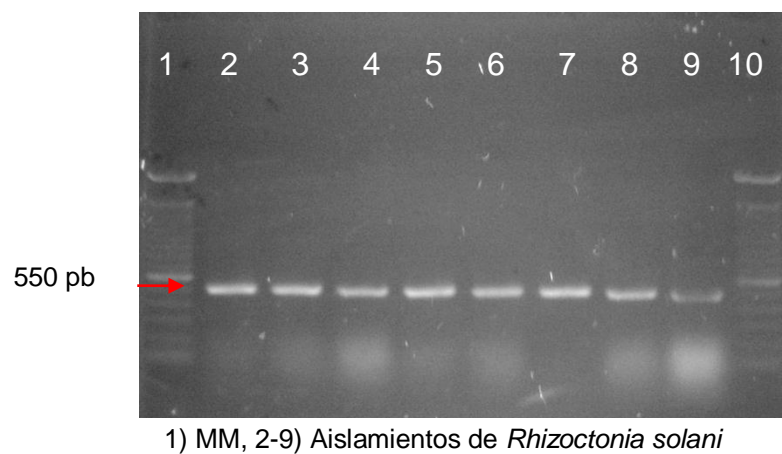


Figura 1. Producto de PCR de *R. solani* amplificado con los iniciadores S1 y S4.

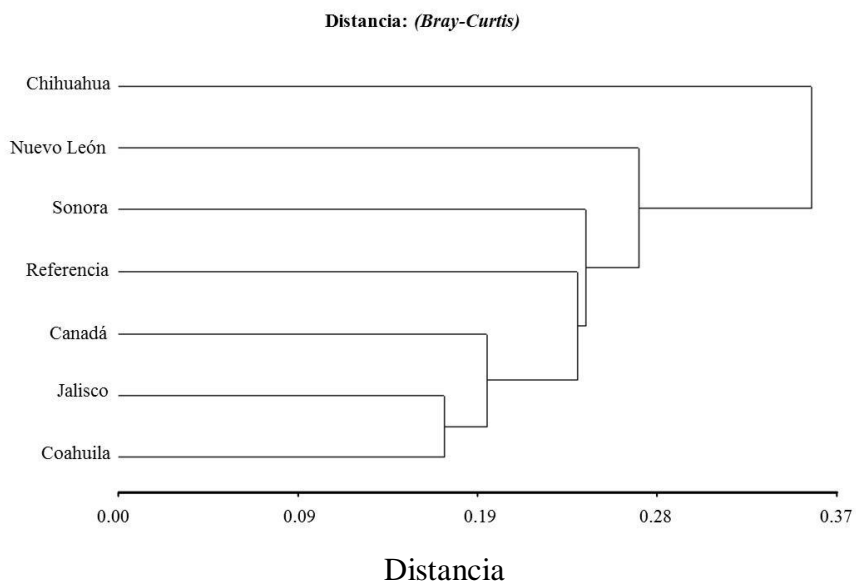


Figura 2. Dendrograma basado in la distancia obtenido por rep-pcr en 7 poblaciones de *Rhizoctonia solani* obtenidas de diferentes regiones de México.

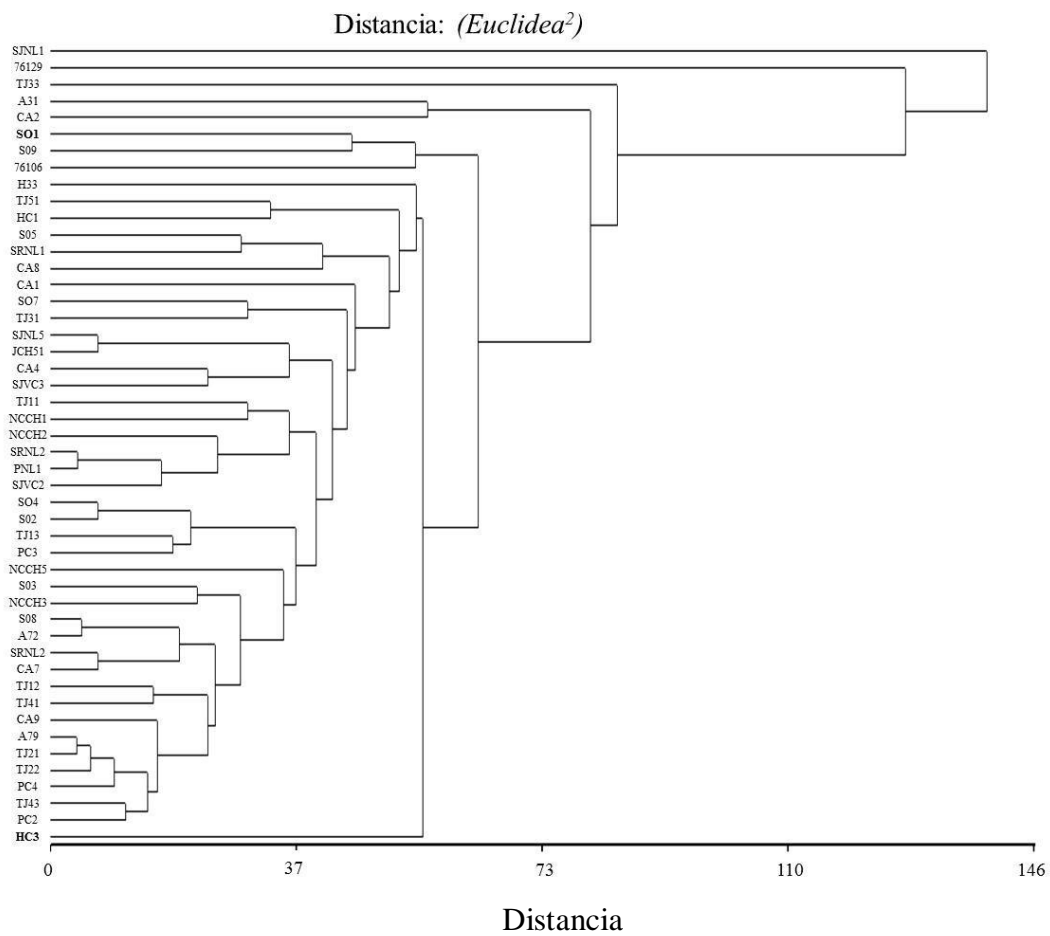


Figura 3. Dendrograma basado in la distancia obtenido por rep-pcr de 48 aislamientos en 7 poblaciones de *Rhizoctonia solani* obtenidas de diferentes regiones de México.

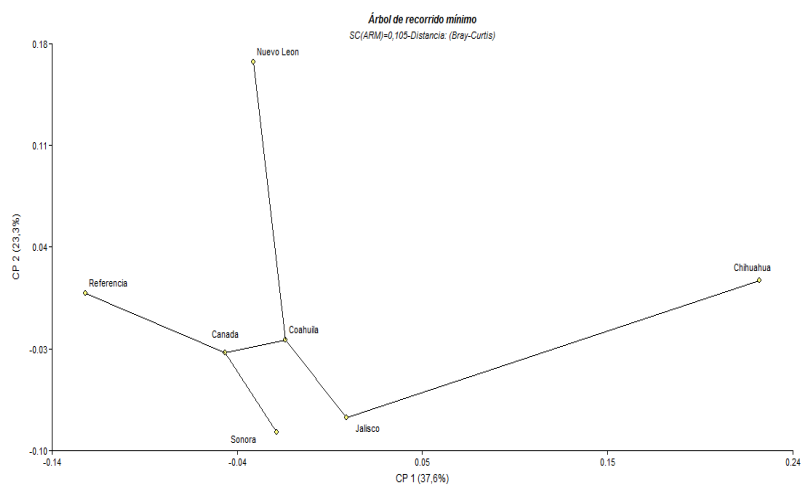


Figura 4. Árbol de recorrido mínimo obtenido por distancias genéticas entre poblaciones de *Rhizoctonia solani*.

ARTICULO II

EFECTO ANTAGÓNICO DE *Bacillus* spp AISLADOS DE RIZOSFERA DE PLANTAS DEL SEMIDESIERTO CHIHUAHUENSE SOBRE *Rhizoctonia solani* KÜHN.

Francisco Castillo-Reyes¹, Mari Carmen López-Pérez¹, Francisco Daniel Hernández-Castillo¹, Gabriel Gallegos-Morales¹, Alberto Flores-Olivas¹ and Raúl Rodríguez-Herrera².

¹ Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, 25315, Saltillo, Coahuila, México

² Departamento de Investigación en alimentos, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, 25000, Saltillo, Coahuila, México

* Corresponding author: Tel: +52 844 411 03 26, fax: +52 844 411 0226. E-mail address: fdanielhc@hotmail.com. (D. Hernández)

Resumen.

Se aislaron bacterias del genero *Bacillus* de la rizosfera de plantas endémicas del desierto Chihuahuense. La determinación del efecto antagonista in vitro de las diferentes cepas aisladas sobre la inhibición micelial de *Rhizoctonia solani* vario desde un 40 a un 67%. La caracterización por secuenciación del gen 16S del ADNr se encontró que 5 de 7 aislamientos son *B. subtilis*, una pertenece al *B. pumilus* y otra a *B. atropheus*. Todas las especies aisladas están reportadas con presencia de efecto antagónico sobre organismos fitopatógenos.

Palabras clave: antagonismo, bacterias, rizosfera, plantas del semidesierto, *Rhizoctonia solani*.

Introducción

Uno de los hongos que limita la producción del cultivo de papa en México es *Rhizoctonia solani* Kühn, la enfermedad que ocasiona es conocida como la costra negra de la papa, la que puede llegar a producir daños serios en el rendimiento y en la calidad de los tubérculos (Hernández *et. al.*, 2001). El principal control de este fitopatógeno se realiza con la aplicación de agroquímicos, sin embargo, el uso de estos productos ha originado diversos problemas debido al impacto ambiental que ocasionan, consecuencias como toxicidad al hombre, además de resistencia de ciertos patógenos (Hernández *et. al.*, 2005). Una alternativa para disminuir el efecto de *R. solani* en el cultivo, es la

utilización de microorganismos antagónicos, principalmente de la bacteria del género *Bacillus* considerada como uno de los agentes de control biológico más eficaces por sus propiedades en la inhibición de fitopatógenos (Schisler *et. al.*, 2004; Sid *et. al.*, 2003). En la microbiota del suelo existe una gran variedad de microorganismos, compuesta por una mezcla de actinomicetos, hongos, bacterias, protozoarios, etc., siendo mayor en la zona de la rizosfera al ser fisiológicamente más activa (Guetsky *et. al.*, 2001). El efecto antagonista que presentan ciertos grupos de hongos y bacterias contra hongos fitopatógenos de suelo es una acción que puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos en vegetales. De esta manera los microorganismos del suelo juegan un papel crítico en la interacción planta-suelo a nivel rizosfera, tanto los patógenos como los agentes de biocontrol (López *et. al.*, 2007). En función a lo anterior, el objetivo de este estudio fue aislar y determinar el efecto antagónico *in vitro* de *Bacillus sp.* de la rizosfera de plantas del semidesierto Chihuahuense sobre *Rhizoctonia solani* Kühn.

Materiales y Métodos

Aislamiento de cepas bacterianas. Se hizo la toma de muestras de la rizosfera de plantas endémicas del semidesierto Chihuahuense, en dos sitios de muestreo. En el sitio uno; Bajío de la UAAA: mezquite, nopal, maguey, gobernadora y lechuguilla; en el sitio dos: gobernadora, yuca, maguey, lechuguilla y nopal. Cada muestra se registró y depositó en una hielera para su traslado al Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología Agrícola en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Las muestras se procesaron individualmente para lo que se pesó un gramo de

suelo y raíces y se colocó en un tubo de ensaye que contenía 9 ml de agua destilada estéril. Todos los tubos se incubaron en baño maría a una temperatura de 80°C por 15 min, después del tiempo transcurrido se dejaron enfriar y se procedió a la inoculación de cada una de las muestras en cajas petri con medio de cultivo papa-dextroza-agar (PDA), colocando 100 uL de la solución de suelo-raíz que se dispersó en toda la caja con la ayuda de una varilla de vidrio; los medios de cultivo se incubaron a 25± 1°C.

Preselección de colonias de *Bacillus* sp. con efecto antagonista. Después de 12 h de incubación de los medios de cultivo, se colocó un explante de 0.5 cm con micelio de *R. solani* y se volvió a incubar a la misma temperatura por 48 h. al termino de este tiempo se seleccionaron las colonias de bacterias que mostraron un efecto en la inhibición del crecimiento micelial de *R. solani* y se sembraron en una nueva caja con PDA colocando cada colonia seleccionada en cada uno de los puntos cardinales de la caja Petri y enseguida se colocó un disco con micelio del hongo y se incubó a la misma temperatura. Por último se purificaron las colonias que mostraron a *R. solani* en medio King de B sembrando por estría sencilla y se verificó la pureza de la colonia bacteriana. Cada aislamiento bacteriano se identificó y conserva a 4°C.

Caracterización morfológica de cepas bacterianas. Se realizaron tinciones de Gram y tinción de endospora, para verificar que la bacteria aislada fuera gran positiva y con frecuencia de endospora como corresponde a el género de *Bacillus*.

Determinación del efecto antagónico de *Bacillus* sp. El efecto antagonista se determinó por medio de la técnica de confrontación dual entre el antagonista y el

fitopatógeno. En cajas petri con medio a base de papa-dextrosa-agar, se colocó una asada de cada cepa bacteriana en los cuatro puntos cardinales de la caja, enseguida se colocó un disco con micelio de *R. solani* y se incubó a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, hasta que el Testigo sin bacteria llenara la caja Petri. Se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento. La variable medida fue el crecimiento radial del hongo confrontado con cada cepa bacteriana, el cual se transformó a por ciento de inhibición. Las diferencias en inhibición se determinaron por la prueba de medias de Tukey.

Caracterización de *Bacillus* spp. por secuenciación de la región ribosomal 16's.

Extracción de ADN. Cada cepa a identificar se incrementó en medio líquido a base de papa- dextrosa y se incubó a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 72 h . En seguida se traslado a la cámara de transferencia laminar en donde se filtro para recuperar la biomasa fungosa y se colocó en papel aluminio estéril identificado con su respectiva clave. Inmediatamente después, se agregó 400 ul de buffer TE 1X, 2.5 ul de SDS al 20% y 20 ul de proteinasa K (20mg/ml), se mezcló por vortex y se incubó por una hora a 37°C . Posteriormente se le agregó 1/3 del volumen total de acetato de sodio al 3.3 M y pH=6.1 más 0.1 volumen de etanol absoluto, se dejó precipitar por 10 min a -20°C . Enseguida se centrifugó a 12 000 rpm durante 10 min y se separó el sobrenadante a un tubo nuevo estéril y adicionó 0.5 ml de Fenol-cloroformo- alcohol isoamilico, se mezcló y centrifugó a 12 000 rpm por 10 min. Posteriormente se recuperó el sobrenadante y agregó 0.5 ml de isopropanol, se centrifugó a 12 000 rpm por 5 min. Después se decantó y lavó la pastilla con etanol al 70%, se dejó secar a temperatura ambiente y se suspendió en agua miliQ, por último se

verifico la integridad y calidad del ADN extraído en gel de agarosa al 1%, bajo electroforesis horizontal aplicando un voltaje de 65 volts por 30 min.

Reacción en cadena de la polimerasa: Una vez obtenido el ADN de las cepas bacterianas, se procedió a amplificar la región ribosomal 16S. Se realizó una mezcla de amplificación en un volumen de 50 ul, compuesto por 14.5 de agua destilada esteril, 2.5 ul de buffer PCR (10X), 1 ul de MgCl₂ (25mM), 0.5 ul de dntp's (10 mM), 2.0 ul de cada iniciador (16s FGPL 5'CCG GGT TTC CCC ATT CGG-3' y 16S FGPS 5'- GGA GAG TTA GAT CTT GGC TC-3), 0.5 ul de ADN Taq-polimerasa y 1.0 ul de ADN. Las reacciones de amplificación se efectuaron usando un termociclador (Thermo Electron Corporation Px2 Thermal Cycler) bajo el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95°C por un min, 35 ciclos a 95°C por 1, 54°C por 1 y 72°C por 1 min y una extensión final de 72°C por 5 min. Las bandas amplificadas se observaron en un gel de agarosa al 1.5 %.

Secuenciación de productos de PCR: La secuenciación se efectuó en la unidad de síntesis y secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM (USSDNA), utilizando el método de Singer. Una vez obtenidos las secuencias, se analizaron en la base de datos del GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) on line (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), usando la herramienta BLAST (Basic Local Aligment Search Tool) para secuencias altamente similares, comparando cada secuencia del gen 16S amplificado obtenidas de los aislamientos de la rizosfera (cuadro 3), con las secuencias almacenadas en la base de

datos. Cada una de las secuencias obtenidas se le depuro la parte inicial y final (20 y 5 nucleótidos) por razón de aumentar la sensibilidad del análisis.

Resultados y Discusión.

Distribución de cepas bacterianas en la rizosfera de plantas del semidesierto. De un total de 80 colonias aisladas se seleccionaron 14 cepas con efecto en la inhibición del crecimiento del micelio de *R. solani* (Cuadro 1). En la caracterización morfológica, todas las cepas presentaron forma de bacilo, tinción de Gram positiva y formación de endospora en la parte central.

Efecto de *Bacillus* sp en la inhibición del crecimiento del micelio de *R. solani*. El análisis de varianza detecto diferencias significativas ($p = 0.05$) en el desarrollo del micelio por efecto de las cepas bacterianas (Cuadro 3). El mayor efecto se observó con un 67% y el menor con 40 % sobre la inhibición de *R. solani*. Estos resultados contrastan con los obtenidos con Hernández-Castillo *et. al.*, (2008), quienes encontraron un efecto máximo en la inhibición de *R. solani* de 40.4% con cepas de *Bacillus* spp, aisladas de la rizosfera de plantas de los cultivos de papa y chile. Así mismo son similares con los de Mojica-Marin *et. al.*, (2009), quienes encontraron un rango de inhibición de 34.4 a 66.6 por ciento en la inhibición micelial de *R. solani* por *B. thuringiensis*. En relación a el comportamiento del fitopatógeno, parece ser que las cepas de *Bacillus* aislados de la rizosfera de especies de plantas diferentes al cultivo son más eficaces para inhibir a *R. solani* in vitro.

La prueba de cultivo duales es extensamente usada como una de las pruebas preliminares *in vitro* para seleccionar agentes de control biológico (Desai *et. al.*, 2002). En el presente estudio, este método mostro que las 15 cepas de bacterias evaluadas presentaron diferentes capacidades para inhibir a *R. solani*, por ejemplo la cepa 53F6 produjo la mayor inhibición de crecimiento (67.2%) de *R. solani*, mientras que la cepa 5.1 inhibio un 40.0%. En este sentido, esta ampliamente documentado que cepas de una misma especie, pueden exhibir diferentes capacidades para producir toxinas e inhibir el crecimiento de diferentes microorganismos (Choi *et. al.*, 1999). La antibiosis es generalmente el modo de antagonismo observado en *Bacillus* spp. (Edwards *et. al.*, 1994). La mayoría de las especies de *Bacillus* spp. producen muchas clases de antibióticos como bacilomicina, fungimicina, micosubtilina y zwittermicina, las que han demostrado ser efectivos en suprimir el crecimiento de patógenos *in vitro* y/o *in situ* (Pal y Gardener, 2006). Además las diferentes especies de *Bacillus* pueden atacar por competencia por nutrientes, sitios de exclusión e infección, parasitismo y/o inducción de resistencia (Jacobsen y Backman, 1993; Arras y Arru, 1997; Kloepper *et. al.*, 2004), disminuyendo el efecto dañino de los fitopatógenos. También se menciona que el efecto inhibidor de las especies de *Bacillus* en hongos que causan enfermedades en las plantas puede estar asociado a la producción de enzimas que actúan en la degradación de la pared celular, debido a que algunas bacterias antagónicas producen quitinasas (Mavingi y Heulin, 1994; Asaka y Shoda, 1996; Barboza *et. al.*, 1999). Este efecto ha sido reportado por Basha y Ulaganathan (2002) al encontrar que *Bacillus* sp. (cepa BC121) produjo en *Curvularia lunata*, la presencia anormal de hifas, condensación, deformación y ocurrencia de malformaciones extensivas y daños al micelio. La especie *Bacillus cereus* modifico la composición iónica del medio de cultivo en el que fue

cultivado, aumento el pH, secuestro calcio y la secreción de amonio. Esta combinación es altamente toxica a las zoosporas de Oomycetes patógenos, causando un rápido ensanchamiento y expulsión de la vacuola, seguido de lisis de las zoosporas (Emmert y Handelsman, 1999).

Caracterización de *Bacillus* spp por secuenciación de genes 16's ribosomales. El gen ribosomal 16S es frecuentemente empleado para estudios filogenéticos debido a que es una secuencia altamente conservada entre las diferentes especies de bacterias; el gen se encuentra ubicado en la subunidad pequeña del ribosoma (30S), aunado a esto, el gen ribosomal 16S es una región hiper variable lo que prevé especificidad de especie, lo que resulta muy útil para la identificación de especies bacterianas. La región amplificada por los iniciadores FGPS y FGPL de siete cepas en estudio fue de 350 bp aproximadamente. En el (cuadro 3) se muestran las secuencias depuradas del gen 16S ribosomal de *Bacillus* spp obtenidas de aislamientos de la rizosfera de plantas del desierto. En el cuadro 4 se enlistan las especies identificadas de bacterias aisladas de la rizosfera de plantas del desierto con efecto antagónico sobre la especie del fitopatógeno *R. solani*, pertenecientes al género *Bacillus*. Cada especie bacteriana (cepa) confirma su identidad en su mayoría en un 100% con las secuencias contenidas en el Genbank, con coberturas que van desde 99-100% de la secuencia total con la que se comparó.

El género *Bacillus* es un grupo heterogéneo y puede ser re-clasificado en varios grupos en base a características bioquímicas, metabólicas, y en homología fenotípica y genotípica de secuencias de ADNr 16S. De acuerdo a la clasificación específica por análisis de ADN *B. pumilus* está reportado como un biofungicida con efecto en una

variedad de fitopatógenos, en aplicaciones preventivas y curativas especialmente en manchas foliares, tizones, mildiu, oídio, *Rhizoctonia* y *Fusarium* (EPA, 2011; Schisler *et. al.*, 2004; Anith *et. al.*, 2004). *B. atrophaeus* está reportado como agente de control sobre *Erwinia amylovora* con un índice de antagonismo de 0.53 (Pusey *et. al.*, 2009). *B. subtilis* es de los microorganismos más estudiados y reportado como promotor de crecimiento y antagonico a una gran variedad de fitopatógenos como *Phytophthora cactorum*, *Sclerotium cepivorum*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria carthami*, *Phytophthora capsici*, *Fusarium solani*, entre otros, en distintos cultivos y evaluados *in vitro*, en invernadero y campo (Chowdhury, 1997; Yuen *et. al.*, 1985; Guillen *et al.*, 2006; Suarez *et. al.* 2011). Debido a estas referencias es posible considerar que las cepas estudiadas en este ensayo pueden ser utilizados como una alternativa en el control biológico de *R. solani* con resistencia a fungicidas, mediante la aplicación individual o en mezcla de cepas para eficientar el control

Conclusiones

Los aislamientos de *Bacillus* obtenidos de la rizosfera de plantas del desierto chihuahuense presentan un efecto antagonista sobre el hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. Las especies encontradas son *Bacillus subtilis*, y en menor presencia las especies *B. pumilus* y *B. atrophaeus*.

Referencias.

- Anith, K. N., Momol, M. T., Kloepper, J. W., Marois, J. J., Olson, S. M., and Jones, J. B. 2004. Efficacy of plant growth-promoting rhizobacteria, acibenzolar-*S*-methyl, and soil amendment for integrated management of bacterial wilt on tomato. *Plant Dis.* 88:669-673.
- Arras, G. y S. Arru (1997). Mechanism of action of some microbial antagonists against fungal pathogens. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia* 47: 97-120.
- Asaka, O. y M. Shoda (1996). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 4081-4085.
- Barboza, C.J.E., J.C. Contreras, R.R. Velasquez, J.M. Bautista, R.M. Gomez, C.R. Cruz y J.E. Ibarra (1999). Selection of chitinolytic strains of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology Letters* 21: 1125-1129.
- Basha, S. y K. Ulaganathan (2002). Antagonism of *Bacillus* species (strain BC121) towards *Curvularia lunata*. *Current Science* 82: 1457-1463.
- Choi, K.C., C. Young., S.H. An y B. Yook (1999). Effects of antagonistic bacteria and soil borne pathogenic fungi on growth of pasture plant seedlings. *Korean Journal of Dairy Science* 21: 41-48.

Desai, S., M.S. Reddy y J.W. Kloepper (2002). Comprehensive testing of biocontrol agents. En: Gnanamanickam, S.S. (ed). *Biological Control of Crop Diseases*. Marcel Dekker, Inc., New York • Basel, USA. pp. 387-420.

Edwards, S.G., T. McKay y B. Seddon (1994). Interaction of *Bacillus* species with phytopathogenic fungi-Methods of analysis and manipulation for biocontrol purposes. En: Blakeman J.P. and Williamson B. (ed). *Ecology of Plant Pathogens*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK. pp. 101-118.

Emmert, E.A.B. y J. Handelsman (1999). Biocontrol of Plant Disease: A (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology Letters* 171: 1-9.

Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., and Dinoor, A. 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathology* 91:621-627.

Hernández, C. F. D., Cepeda, S. M., García, C. J y Pérez, Ch. A. 2001. Grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* de la región papera de Toluca estado de México y susceptibilidad in vitro a fungicidas de diferente grupo toxicológico. *AGRARIA UAAAN* 17 (2): 59-67.

Hernández, F.D., Carvajal, C. R., Guerrero, E., Sánchez, A., Gallegos, G., Lira, R. H. 2005. Susceptibilidad a fungicidas de grupos de anastomosis del hongo de

Rhizoctonia solani Kühn colectados en zonas paperas de Chihuahua, México.

Revista Internacional de Botánica Experimental 259-269 pp.

Hernández-Castillo, F.D., Lira-Saldívar, R.H., Cruz-Chávez, L., Gallegos-Morales, G., Galindo-Cepeda, M.E., Padrón-Corral, E. y Hernández-Suárez, M. 2008. Potencial antifúngico de cepas de *Bacillus* spp. y extracto de *Larrea tridentata* contra *Rhizoctonia solani* en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). Revista Internacional de Botánica Experimental, 77: 241-252

Jacobsen, B.J. y P.A. Backman (1993). Biological and cultural plant disease controls: Alternatives and supplements to chemicals in IPM systems. *Plant Disease* 77:311-315.

Kloepper, J.W., C.M. Ryn y S. Zhang (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* sp. *Phytopathology* 94: 1259-1266.

López, B.J., Campos, C.J.C., Hernández, C.E., Velásquez, B.C., Farías, R.R.Macias, R.L.I. and Valencia, C.E. 2007. *Bacillus megaterium* Rhizobacteria Promote Growth and Alter Root-System Architecture Through an Auxin- and Ethylene-Independent Signaling Mechanism in *Arabidopsis thaliana*. The American Phytopathological Society MPMI 20(2): 207–217.

- Mavingui, P. y T. Heulin (1994). *In vitro* chitinase and antifungal activity of a soil, rhizosphere and rhizoplane population of *Bacillus polymyxa*. *Soil Biology and Biochemistry* 26: 801-803.
- Mojica-Marin, V., Luna-Olvera, H.A., Sandoval-Coronado, C.F., Pereyra-Alferez, B., Morales-Ramos, L.H., González-Aguilar N.A., Hernández-Luna, C.E. y Alvarado-Gómez, O.G. 2009. Control biológico de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) por *Bacillus thuringiensis*. *Revista Internacional de Botánica Experimental*, 78: 105-110.
- Pal, K.K., Gardener, B.M. (2006). (Eds). *The Plant Health Instructor* in Biological control of plant pathogens, Constable, London, English, 206p.
- Pusey, P. L., Stockwell, V. O., and Mazzola, M. 2009. Epiphytic bacteria and yeasts on apple blossoms and their potential as antagonists of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 99:571-581.
- Schisler, D. A., Slininger, P. J., Behle, R. W., and Jackson, M. A. 2004. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. *Phytopathology* 94:1267-1271.
- Sid Ahmed, A., Ezziyani, M., Pérez Sánchez, C., and Candela, M. E. 2003. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. And *Trichoderma harzianum*

against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. Eur. J. Plant Pathol. 109:633-637.

Van Veen, J.A., Oberbeek, L.S., and Elsas, J.D. 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. Microbiology and Molecular Biology Reviews 61:121-135.

Yuen, G.Y., Schroth, M.N., and McCain, A.H. 1985. Reduction of *Fusarium* wilt of carnation with suppressive and antagonistic bacteria. Plant Disease 69:1071-107

Cuadro 1. Diversidad de cepas en plantas del semidesierto con efecto antagonista sobre *Rhizoctonia solani*.

Especie Vegetal	Cepas aisladas	Tinción de Gram	Morfología
Mezquite	1	+	Bacilo
Gobernadora	6	+	Bacilo
Nopal	1	+	Bacilo
Lechuguilla	4	+	Bacilo
Yuca	2	+	Bacilo

Cuadro 2. Efecto antagónico de cepas de *Bacillus* sp. aislados de la rizosfera de plantas del semidesierto Chihuahuense sobre la inhibición micelial de *Rhizoctonia solani*.

Origen	Aislamiento	Mean	Std Dev	Grupo
Gobernadora	5.3F	67.27	3.98	A
Gobernadora	5.1F	63.65	2.05	AB
Nopal	6.1F	62.95	2.47	AB
Mezquite	1.2F	61.75	2.11	ABC
Gobernadora	1.1	61.25	2.34	ABCD
Gobernadora	1.3	59.44	1.66	ABCDE
Gobernadora	1.4	58.33	2.90	ABCDE F
Lechuguilla	4.3	57.15	3.85	ABCDE F
Maguey	B2.1	57.03	7.63	BCDE F
Gobernadora	5.4F	56.83	5.41	BCDE F
Lechuguilla	4.4	51.80	1.59	CDE F
Lechuguilla	4.2	51.31	4.32	DE FG
	BCC1	49.40	0.60	E FGH
Lechuguilla	4.1	48.19	2.27	FGH
Yuca	5.4	41.56	1.05	GH
Yuca	5.1	40.76	5.26	H
	<i>R. solani</i>	0	0	I

Cuadro 3. Secuencias amplificadas depuradas del gen 16S obtenidas de los aislamientos bacterianos de la rizosfera de las plantas del desierto.

ORGANISMO	SECUENCIA
B201	ACCCATCATCTGTCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGTTACCTC ACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACA AGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGA TTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAG ATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCA TTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTC ATCC
1302	ACCCATCATCTGTCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGTTACCTC ACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACA AGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGA TTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAG ATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTCTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCA TTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTC ATCC
1403	TCCCCATCATCTGTCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGTTACCTC ACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACA AGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGA TTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAG ATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTCTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCA TTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTC ATC
4304	CCCATCATCTGTCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGTTACCTCA CCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAA GGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGAT TCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGA TTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCAT TGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTC TCC
51F5	TACCCATCATCTGTCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGTTACCTC ACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACA AGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGA TTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAG ATTTGCGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCA TTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTC ATC
53F6	ACCCATCATCTGTCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGTTACCTC ACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACA AGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGA TTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAG ATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCA TTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTC ATCC
61F7	TACCCATCATCTGTCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGTTACCTC ACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACA AGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGA TTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAG ATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCA TTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTC ATC

Cuadro 4. Especies bacterianas identificadas por comparación con secuencias contenidas en GenBank.

CLAVE	ORGANISMO IDENTIFICADO	DESCRIPCIÓN				
		Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
B201	<i>Bacillus subtilis</i>	564	564	100%	1.00E-157	100%
1302	<i>Bacillus atrophaeus</i>	564	564	100%	1.00E-157	100%
1403	<i>Bacillus pumilus</i>	564	564	100%	1.00E-157	100%
4304	<i>Bacillus subtilis</i>	556	556	100%	2.00E-155	99%
51F5	<i>Bacillus subtilis</i>	556	556	99%	2.00E-155	99%
53F6	<i>Bacillus subtilis</i>	564	564	100%	1.00E-157	100%
61F7	<i>Bacillus subtilis</i>	562	562	99%	5.00E-157	100%

ARTÍCULO III

***In vitro* Antifungal Activity of Plants Extracts Obtained with Alternative Organics Solvents Against *Rhizoctonia Solani* Kühn**

Authors:

Francisco Castillo¹, Daniel Hernández^{1*}, Gabriel Gallegos¹, Martha Mendez², Raúl Rodríguez², Alfonso Reyes³ and Cristóbal N. Aguilar²

¹ *Department of Agricultural Parasitology, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, 25315, Saltillo, Coahuila, Mexico.*

² *Department of Food Research, School of Chemistry, Universidad Autónoma de Coahuila, 25000, Saltillo, Coahuila, Mexico.*

³ *Department of Horticulture, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, 25315, Saltillo, Coahuila, Mexico.*

* Corresponding author: Tel: +52 844 411 03 26, fax: +52 844 411 0226. E-mail address: fdanielhc@hotmail.com. (D. Hernández)

Abstract

There is a lack of knowledge about the antimicrobial activity of plant extracts obtained with organic solvents different to ethanol, methanol or acetone. In this study, plant extracts from *Larrea tridentata*, *Flourensia cernua*, *Agave lechuguilla*, *Opuntia* sp. and *Yucca* sp., obtained with alternative organic solvents (lanolin and cocoa butter) and water were tested against the fungus *Rhizoctonia solani*. In addition, the IC₅₀ concentration of each plant extract was determined. Extractions using the alternative organic solvents permitted the extraction of tannins in higher amount than those obtained using water as solvent. Tannin extraction was strongly dependent on plant species as well as on the solvent used. Results showed that extracts from *L. tridentata* and *F. cernua* using lanolin and cocoa butter to dozes 2000 and 1000ppm of total tannins inhibited 100% the *R. solani* growth. The IC₅₀ for each extract was highly variable; the lowest IC₅₀ value was obtained with *L. tridentata* extract using lanolin to 1.85×10^2 ppm. The lanolin and cocoa butter solvents allowed high recovery of polyphenolic molecules with strong antifungal activity against *R. solani*, and offer an alternative in production of antimicrobial agents for organic agriculture.

Keywords: Plant-extracts, organics solvents, Lanolin, Cocoa butter, IC₅₀, *R. solani*, mycelia inhibition.

1. Introduction

Rhizoctonia solani is one of the causal agents of diseases associated with roots and tubers of different crops, causing significant yield losses (Carling *et al.*, 1989). The incidence of this pathogen increases cost of these commodities by use of agrochemicals (fungicides) needed for its control. The use of some of these fungicides induces genetic resistance in fungal populations and causes environmental damage (Hernández *et al.*, 2008; Cooke *et al.*, 2003; Leroux, 2003). The potential use of plant extracts with antifungal properties for control of phytopathogens has been demonstrated at laboratory, greenhouse and at field level (Bergeron *et al.*, 1995). Worldwide, more than 2000 plant species have been reported with microbial properties (Grainge and Ahmed, 1988). In Mexico have been reported more than 200 plant species with antifungal activity (Montes *et al.*, 2000). These antifungal properties are given by chemical compounds produced as secondary metabolites such as polyphenols, which are part of plant defense mechanisms against arthropods and microorganisms. For extraction of active phytochemicals against fungal pathogens, the most commonly used solvents are methanol, ethanol, hexane, chloroform and diethyl ether (Gamboa *et al.*, 2003b; Guerrero *et al.*, 2007; Lira-Saldívar *et al.*, 2007; Jasso de Rodríguez *et al.*, 2007). Most of these solvents cannot be used in the context of organic production systems because their use is not allowed. By this reason, it is necessary to search for new organic solvents which allow extract more and different polyphenols, also these new solvents must be recognized as safe to be used under organic production systems. The efficiency of conventional solvents in phytochemical extraction is due to their polarity properties, which permits an association between the lipophobic regions of an important group of bioactive molecules, including

polyphenols such as hydrolysable tannins and free phenolic acids. The lanolin and cocoa butter are hydrophobic organic substances and therefore non-polar extracting agents, which favor the separation of those water-insoluble bioactive compounds present in the system, among these compounds are: complex tannins, terpens, and glucoside esters. The plants from semi desert areas represent a great potential as antimicrobial sources. These plants are healthy in most of the cases not only due to their density, but also due to biological specialization. However, there are only few reports of using semiarid plant extracts obtained using organic solvents for plant pathogens control. The objectives of this study were: (1) to evaluate the inhibitory effects of extracts of *Larrea tridentata*, *Flourensia cernua*, *Agave lechuguilla*, *Opuntia* sp. and *Yucca* sp, obtained with alternative organic solvents against *R. solani* and (2) to determine the IC₅₀ concentration of each plant extract.

2. Materials and methods

2.1. Vegetal material

Leaves of *L. tridentata*, *F. cernua*, *A. lechuguilla*, and *Yucca* sp., and stalks of *Opuntia* sp. were collected from areas nearby to Saltillo, Coahuila, Mexico during August and September of 2008. Vegetal tissue was dehydrated and grinded. Dehydration was carried out both at room temperature for 7–10 days and using a conventional oven (Labnet International, Inc.) at 60 °C for 2 days, the milling process was performed using a miller (Thomas Wiley). Fine powder was obtained using a 1mmscreen; the powder was stored

in amber bottles or dark plastic bags at room temperature until polyphenolic compounds extraction was performed.

Polyphenolic compounds extraction from each collected sample was in a proportion of 1:4 (w/v) for infusion method. For the lanolin and cocoa butter extractions were doing emulsions using mineral oil (10%) at 60 °C for 7 h. After this, extracts were filtered. The obtained extracts were stored in containers covered with aluminum or amber bottles at 5 °C.

2.2. Tannins concentration

Concentration of hydrolysable (Makkar, 1999) and condensed tannins (Swain and Hillis, 1959) were determined by spectrophotometry. For condensed tannins determination 0.5 ml of plant extract was used with 3ml of HCl/butanol (1:9) and 0.1 ml of ferric reagent. The standard was prepared using catechin dissolved in distilled water at different concentrations (0, 200, 400, 600, 800 and 1000 ppm). Samples were heated for 1 h in water bath at 90 °C. Absorbance was read at 460 nm.

For hydrolysable tannins determination, a reference curve was done by using 400_1 of gallic acid at different concentrations (0, 200, 400, 600, 800, 1000 ppm). Gallic acid concentrations were prepared using distilled water. Each one of the plant extract was diluted in a test tube, and was added 400_1 of commercial Folin–Ciocalteu reagent. Samples were vortexed and left for 5min at room temperature. Then 400_1 of

NaCO₃ (0.01M) and 2.5 ml of distilled water were added. Finally absorbance was read at 725 nm.

2.3. Effect of the organic plant extracts on *R. solani* mycelia growth

Tannin concentrations of the tested extracts are shown in Table 1. The poisoned culture medium technique was used to determine the effect of different extracts on inhibition of *R. solani* mycelia growth. In this case, four Petri dishes with one of the different extract concentration were used per treatment. First, the volume required for each extract and concentration was determined. This amount was added to an Erlenmeyer flask with the required water content and PDA medium. Then, flasks were sterilized at 120 °C for 15 min.

Discs with fungal mycelia (0.4cm in diameter) were placed on Petri dishes, which had poisoned culture media. This was done for each different extract and concentration. Petri dishes were incubated at 25±2 °C. The efficacy of treatments was evaluated measuring fungal radial growth (cm). The percent of mycelia growth inhibition (P) was estimated using as reference the control treatment (Petri dishes only with PDA medium) as follows: $P = (C-T)/C \times 100$, where C is the colony diameter under the control treatment and T is the colony diameter under the extract treatment.

The experiment was established under a completely randomized design with four replications. The Probit analysis was made to determine the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of each extract. Data were analyzed using the software SAS V8.1.

3. Results and Discussion

3.1 Effect of alternative organic solvents on total polyphenols content extracted

Total tannin extracted amounts from each plant is in function of the alternative organic solvent and plant specie used. In addition, it was observed an interaction between plant specie and solvent for total tannins extraction (Fig. 1). In *Larrea* and *Fluorensia* extracts, total tannins amount using cocoa butter and lanolin as solvents were higher than those observed using water (2.58×10^4 , 1.61×10^4 and 1.29×10^4 ; 2.32×10^4 , 1.57×10^4 and 4.73×10^3 , respectively). Results observed were totally opposite for *Yucca* extracts. In *Agave* extracts total tannin amounts using lanolin and water were higher than that obtained using cocoa butter (4.26×10^4 , 2.10×10^4 and 1.60×10^3 , respectively).

The differences observed in the total tannin amount among the different extracts may be attributed to plant generous and species used in this study. In addition, tannin content in vegetal tissue is affected for: season of plant tissue recollection, vegetative part, plant growing conditions (Gamboa *et. al.*, 2003a; Hyder *et. al.*, 2005) and solvent used which confirm our results. The higher amounts of polyphenols extracted with alternative organic solvents (lanolin and cocoa butter) may be due to the association formed between the hydrophobic region present in their structures, and the lipophilic region of the polyphenolic ester group, in comparison to the hydrophilic region of the water molecule. Lanolin is a complex mixture of esters of sterols, triterpene alcohols, esters of aliphatic alcohols and monohydroxyesters of sterols and triterpenes and aliphatic alcohols (Schlossman and McCarthy, 1978), while cocoa butter is composed by

glycerides, mainly oleo-almistostearin, oleo-distearin, oleodipalmitin, stearo-diolein, palmito-dioleintrisaturatedtriolein and triunsaturatedtriolein (Beckett, 1994). In addition, other lipophilic phytochemical compounds could be extracted with these kinds of alternative solvents, mainly alkaloids, terpenes and lactone derivatives.

3.2 Effect of organic plant extracts on inhibition of *R. solani* mycelia growth

The analysis of variance showed highly significant effects ($P < 0.01$) for inhibition of *R. solani* mycelia growth as a function of the plant extracts and the solvent used. The mycelia inhibition was highly variable among the different plant extracts, where the highest inhibition effect was obtained with *F. cernua* and *L. tridentata* extracts (76.2 and 69.8% of mycelia inhibition, respectively). In contrast, the lowest mycelia inhibition effects were observed with *Yucca* sp., *Opuntia* sp. and *A. lechuguilla* extracts (<30%) (Table 2). These results confirm that *L. tridentata* and *F. cernua* from the semiarid regions of Mexico have high amounts of tannins and having a pool of unknown and well-defined phytochemicals with antimicrobial potential, to be used against plant pathogenic fungi. Lira-Saldivar *et. al.* (2003) reported that the extract of *L. tridentata* Cov. was effective against *Pythium* sp. Ventura-Sobrevilla *et. al.* (2006) reported that the extract of *F. cernua* was effective against some important fungi, including *Penicillium purpurogenum*, *Fusarium* spp., *Alternaria alternata*, *R. solani* and *Aspergillus flavus*.

In our study, the plant extracts obtained with alternative organic solvents (lanolin and cocoa butter) showed significant differences on inhibition of *R. solani* mycelia growth (Fig. 2). The highest inhibitory effects on mycelia growth were observed with extracts

using cocoa butter as solvent (Fig. 3). These results suggest that these emulsions were better to extract more and different phytochemical compounds from plant tissues.

On the other hand, it was observed that the effect of the extract on fungal inhibition depended on the solvent used for extraction and the plant species from which the extract was obtained. Like this, each extract had a different degree of fungal inhibition, for example, with the *L. tridentata*-lanolin extract with 500ppm of total tannins was observed a 80% of mycelia inhibition, but when total tannin amount was increased (2000 ppm) in this extract, the mycelia inhibition increased to 100% (Fig. 2a). Extracts of the same plant but using cocoa butter as solvent were required 3000ppm of total tannins for similar percentage of mycelia inhibition (100%), for extracts using water were only was achieved 80% of mycelia inhibition to the highest evaluated doses (8000 ppm). This indicates that some treatments inhibit more the fungal growth when higher concentrations of total tannins are used. The highest (100%) inhibition effects by *F. cernua* extracts was found when cocoa butter was used as solvent and with 1000ppm of total tannins, while the extract of the same plant but using lanolin or water only inhibited in a 73.2 and 94.2% with the highest total tannin concentrations (Fig. 2a).

In this study, inhibition of *R. solani* was observed at total tannin concentrations in the plant extract as low as 200 ppm. In contrast, Gamboa *et. al.* (2003a,b) reported the inhibition of *R. solani* using *F. cernua* extract at total tannin concentration as high as 20,000 ppm. On the other hand, our results suggest that emulsions obtained with lanolin and cocoa butter inhibit better this pathogen than extracts using water or methanol as solvents. Gamboa *et. al.* (2003a) found an inhibition effect of 98% of *R. solani* mycelia

growth with *Larrea* extracts using methanol as solvent. The same authors reported an inhibitory effect of 86% on *R. solani* mycelia growth with *F. cernua* extract using methanol as solvent (Gamboa *et. al.*, 2003b). Type and concentration of phytochemicals recovered during the extraction process determine the efficiency of the inhibitory capacity, this study demonstrate that the use of alternative organic solvents promote separation of different types and concentration of bioactive compounds, due to the polarity differences and partition points of bioactive compounds. These differences may be given by the phytochemicals extracted with the solvents used, sampling collecting time and environments where plants used as phytochemical sources were grown.

3.3. Inhibitory concentrations of plant extract to 50% (IC50)

The IC50 of the different plant extracts was found at a range of concentrations from 4.20×10^2 ppm to 5.73×10^4 ppm for plant extracts based on water, from 1.85×10^2 ppm to 2.07×10^4 ppm for plant extracts using lanolin and from 4.54×10^2 ppm to 4.9×10^8 ppm for plant extracts using cocoa butter. The lowest concentration to inhibit *R. solani* mycelia growth to 50% was found for *L. tridentata* using lanolin and the highest concentration was for *Opuntia* sp. extracts using cocoa butter (Table 3). These IC50 values in some extracts of *L. tridentata*, *F. cernua* and *Opuntia* sp., are lower than the doses required to inhibit 100% *R. solani* in vitro with active ingredients such as methyl tolclifos (4.56×10^3 ppm) (Gamboa *et. al.*, 2003b).

4. Conclusions

Use of alternative organic solvent allowed the obtention of plant extract with high antifungal activity against *R. solani*, in specific, use of lanolin and cocoa butter allowed to extract higher amounts of polyphenolic compounds than water. The organic extracts with higher activity against *R. solani* were those from *L. tridentata*-lanolin, *F. cernua*-cocoa, *L. tridentata*-cocoa, *F. cernua*-lanolin and *F. cernua*-water. To the best of our knowledge, this is the first report using no conventional organic solvents (lanolin and cocoa butter) to extract phytochemical compounds with antifungal activity. These solvents represent an attractive alternative to obtain natural products for plant fungal control, avoiding synthetic chemical fungicide applications.

Acknowledgements

This investigation was supported by a collaborative funding grant to GBS SA de CV. Project M0005-208-C06 from the National Council of Science and Technology of Mexico. Author F. Castillo thanks to CONACYT for the financial support provided during his Ph.D. Studies.

References

Beckett, S.T., 1994. Industrial Chocolate Manufacture and Use, 2nd ed. Blackie Academic& Professional, 408 p.

- Bergeron, C., Marston, A., Hakizamungu, E., Hostettmenn, K., 1995. Antifungal Constituents of *Chenopodium procerum*. *Int. J. Pharmacog.* 33, 115–119.
- Carling, D.E., Leiner, R.H., Westphale, P.C., 1989. Symptoms, signs and yield reduction associated with *Rhizoctonia* disease of potato induced by tuber borne inoculum of *Rhizoctonia solani* AG-3. *Am. Potato J.* 6, 639–697.
- Cooke, D.E.L., Young, V., Birch, P.R.J., Toth, R., Gourlay, F., Day, J.P., Carnegie, S.F., Duncan, J.M., 2003. Phenotypic and genotypic diversity of *Phytophthora infestans* populations in Scotland (1995–97). *Plant Pathol.* 52, 181–192.
- Gamboa, A.R., Hernández, C.F.D., Guerrero, R.E., Sanchez, A.A., Villareal, L.A., López, R.G., Jiménez, F., Lira, S.R.H., 2003a. Antifungal effect of *Larrea tridentata* extracts on *Rhizoctonia solani* Kühn and *Phytophthora infestans* Mont (De Bary). *Int. J. Exp.Bot.*, 119–126.
- Gamboa, A.R., Hernández, C.F.D., Guerrero, R.E., Sanchez, A.A., 2003b. Mycelia inhibition of *Rhizoctonia solani* Kühn and *Phytophthora infestans* Mont (De Bary) with methanolic vegetal extracts from tarbush (*Florenzia cernua* D.C.), Mejorana (*Origanum majorana* L.) and trompetilla [*Bouvardia ternifolia* (Ca.) Schlecht]. *Rev. Mex. Fitopatol.* 21 (1), 13–18 (in Spanish).
- Grainge, M. and Ahmed, S. 1988. Handbook of plants with pest control properties. John Wiley & Sons, New York.
- Guerrero, R.E., Solís, G.S., Hernández, C.F.D., Flores, O.A. and Sandoval, L.V. 2007. Actividad biológica in vitro de extractos de *Flourenzia cernua* D.C. en patógenos de postcosecha: *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl., *Colletrichum gloeosporoides*

(Penz.) Penz y Sacc. y *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) y Sacc. Rev. Mex. Fitopatol. 25, 48–53 (In Spanish).

Hernández, C.F.D., Lira, S.R.H., Cruz, C.L., Gallegos, M.G., Galindo, C.M.E., Padrón, C.E., Hernández, S.M., 2008. Antifungal potential of *Bacillus* spp. strains and *Larrea tridentata* extracts against *Rhizoctonia solani* in potato (*Solanum tuberosum* L.). Int. J. Exp. Bot. 77, 119–126.

Hyder, P.W., Fredrickson, E.L., Estell, R.E., Lucero, M.E., Remmenga, M.D., 2005. Loss of phenolic compounds from leaf litter of creosote bush [*Larrea tridentata* (Sess. & Moc. ex DC.) Cov.] and tarbush (*Flourensia cernua* DC.). J. Arid Environ. 61, 79–91.

Jasso de Rodríguez, D., Hernández, C.D., Angulo, S.J.L., Rodríguez, G.R., Villarreal, Q.J.A., Lira, S.R.H., 2007. Antifungal activity in vitro of *F. cernua* extracts on *Alternaria* sp., *Rhizoctonia solani*, and *Fusarium oxysporum*. Ind. crops prods. 25, 111–116.

Leroux, P., 2003. Mode of action of agrochemicals towards plant pathogens. C R Biol. 326, 9–21.

Lira-Saldivar, R.H., Balvantín, G.F., Hernández-Castillo, F.D., Gamboa, A., Jasso de Rodriguez, D., Jiménez, D.F., 2003. Evaluation of resin content and the antifungal effect of *Larrea tridentata* (Sesse and Moc. Ex D. C.) Coville extracts from two Mexican deserts against *Pythium* sp. Pringsh. Rev. Mex. Fitopatol. 21, 97–101.

- Lira-Saldívar, R.H., Hernández-Suárez, M., Chavéz-Betancurt, C., Hernández-Castillo, F.D., Cuellar-Villareal, E., 2007. Bio-pesticides and Biological Control. CIQA, Monterrey, México, pp. 13–29. (in Spanish).
- Makkar, H.P.S., 1999. Quantification of tannins in tree foliage: A laboratory manual for FAO/IAEA. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Vienna, Austria, pp: 5–7.
- Montes, B.R., Cruz, C.V., Martinez, M.G., Sandoval, G.G., García, L.R., Zilch, D.S., Bravo, L.L., Bermudez, T.L. y Flores, M.H.E. 2000. Propiedades antifúngicas en plantas superiores. Análisis retrospectivo de investigaciones. Rev. Mex. Fitopatol. 18, 125–131 (In Spanish).
- Swain, T., Hillis, W.E., 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica* L. the quantitative analysis of phenolic constituents. J. Sci. Food and Agriculture 10, 63–68.
- Schlossman, M.L., McCarthy, J.P., 1978. Lanolin and its derivatives. J. Am. Oil Chem. Soc. 53, 447–450.
- Ventura-Sobrevilla, J., Saucedo-Pompa, S., Belmares-Cerda, R., Aguilera-Carbo, A., Heredia, N., Aguilar, C.N., 2006. New Effective Alternatives of Control of Bacterial and Fungal Foodborne Pathogens (in Spanish). International Congress on Food Safety, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, NL, México.

Table 1. Organic plant extracts and total tannins concentration used in the experiments to inhibit *R. solani* mycelia growth.

Plant species	Solvents	Concentration (PPM)
<i>Larrea tridentata</i> (L)	Water (W)	500, 1000, 1500, 2000, 3000, 6000 y 8000
	Lanolin (L)	500, 1000, 1500, 2000 y 3000
	Cocoa butter (C)	500, 1000, 1500, 2000 y 3000
<i>Fluorensia. cernua</i> (F)	Water (W)	200, 400, 600, 800 y 1000
	Lanolin (L)	200, 400, 600, 800 y1000
	Cocoa butter (C)	500, 1000, 1500, 2000 y 3000
<i>Agave lechuguilla</i> Torr. (A)	Water (W)	500, 1000, 2000, 3000 y 4000
	Lanolin (L)	500, 1000, 2000, 3000 y 4000
	Cocoa butter (C)	500, 1000, 2000, 3000 y 4000
<i>Opuntia sp</i> (O)	Water (W)	500, 1000, 1500, 2000 y 3000
	Lanolin (L)	500, 1000, 1500, 2000 y 3000
	Cocoa butter (C)	500, 1000, 1500, 2000 y 3000
<i>Yucca sp</i> (Y)	Water (W)	500, 1000, 1500, 2000 y 3000
	Lanolin (L)	500, 1000, 1500, 2000 y 3000
	Cocoa butter (C)	500, 1000, 1500, 2000 y 3000

Table 2. Antifungal effect of plant species against *R. solani*.

EXTRACT	Growth inhibition (%)
<i>F. cernua</i>	72.6 a*
<i>L. tridentate</i>	69.8 b
<i>Yucca</i> sp	29.1 c
<i>Opuntia</i> sp	16.4 d
<i>A. lechugilla</i>	14.1 e

* Means followed by the same letter in column are not significant ($P < 0.05$) according to least the significant difference test.

Table 3. Plant extract concentrations (CI₅₀) to inhibit *R. solani* mycelia growth.

Extracts/ Solvents	CI ₅₀ (ppm)	Limits Fiducials 95%
<i>L. trindetata</i> / Water	3.87X10 ³	5.21X10 ³
<i>L. trindetata</i> /lanolin	1.85X10 ²	2.93X10 ²
<i>L. trindetata</i> /Cocoa	5.71X10 ²	6.56X10 ²
<i>F. cernua</i> / Water	4.20X10 ²	6.49X10 ²
<i>F. cernua</i> /lanolin	2.12X10 ²	3.11X10 ²
<i>F. cernua</i> / Cocoa	4.54X10 ²	---*
<i>Opuntia</i> sp/ Water	3.83X10 ³	5.19X10 ³
<i>Opuntia</i> sp /lanolin	2.08X10 ⁴	9.44X10 ⁴
<i>Opuntia</i> sp/ Cocoa	4.9X10 ⁸	---*
<i>A. lechuguilla</i> / Water	NI	---
<i>A. lechuguilla</i> /lanolin	1.70X10 ⁴	2.21X10 ⁵
<i>A. lechuguilla</i> / Cocoa	6.72X10 ³	2.79X10 ⁴
<i>Yucca</i> sp/ Water	5.74X10 ⁴	1.00 X10 ⁷
<i>Yucca</i> sp/lanolin	8.96X10 ³	2.99X10 ⁴
<i>Yucca</i> sp/ Cocoa	8.14X10 ³	1.81X10 ⁴

NI = Not inhibited to doses evaluated and * = Not permitted to identify fiducial limits.

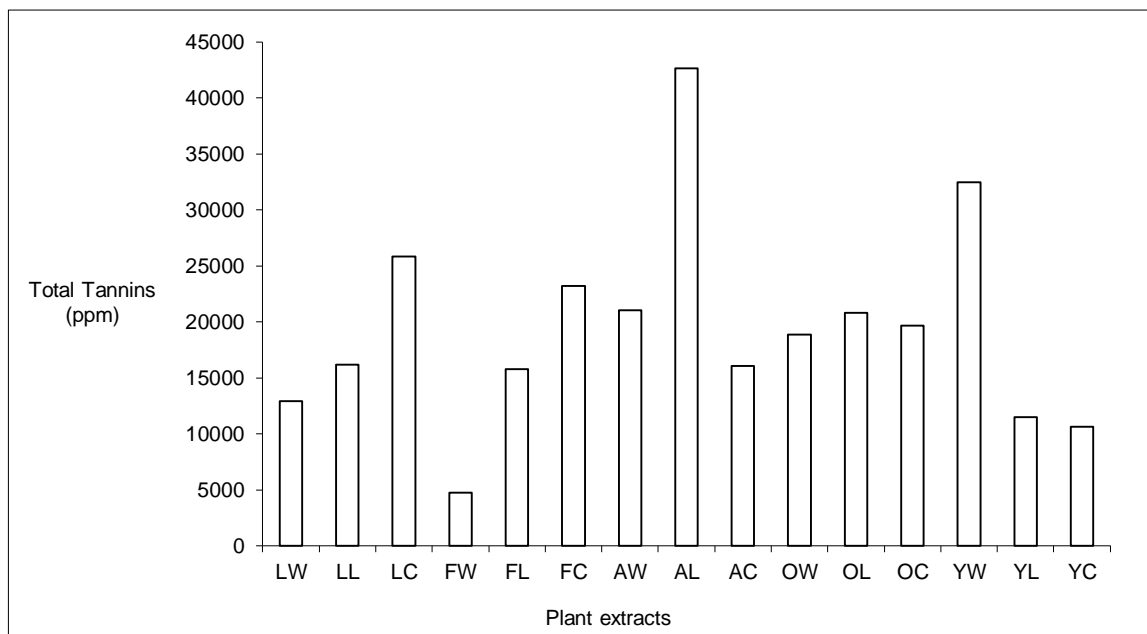


Fig 1. Total tannins content in extracts obtained from *L. tridentata* with water (LW), *L. tridentata* with lanolin (LL), *L. tridentata* with cocoa (LC), *F. cernua* with water (FW), *F. cernua* with lanolin (FL), *F. cernua* with cocoa (FC), *A. lechuguilla* with water (AW), *A. lechuguilla* with lanolin (AL), *A. lechuguilla* with cocoa (AC), *Opuntia* sp. with water (OW), *Opuntia* sp. with lanolin (OL), *Opuntia* sp. with cocoa (OC), *Yucca* sp. with water (YW), *Yucca* sp. with lanolin (YL), and *Yucca* sp. with cocoa (YC).

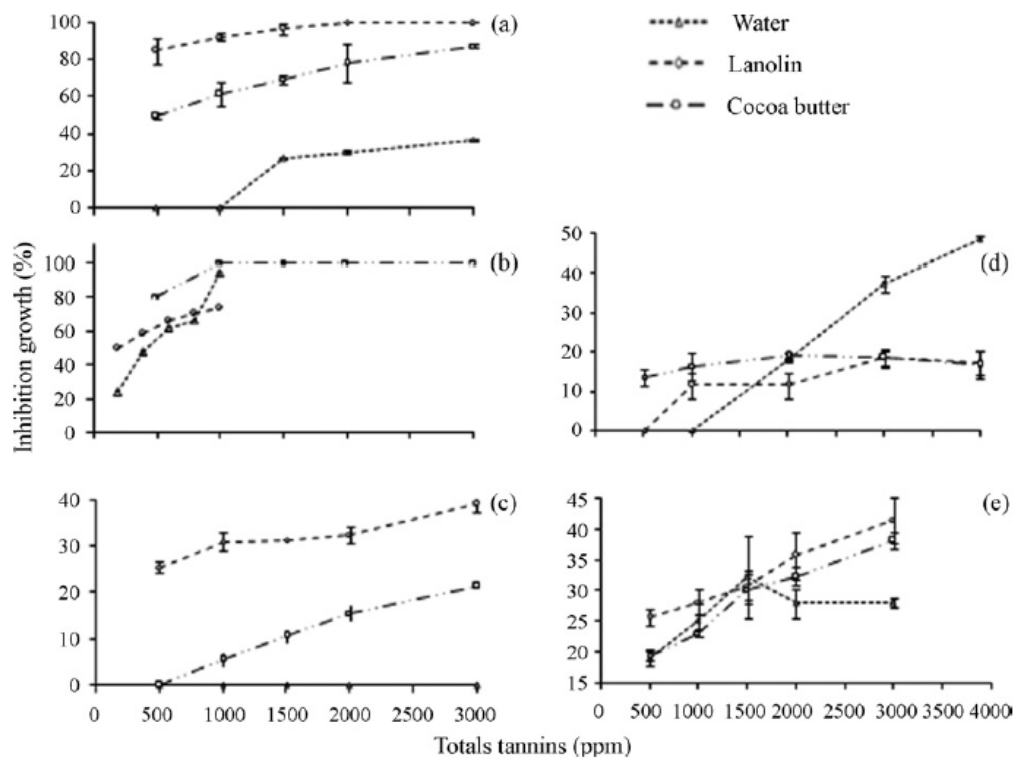


Fig 2. Effect of plant extracts and total tannin concentration on inhibition of *R. solani mycelia* growth. a) *L. tridentata* with water (LW), with lanolin (LL), and with cocoa (LC); b) *F. cernua* with water (FW), with lanolin (FL), and with cocoa (FC); c) *A. lechuguilla* with water (AW), with lanolin (AL), and with cocoa (AC); d) *Opuntia* sp. with water (OW), with lanolin (OL), and with cocoa (OC) and d) *Yucca* sp. with water (YW), with lanolin (YL) and with cocoa (YC).

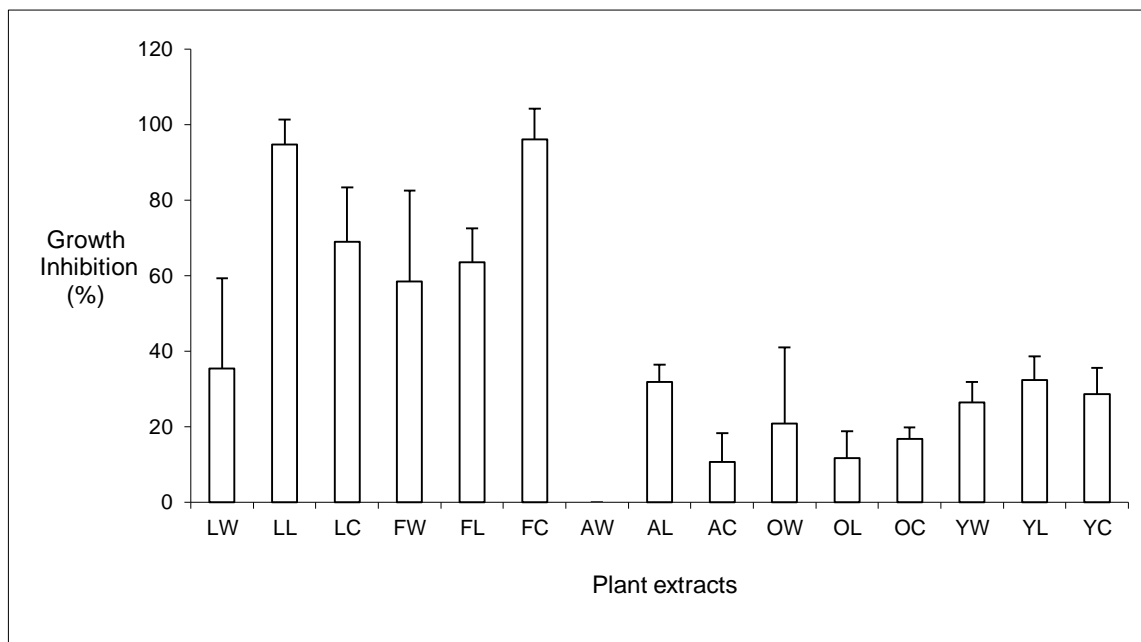


Fig 3. Effect of plant extracts on inhibition of *R. solani mycelia* growth. *L. tridentata* with water (LW), *L. tridentata* with lanolin (LL), *L. tridentata* with cocoa (LC), *F. cernua* with water (FW), *F. cernua* with lanolwith (FL), *F. cernua* with cocoa (FC), *A. lechuguilla* with water (AW), *A. lechuguilla* with lanolin (AL), *A. lechuguilla* with cocoa (AC), *Opuntia* sp. with water (OW), *Opuntia* sp. with lanolin (OL), *Opuntia* sp. with cocoa (OC), *Yucca* sp. with water (YW), *Yucca* sp. with lanolin (YL), and *Yucca* sp. with cocoa (YC).

ARTICULO IV

***Lippia graveolens* and *Carya illinoensis* Organic Extracts and their *in vitro* Effect Against *Rhizoctonia Solani* Kühn**

¹Francisco Daniel Hernández-Castillo, ¹Francisco Castillo-Reyes, ¹Gabriel Gallegos-Morales, ²Raul Rodríguez-Herrera and ²Cristóbal N. Aguilar-González

¹Department of Agricultural Parasitology, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, 25315, Saltillo, Coahuila, Mexico.

²Department of Food Science and Technology, School of Chemistry, Universidad Autónoma de Coahuila, 25280, Saltillo, Coahuila, México

* Corresponding author: Tel: +52 844 411 03 26, fax: +52 844 411 0226. E-mail address:

fdanielhc@hotmail.com. (D. Hernández)

Abstract: Problem statement: Plant extracts with polyphenolic compounds obtained with different solvents have been evaluated against plant pathogens. However, most of these extract have been obtained using solvents no allowed under an organic production context.

Approach: In the present research was to evaluate the inhibitory effect of polyphenolic extracts from *L. graveolens* and *C. illinoensis*, obtained with alternative organic solvents (lanolin and cocoa butter), water and ethanol against *R. solani* in order to determine the inhibitory concentration (IC₅₀) of each extract. **Results:** The results showed that extracts of both *L. graveolens* and *C. illinoensis* obtained with lanolin and ethanol (200 and 3000 ppm of total tannins, respectively) inhibited at 100% growth of *R. solani*. The IC₅₀ for each extract was highly variable, low IC₅₀ values were obtained with *L. graveolens* (4.50×10^1) and *C. illinoensis* (4.33×10^2) extract using lanolin and ethanol respectively. Tannins extraction was strongly dependent on plant specie and in the solvent used. **Conclusion:** The alternative organic solvents lanolin and cocoa butter allowed the recovery of polyphenols compounds with antifungal activity against *R. solani*.

Key words: *Lippia graveolens*, *Carya illinoensis*, Lanolin, Cocoa butter, IC₅₀, *R. solani*, mycelia inhibition

INTRODUCTION

Pesticide applications for control of fungal pathogens, among other effects causes: environmental pollution, affectation to beneficial organisms (Anderson *et. al.*, 2003) and generation of populations of resistant pathogens to chemicals in response to selection pressure due to high dose and continuous applications (Leroux, 2003). Currently seeking alternative for disease control, consider using plant derived compounds in extract form, the potential use of these to control plant pathogens has been shown in laboratory studies (Rodriguez *et. al.*, 1999; Qasem and Abu-Blam, 1996), in greenhouse (Bergeron *et. al.*, 1995; Lomeli and Ochoa, 1999) and at field level (Cruz *et. al.*, 1999). Plants possess a variety of secondary compounds in their tissues such as polyphenols, terpens and alkaloids. Among the polyphenolic polymers are tannins, these compounds have the ability to form complexes with proteins, polysaccharides, nucleic acids, steroids, alkaloids and saponins. Based on their chemical origin, tannins are classified into two main groups: hydrolysable and condensed tannins. The hydrolysable tannins are polymers of phenolic acids (gallic, hexahidroxidifénic acid), while condensed tannins are polymers of flavan-3-ols (Isaza *et. al.*, 2007). Among the plant families with presence of polyphenols are Leguminosae, Rosaceae, Polygonaceae, Fagaceae, Rhyzophoraceae, Myrtaceae and Melastomataceae (Isaza, 2007). In this sense, Mexico has native plants with high content of these compounds (Gamboa *et. al.*, 2003, Lira *et. al.*, 2007, Castillo *et. al.*, 2010), extracts obtained from these plants using methanol, acetone among others solvents, have proven effective antimicrobial activity, however there is a lack of knowledge about to obtaining these phytochemicals with unconventional solvents which can be used as a potential alternative disease management within a system of organic agriculture. In this context, this

study aims determine antifungal *in vitro* effect of *L. graveolens* and *C. illinoensis* extracts obtained with lanolin, cocoa butter, water and ethanol on *R. solani* mycelia inhibition growth.

MATERIALS AND METHODS

Vegetal material: Whole plants (leaves, stems and roots) of Mexican oregano (*L. graveolens*) and pecan husk (*C. illinoensis*) were collected on August and September 2008 in the Southern region of Coahuila State, Mexico. The samples were transported to the Microbiology Laboratory, Department of Food Research, Faculty of Chemical Sciences, Universidad Autonoma de Coahuila, in plastic bags. Dehydration process was performed under environment temperature and in an oven (LABNET International, Inc.) for two days at a temperature of 60°C. Then, dry samples were ground in a mill (Thomas Wiley) and passed through a 1mm screen. The fine and dried powder was stored in amber bottles or plastic bags and at room temperature under darkness.

Extraction of polyphenols: Polyphenolic compounds extraction from each collected sample was done in a proportion of 1:4 (w/v) for infusion method using water and ethanol (70%). Lanolin and cocoa butter extractions were done using emulsions with mineral oil (10%) at 60°C for 7 h. After this, extracts were filtered. The obtained extracts were stored in containers covered with aluminum or amber bottles at 5°C.

Determination of hydrolysable and condensed tannins: The tannin concentrations were determined by spectrophotometry as hydrolysable tannins (Makkar, 1999), as condensed

tannins (Swain and Hillis, 1959) of a sample extract diluted at 1:20 (extract: distilled water). For hydrolysable tannins determination, a reference curve was done by using 400 μL of gallic acid at different concentrations (0, 200, 400, 600, 800, 1000 ppm). Gallic acid concentrations were prepared using distilled water. Each one of the plant extracts was diluted in a test tube and was added 400 μL of commercial Folin-Ciocalteu reagent. Samples were vortexed and left for 5min at room temperature. Then 400 μL of NaCO_3 (0.01M) and 2.5 mL of distilled water were added. Finally absorbance was read at 725 nm.

For condensed tannins determination, 0.5 mL of plant extract was used with 3mL of HCl /butanol (1:9) and 0.1 mL of ferric reagent. The standard was prepared using catechin dissolved in distilled water at different concentrations (0, 200, 400, 600, 800 and 1000 ppm). Samples were heated for 1 h in water bath at 90 °C and absorbance was read at 460 nm.

Effect of the plant extracts on *R. solani* mycelia growth: This work step was carried out in the Laboratory of Microbiology, Agricultural Parasitology Department at Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro, Saltillo Coahuila, Mexico. Tannin concentrations of the tested extracts are shown in Table 1. The poisoned culture medium technique was used to determine the effect of different extracts on inhibition of *R. solani* mycelia growth. In this case, four Petri dishes with one of the different extract concentration were used per treatment. First, the volume required for each extract and concentration was determined. This amount was added to an Erlenmeyer flask with the required water content and PDA medium. Then, flasks were sterilized at 120°C for 15 min.

Discs with fungal mycelia (0.4 cm in diameter) were placed on Petri dishes, which had poisoned culture media. This was done for each different extract and concentration. Petri dishes were incubated at $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. The efficacy of treatments was evaluated measuring fungal radial growth (cm). The percent of mycelia growth inhibition (P) was estimated using as reference the control treatment (Petri dishes only with PDA medium) as follows: $P = (C-T)/C \times 100$, where C is the colony diameter under the control treatment and T is the colony diameter under the extract treatment. The experiment was established under a completely randomized design with four replications. The Probit analysis was made to determine the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of each extract. Data were analyzed using the software SAS V8.1.

RESULTS

Effect of solvents on total polyphenols content extraction: The extraction of polyphenols compounds varied among species according to the solvent used. In addition, it was observed an interaction between plant specie and solvent for total tannins extraction. The highest concentration was obtained from *L. graveolens* with 2.327×10^5 ppm using ethanol, followed by *C. illinoensis* with 1.93×10^5 ppm using cocoa butter. The solvent that yielded the highest tannin concentration was ethanol (1.17×10^5 ppm) and with lanolin was obtained the lowest (2.79×10^3 ppm) total polyphenols content (Fig. 1).

Effect of plant extracts on inhibition of *R. solani* mycelia growth: The effect of different extracts of Mexican oregano and pecan husk obtained using four different solvents on *R. solani* was highly significant at 72 h. Figure 2 shown that as extract increases, the mycelia

growth of *R. solani* is significantly reduced, with exception of the water extract for both Mexican oregano and pecan husk and cocoa butter extract from pecan husk. According to the values of inhibition mean, lanolin and ethanol extracts were statistically ($p \leq 0.01$) more efficient, with an inhibition mean of 69.1 and 63.5 percent respectively, water extract was the least efficient with an inhibition mean of 16.0%.

The greater mycelia inhibition (100%) was observed with *L. graveolens* extract using lanolin as solvent at a concentration of 200 ppm of total tannins, followed by cocoa butter extract with 83% of mycelia inhibition to 3000 ppm, while that with ethanol extracts was obtained a 60% of mycelia inhibition at 3000 ppm, the water extract had little effect on *R. solani* mycelia inhibition (Fig. 2A).

In the case of *C. illinoensis* extracts, the greatest effect was found with ethanolic extracts with doses from 500-3000 ppm of total tannins with a range of mycelia inhibition of 60-100% (Fig. 2B), followed for the lanolin extracts with 62% of *R. solani* mycelia inhibition using 3000 ppm of total tannins and only 23% of mycelia inhibition was observed with water and cocoa butter extracts respectively.

Inhibitory concentrations of plant extracts to 50% (IC₅₀): The IC₅₀ of each extract on fungus growth was highly variable among extracts with the different solvents within each particular species. The lowest IC₅₀ was obtained with *L. graveolens* with 4.50×10^1 ppm with lanolin as solvent and the highest with pecan husk to 2.13×10^3 ppm using lanolin (Table 2).

DISCUSSION

These differences in total tannins production for ethanol, is correlated with the high polarity of ethanol and partition point to extract more polyphenolic compounds. These results are consistent with those reported by Lira *et. al.* (2003) whom mentioned that absolute ethanol extracts less resin from *Larrea tridentata* (SEES and Moc. Ex DC) that its use at lower concentration. In this study, ethanol (70%) yielded higher concentration of polyphenol compounds from *L. graveolens* than the other solvents. There is only a reference about the use of lanolin and cocoa butter in extraction of polyphenolic molecules with antifungal effect, where it was found that the use of cocoa butter and lanolin as solvents allowed higher extraction of polyphenolic compound than water (Castillo *et. al.*, 2010).

This results corroborated the antifungal effect of *L. graveolens* against *R. solani* (Hernandez *et. al.*, 2008) and in contrast with those obtained by Garcia *et. al.* (2006), whom found a fungicidal effect at 1000 ppm of oregano essential oil, although these differences are given by the different genus and specie (*Origanum vulgare*) used, as pointed out by Hernandez *et. al.* (2008). Likewise, there is little information regarding the use of polyphenolic extracts from *C. illinoensis*, Osorio *et. al.* (2009) found high sensitivity of *R. solani* to acetic extracts obtained from *C. illinoensis* nuts shell to 0.20 mg L⁻¹, these results contrast with those obtained in this work to 3000 ppm of tannin required to inhibit in 100% this fungus, these differences could probably be explained by the different plant tissue used and the evaluation conditions, in our case, growth was assessed in a radial way

as opposed to only qualitative presence or absence of growth on plaques of polystyrene employed by Osorio *et. al.* (2009).

The use of lanolin and cocoa butter for the extraction of highly efficient phytochemicals to inhibit fungus growth *in vitro* was reported previously (Castillo *et. al.*, 2010), where they mentioned that efficiency differences for inhibit mycelia growth of extracts with these solvents are given because emulsions are best to extract more and different phytochemicals from plants, the type and concentration of phytochemicals recovered during the extraction process determines the efficiency of inhibitory capacity, due to differences in polarity and partition points of these solvents. Results with extracts using ethanol as solvent agree with those obtained with extracts from *Flourensia cernua* using ethanol and other solvents, where similar concentrations than those evaluated here, which inhibited the mycelia growth of *Alternaria alternata*, *Penicillium digitatum* and *Collectotrichum gloesporoides* from 80-100% respectively (Guerrero *et. al.*, 2007).

The obtained IC₅₀ values are different to those obtained by Hernandez *et. al.* (2008) whom found an IC₅₀ of 10 ug mL⁻¹ although these differences are probably given by the use of essential oil that may have other compounds with antifungal activity, so it is less than the required dose of methyl tolclifos for total inhibition of *R. solani in vitro* (Gamboa *et. al.*, 2003).

CONCLUSION

The use of different alternative organic solvents allowed the obtaining of extracts with antifungal activity against *R. solani*, in specific, the amount of phenolic compounds is a function of solvent and vegetal specie used. The highest activity against *R. solani* was obtained with extracts from *L. graveolens* with lanolin and *C. illenoensis* with ethanol. To the best of our knowledge, this is one of the first reports with nonconventional organic solvents (lanolin and cocoa butter) for extract phytochemicals with antifungal activity from *L. graveolens* and *C. illenoensis* husks. These solvents represent an attractive alternative for development of natural products to control plant pathogen fungi, which may avoid the use of synthetic fungicides.

ACKNOWLEDGEMENT

This investigation was supported by a collaborative funding grant to GBS SA de CV. Project M0005-208-C06 from the National Council of Science and Technology of Mexico. Author F. Castillo thanks to CONACYT for the financial support provided during his Ph. D. Studies.

REFERENCE

- Anderson, B.S., J.W. Hunt, B.M. Phillips, P.A. Nicely and V. Vlaming *et. al.*, 2003. Integrated assessment of the impacts of agricultural drainwater in the Salinas River. *Environ. Pollut.*, 124: 523-532. doi:10.1016/S0269-7491(03)00012-5

- Bergeron, C., A. Marston, E. Hakizamungu and K. Hostettmann, 1995. Antifungal constituents of *Chenopodium procerum*. *Int. J. Pharm.*, 33: 115-119. DOI: 10.3109/13880209509-055209.
- Castillo, F., D. Hernandez, G. Gallegos, M. Mendez, R.A. Rodriguez and N. Aguilar, 2010. *In vitro* antifungal activity of plant extracts obtained with alternative organic solvents against *Rhizoctonia solani* Kühn. *Ind. Crops Prod.*, DOI: 10.1016/j.indcrop.2010.05.013.
- Cruz, O.J., A.S. Montoya, R.F. Estrada and C.J.M. Castro, 1999. Vegetal extracts for viral diseases vector control in squash in Culiacan, Sinaloa. Proceeding XXVI National Congress of The Mexican Phytopathology Society and X Phytopathology latin-American Congress. Guadalajara, Jalisco, México. Abstract 306, Spanish.
- Gamboa, A.R., F.D. Hernández-Castillo, E. Guerrero-Rodriguez and A.Sánchez-Arizpe, 2003. Mycelial inhibition of *Rhizoctonia solani* Kühn and *Phytophthora infestans* Mont (De Bary) with methanolic extracts from *Florenzia cernua* D.C., *Origanum majorana* L. and *Bouvardia ternifolia* (Ca.) Schlecht. *Rev. Mex. Fitopatol.*, 21:13-18. ISSN 0185-3309.61221102
- Garcia, C.E.A., V.M.Y. Quezada, L.J. Moreno and H.G. Sanchez and M.E. Moreno *et. al.*, 2006. Antifungal activity of essential oils of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* blame) and oregano (*Origanum vulgare* L.) and their effect on aflatoxin production in pecan nut [*C. illinoensis* (F.A. Wangenh) K. Koch]. *Rev. Mex. Fitopatol.*, 24: 8-12.
- Guerrero, E.R., S. Solis-Gaona, F.D. Hernandez-Castillo, A. Flores-Olivas and V. Sandoval-López. 2007. Antifungal activity *in vitro* of *Florenzia cernua* D.C. extract on postharvest pathogen: *Alternaria alternata* (Fr:Fr.) Keissl., *Colletotrichum*

- gloesporoides* (Penz.) Penz. and Sacc. and *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr) Sacc. Rev. Mex. Fitopatol., 25: 48-52. ISSN 0185-3309.
- Hernandez, T., M. Canales, A.M. García, A. Duran, S. Meráz, P. Dávila and J.G. Ávila. 2008. Antifungal activity of the essential oils of two verbenaceae: *lantana achyranthifolia* and *lippia graveolens* of zapotitlan de las salinas, puebla (México). Soc. Latinoamer. de Fitoquímica, 7: 203-207. ISSN 0117-7917
- Isaza, M.J.H., 2007. Vegetal tanins or polyphenols. Scientia Et Technica., 8: 13-18. ISSN 0122-1701
- Isaza, M.J.H., C.L.A. Veloza, A.L.S. Ramirez and C.A. Guevara, 2007. Spectrophotometric estimation of hydrolysable and condensed tannins in melastomataceas plants. Sci. Et Técnica., 8: 261-266.
- Leroux, P., 2003. Mode of action of agrochemicals towards plant pathogens. Compt. Rendus Biol., 326: 9-21. doi:10.1016/S1631-0691(03)00005-2
- Lira S.R.H., G.F. Balvantín-García, F.D. Hernández-Castillo, R. Gamboa-Alvarado and D. Jasso de Rodríguez *et. al.*, 2003. Evaluation of resin content and the antifungal effect of *Larrea tridentata* (Sesse and Moc. ex D.C.) Coville extracts from two Mexican desert against *Phytophthora* sp. Pringsh. Rev. Mex. Fitopatol., 21: 97-101.
- Lira, S.R.H., M. Hernández-Suárez, C. Chavéz-Betancurt, F.D. Hernández-Castillo and E. Cuellar-Villareal, 2007. Biopesticides and biological control. CIQA, Monterrey, México. pp: 13-29.
- Lomeli, R.M.G. and R.H.G. Ochoa, 1999. Fungicide evaluation of *Coco nucifera* Linn mesocarp extract. Proceeding XXVI National Congress of The Mexican Phytopathology Society and X Phytopathology latin-American Congress. Guadalajara, Jalisco, México. Abstract 10.

- Makkar, H.P.S., 1999. Quantification of tannins in tree foliage: A laboratory manual for
FAO/IAEA. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture,
Vienna, Austria, pp: 5-7. <http://naweb.iaea.org/nafa/aph/public/pubd31022manual-tannin.pdf>
- Osorio, E., M. Flores, D. Hernandez, J. Ventura and R. Rodriguez *et. al.*, 2009. Biological efficiency of polyphenolic extracts from pecan nuts shell (*Carya Illinoensis*), pomegranate husk (*Punica granatum*) and creosote bush leaves (*Larrea tridentata* Cov.) against plant pathogenic fungi. *Ind. Crops Prod.*, 31:153-157. doi:10.1016/j.indcrop.2009.09.017
- Qasem, J.R. and H.A. Abu-Blan, 1996. Fungicidal activity of some common weed extracts against different plant pathogenic fungi. *J. of Phytopathology*,144:157-161. DOI:10.1111/j.1439-0434.1996.tb01507.x
- Swain, T. and W.E. Hillis, 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica* L. the quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.*, 10: 63-68.
-

Table 1: Plant extract concentrations (ppm) against *Rhizoctonia solani* used in this study

Extract /solvent	Concentration (PPM)
<i>L. graveolens</i> /water	500, 1000, 1500, 2000, 3000
<i>L. graveolens</i> /lanolin	200, 400, 600, 800, 1000
<i>L. graveolens</i> /cocoa butter	500, 1000, 1500, 2000, 3000
<i>L. graveolens</i> /Ethanol	500, 1000, 1500, 2000, 3000
<i>C. illinoensis</i> /water	500, 1000, 1500, 2000, 3000
<i>C. illinoensis</i> /lanolin	200, 400, 600, 800, 1000
<i>C. illinoensis</i> /cocoa butter	500, 1000, 1500, 2000, 3000
<i>C. illinoensis</i> / Ethanol	500, 1000, 1500, 2000, 3000

Table 2: Concentrations IC₅₀ and IC₉₀ (ppm) of the extracts of *Lippia graveolens* and *Carya illinoensis* obtained with different solvents against *Rhizoctonia solani*

Extract	Solvent	IC ₅₀	Fiducial limits		IC ₉₀	Fiducial limits	
			Superior	Inferior		Superior	Inferior
<i>L. graveolens</i>	Ethanol	1.93×10 ³	1.72×10 ³	2.21×10 ³	2.25×10 ⁴	1.45×10 ⁴	4.19×10 ⁴
<i>L. graveolens</i>	Lanolin	i *					
<i>L. graveolens</i>	Cocoa	1.11×10 ³	8.61×10 ²	1.36×10 ³	4.03×10 ³	2.87×10 ³	7.69×10 ³
<i>L. graveolens</i>	Water	0	0	0	0	0	0
<i>C. illinoensis</i>	Ethanol	4.34×10 ²	2.39×10 ²	5.88×10 ²	1.45×10 ³	1.15×10 ³	2.11×10 ³
<i>C. illinoensis</i>	Lanolin	2.14×10 ³	1.69×10 ³	3.10×10 ³	1.25×10 ⁴	6.61×10 ³	5.11×10 ⁴
<i>C. illinoensis</i>	Cocoa	0	0	0	0	0	0
<i>C. illinoensis</i>	Water	0	0	0	0	0	0

i *: = Inhibition at 100% to 200 ppm

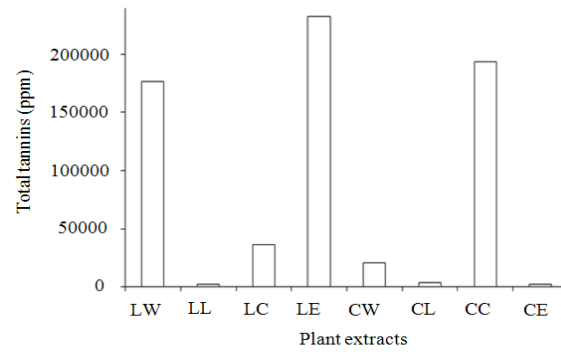
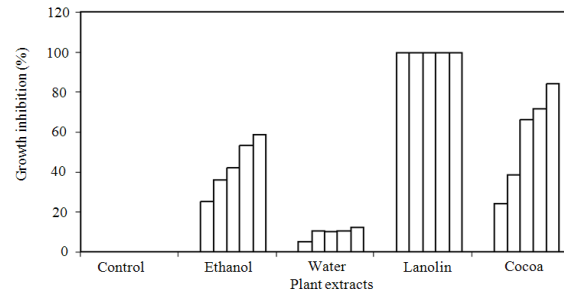
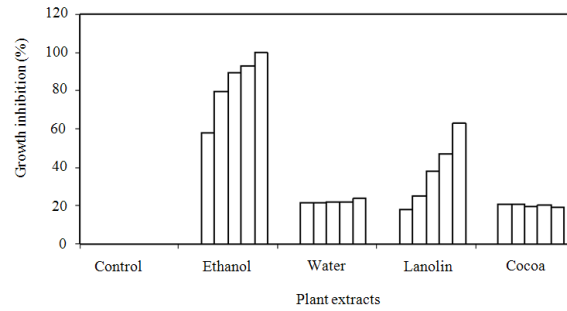


Fig. 1: Concentration of total tannins (hydrolysable tannins and condensed tannins) present in each plant extract of *Lippia graveolens* (LW in water, LL in lanolin, LC in cocoa butter and LE in ethanol) and *Carya illinoensis* (CW in water, CL in lanolin, CC in cocoa butter and CE in ethanol) in ppm (equivalent to gallic acid and catechin).



(a)



(b)

Fig. 2: Percentage of mycelia inhibition of *Rhizoctonia solani* with four plants extracts to five concentrations equivalent total tannins (ppm), A) *Lippia graveolens* extracts and B) *Carya illinoensis* extracts

CONCLUSIONES GENERALES

Todos los aislamientos obtenidos pertenecen a *Rhizoctonia solani* y pertenecen a los grupos de anastomosis a AG3 en 81%, AG11 en 11% y AG1 en 5%.

Todos los aislamientos de *R. solani* mostraron diferentes niveles de resistencia a el fungicida pencycuron.

Todos los aislamientos de *R. solani* mostraron ser susceptibles a el fungicida Tiabendazol.

Los extractos de las especies de *Larrea tridentata*, *Flourensia cernua*, *Agave lechuguilla*, *Lippia graveolens*, *Opuntia ficus-indica* y *Carya illinoensis*, lograron inhibir el crecimiento de cepas de *R. solani* resistentes al pencycuron.

Los extractos y solventes que inhiben en mayor proporción las cepas de *R. solani* resistentes al Pencycuron son *F. cernua*/etanol, *A. lechuguilla*/etanol, *L. tridentata*/etanol, *O. ficus-indica*/etanol y *L. graveolens*/lanolina.

F. cernua y *L. tridentata* muestran mayor eficacia en el control de cepas de *R. solani* resistentes a Pencycuron.

Las mayores extracciones de fitoquímicos se logran con etanol y lanolina.

Las especies antagonistas aisladas de la rizosfera de plantas del semidesierto fue *Bacillus* spp.

Las especies de *Bacillus* aisladas corresponden a *B. subtilis*, *B. pumilus* y *B. atrophaeus*.

Las tres especies de *Bacillus* inhiben el crecimiento micelial de cepas de *R. solani* resistentes al pencycuron.

Literatura citada

- Albert, L. A. 2004. Panorama de los plaguicidas en México. Revista de toxicología en línea: <http://www.sertox.com.Ar/retel/default.htm>, pp 1-17
- Anderson, N. 1982. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. Ann. Rev. Phytopathology. 20: 329-347.
- Ariena, H.C., Van Bruggen and Arneson, P.A. 1984. Resistance in *Rhizoctonia solani* to tolclofos metil. Neth. J. Pl. Path, 90: 95-106.
- Bautista-Baños, S., García, E., Barrera, L., Reyes, N., y Wilson, C. 2003. Seasonal Evaluation of the postharvest fungicidal activity of powders and extracts of huamúchil (*Pithecellobium dulce*): action against *Botrytis cinérea*, *Penicillium digitatum* and *Rhizopus stolonifer* of strawberry fruit. Postharvest Biology and Technology. 29:81-92.
- Beneduzi, A. and Passaglia, L.M.P. 2011. Genetic and Phenotypic Diversity of Plant Growth Promoting Bacilli, en Bacteria in Agrobiología: Plant Growth Responses, Dinesh K. Maheshwari (Ed), Springer-Verlag Berlin Heidelberg. USA. Pp.1-14
- Berge, O., Mavingui, P. and Heulin, T. 2011. Heat Treatment (Exploring Diversity of Cultivable Aerobic Endospore-forming Bacteria: From Pasteurization to Procedures without Heat-Shock Selection, in: Endospore-forming Soil Bacteria, Longan and De Vos (Eds), German, pp. 89-113.
- Bernal, G.; Illanes, A.; Ciampi, L. 2002. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus sp.* with antibiotic activity against plant pathogenic agents. Electronic Journal of Biotechnology No. 5
- Bizzarri, M.F. and Bishop, A.H. 2007. Recovery of *Bacillus thuringiensis* in vegetative form from the phylloplane of clover (*Trifolium hybridum*) during a growing season. J. Invertebr. Pathol. 94:38-47.
- Blazier, S. R. and Conway, K. E.. 2004. Characterization of *Rhizoctonia solani* Isolates Associated with Patch Diseases on Turfgrass Proc. Okla. Acad. Sci. 84: pp 41-51.
- Burpee , L.L., Sander, L.P y Cole, Jr.H. 1978. a staining technique for nuclei of *Rhizoctonia salani* y hongos relacionados. Micologia 70:1281-1283

- Carling, D. 1996. Grouping in *Rhizoctonia solani* by hyphal anastomosis reaction In: Sneh B, Jabaji-Hare S, Neate S, Dijst G (eds) *Rhizoctonia* species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Kluwer Dordrecht, Netherlands. Academic Publishers. 578 p.
- Carling, D. E., and Sumner, D. R. 1992. *Rhizoctonia*. Pages 157-165 in: Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi. L. L. Singleton, J. D. Mihail, and C. M. Rush, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Carling, D. E., Baird, R. E., Gitaitis, R. D., Brainard, K. A., and Kuninaga, S. 2002a. Characterization of AG-13, a newly reported anastomosis group of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 92:893-899.
- Carling, D. E., Kuninaga, S., and Brainard, K. A. 2002b. Hyphal anastomosis reactions, rDNA-internal transcribed spacer sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-2 (AG-2) and AG-BI. *Phytopathology* 92:43-50.
- Carling, D.E., Leiner, R.H., Westphale, P.C., 1989. Symptoms, signs and yield reduction associated with *Rhizoctonia* disease of potato induced by tuber borne inoculum of *Rhizoctonia solani* AG-3. *Am. Potato J.* 6, 639–697.
- Cedeño, L. 2008. Metodo facil y confiable para teñir nucleos en hongos del complejo *Rhizoctonia*. *Bioagro* 20(3):215-219
- Ceresini, P.C., Shew, H.D., Vilgalys, R.J., Rosewich, U.L. and Cubeta, M.A. 2002. Genetic structure of populations of *Rhizoctonia solani* AG-3 on potato in North Carolina. *Mycologia*, 94(3): 450–460.
- Chávez, B.C.; Flores, O.A.; Lira, S.R. 2007. Uso de Rizobacterias para el Control de Enfermedades y Promoción de Crecimiento en Plantas. *Agricultura Sustentable y Fertilizantes*. 143-156 pp.
- Chávez, B.J.R., Hernández, C.F.D., Gallegos, M.G. y Rodríguez, H.R. 2011. Susceptibilidad al Pencycuron, de Grupos de Anastomosis de *Rhizoctonia solani* Kühn Colectados en Ocho Regiones Paperas de México. *Revista Agraria -Nueva Epoca-*. En prensa.
- Cornelia kullnig, Robert L. Mach, Matteo Lorito and Christian P. Kubicek. 2000. enzyme diffusion from *trichoderma atroviride* (5 t. *harzianum* p1) to *rhizoctonia solani* is a prerequisite for triggering of *trichoderma ech42* gene expression before mycoparasitic contact. *Applied and environmental microbiology* 66(5): 2232–2234.
- Cruz, C. R. y Montes, B. R. 1992. Estudio fitoquímico de las plantas antifúngicas y su espectro de acción. *Memorias del XIX Congreso Nacional de Fitopatología*. Saltillo, Coahuila. México. P 209.

- Cruz, C. V. 1993. Estudio químico de los vegetales con acción contra hongos e insectos. Memorias de XX Congreso Nacional de Fitopatología. Zacatecas, Zacatecas. México. P 66.
- Cruz, O.J., Montoya, A.S., Estrada, R.F. y Castro, C.J. M. 1999. Extractos vegetales para el control de vectores de enfermedades virales en calabacita en Culiacán, Sinaloa. Memorias del XXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología y X Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Guadalajara, Jalisco. México. Resumen 306.
- Cubeta, M.A. and Vilgalys, R. 1997. Population Biology of the *Rhizoctonia solani* Complex. *Phytopathology* 87(4): 481-484
- Dequiedt, S., Thioulouse, J., Jolivet, C., Saby, N., Lelievre, M., Maron, P., Martin, M., Prévost, B., Toutain, B., Arrouays, D., Lemanceau, P. y Ranjard, L. 2009. Biogeographical patterns of soil bacterial communities. *Environmental Microbiology Reports* 1(4): 251–255.
- Domínguez, X. A. 1978. Métodos de investigación fitoquímica. Ed. México. 204 pp.
- Dorrance, A. E., Kleinhenz, M. D., McClure, S. A., and Tuttle, N. T. 2003. Temperature, moisture, and seed treatment effects on *Rhizoctonia solani* root rot of soybean. *Plant Dis.* 87:533-538.
- Driks, A. 2004. The *Bacillus* spore coat. *Phytopathology*, 94:1249-1251.
- Eman, A.H.M, Mikiko, A., Ghanem, K.M., Abdel-Fattah, Y.R., Nakagawa, Y. and El-Helow, E.R. 2006. Diversity of *Bacillus* genotypes in soil samples from El-Omayed biosphere reserve in Egypt. *J Cult Collect* 5:78–84
- Foster, S.J. and Popham, D.L. 2002. Structure and synthesis of cell wall, spore cortex teichoic acids, s-layer, and capsules: in *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells, Sonenshein, A. L., Hoch, J. A. and Losick, R. (Ed), American Society for Microbiology, USA. 634 pp. http://books.google.com/books?id=26hYh4sE3hEC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.
- Gallegos, M. G., Cepeda, S. M. y Olayo, P. R. P. 2004. Entomopatógenos, Editorial, trillas, México, pp 9-10.
- García, F.J. 2002. Evaluación *in vitro* de bacterias antagónicas aisladas de la rizosfera de papa contra 13 grupos de anastomosis multinucleados de *Rhizoctonia solani* Kühn. Tesis de Licenciatura. División de Agronomía. Departamento de Parasitología. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y. Y Dinooor, A. 2001. Combining biocontrol agents to reduce de variability of biological control. *Phytopathology* 91: 621-627.

- Guillemaut, C., Edel-Hermann, V., Camporota, P., Alabouvette, C. and C. Steinberg. 2003. Typing of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* by restriction analysis of ribosomal DNA. *Can. J. Microbiol.* 49: 556–568.
- Guillén, C. R., Hernández, C. F. D., Gallegos, M. G., Rodríguez, H. R., Aguilar, G. C. N., Padrón, C. E. 2006. *Bacillus* spp. Como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonina y su efecto en el desarrollo y rendimiento de chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*.23:105-113.
- Haslam, E. 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action, *Journal of Natural Products*, Vol. 59, No. 2, (Febrero, 1996), pp. (205-215), ISSN: 0163-3864
- Hernández, C. F.D., Alonso, C. Z., Cornejo, N. A. y Cepeda, S.M. 1993. Efecto del fungicida flutolanil (MoncutI rn rl control de *Rhizoctonia solani* Kühn en papa. *Revista Agraria* 9(1):
- Hernández, C.F.; Lira, S.R.; Cruz, C.L.; Gallegos, M.G.; Galindo, C.G.; Padrón, C.E.; Hernández, S.M. 2008. Potencial antifúngico de cepas de *Bacillus* spp. y extracto de *Larrea tridentata* contra *Rhizoctonia solani* en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) *PHYTON* 77: 241-252.
- Hernández, C.F.D., Castillo, R.F., Gallegos, M.G., Rodríguez H.R. and C. Aguilar. 2011. Plant extracts from Mexican Native Species: An Alternative for control of plant pathogens, in: IN: *Reseach in Organic Farming*. Edited By: Raumjit Nokkoul, InTech, Croatia. 139-156 pp.
- Hernández, C.F.D., Cepeda, S.M., García, C.J. y Pérez, Ch.A. 2001. Grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* de la región papera de Toluca estado de México y susceptibilidad in vitro a fungicidas de diferente grupo toxicológico. *Agraria uaaan* 17(2): 59-64.
- Hernández, F.D., Carvajal, C. R., Guerrero, E., Sánchez, A., Gallegos, G., Lira, R. H. 2005. Susceptibilidad a fungicidas de grupos de anastomosis del hongo de *Rhizoctonia solani* Kühn colectados en zonas paperas de Chihuahua, México. *Revista Internacional de Botánica Experimental* 259-269 pp.
- Hooker, J.W. 1990. *Compendium of potato disease*. 4ta Ed. Minnesota, USA. American Phytopathological Society, St, Paul 125 p.
- Hu, X. and Mahillon, J. 2011. Life Cycle and Gene Exchange, in: *Endospore-forming Soil Bacteria*, Longan and De Vos (Eds), German
- Hwang, J., and Benson, D. M. 2002. Biocontrol of *Rhizoctonia* stem and root rot of poinsettia with *Burkholderia cepacia* and binucleate *Rhizoctonia*. *Plant Dis.* 86:47-53.

- Jager, G.; Hide, G.; Van Den Boogert, P.; Termorshuizen, A. y Van Baarlen, P. 1996. Pathology and control of soil-borne fungal pathogens of potato. *Pot. Res.* 39: 437-469.
- Kataria, H.R., Hugelshofer, U. and Gisi, U. 1991. Sensitivity of *Rhizoctonia* species to different fungicides. *Plant pathology* 40: 203-211.
- Kataria, H.R., Verma, P. R. and Gisi, U. 1991. Variability in the Sensitivity of *Rhizoctonia solani* Anastomosis Groups to Fungicides. *J. Phytopathology* 133, 121-133.
- Köller, W., H. Scheinpflug. 1987. Fungal resistance to sterol biosynthesis inhibitors: A new challenge. *Plant Dis.* 71(12): 1066-1074.
- Koransky, J.R., Allen, S.D. and Dowell, V.R. 1978. Use of ethanol for selective isolation of spore forming microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 35:762-765
- Lagunas, L.J.; Zavaleta, M.E.; Osada, K.S.; Aranda, O.S.; Luna, R.I.; Vaquera, H.H. 2001. *Bacillus firmus* como agente de control biológico de *Phytophthora capsici* Leo. en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Revista Mexicana de Fitopatología* 19: 57-65.
- Larrea, V.O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 62: 96-100.
- Leung, H., Nelson, R.J. & Leach J.E. 1993. Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. *Advances in Plant Pathology* 10: 157-205.
- Logan, N.A. and Halket, G. 2011. Developments in the Taxonomy of Aerobic, Endospore-forming Bacteria, in: *Endospore-forming Soil Bacteria*, Longan and De Vos (Eds), German, pp. 364.
- López, O. K., Hernández, D.S. y Mayek, P.N. 2005. AFLP fingerprinting of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* Kühn from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:147-151.
- Mandic-Mulec, I and Prosser, J. I. 2011. Diversity of Endospore-forming Bacteria in Soil: Characterization and Driving Mechanisms, in *Endospore-forming Soil Bacteria*, Longan and De Vos (Eds), German, pp. 31-59.
- Martin, S.B., Lucas, L.T. and Campbell, C.L. 1984. Comparative sensitivity of *Rhizoctonia solani* and *Rhizoctonia* like-fungi to selected fungicides in vitro. *Phytopathology*, 74: 170-175.
- Menzies, J. 1970. Introduction: The first century of *Rhizoctonia solani* In: Parmeter, J (ed) *Rhizoctonia solani*, Biology and Pathology, Berkeley, Los Angeles, U.S.A. University of California Press. 255p. Olaya y Abawi (1992)
- Michael, D.R. and Staff, VV. 2000. Plaga y enfermedades de la lechuga. , American Phytopathological Society Ediciones mundi prensa. 79 páginas.

- Montealegre, R.J.; Reyes, R.; Pérez, L.M.; Herrera, R.; Silva, P.; Besoain, X. 2003. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. *Electronic Journal of Biotechnology* 6(2).
- Montes, B. R. 1996. Productos Naturales de Origen Vegetal para el combate de fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 14(1)9-14.
- Montes, B.R., Cruz, C.V., Martínez, M.G., Sandoval, G.G., García, L.R., Zilch, D.S., Bravo, L.L., Bermúdez, T.L. y Flores, M.H.E. 2000. Propiedades antifúngicas en plantas superiores. Análisis retrospectivo de investigaciones. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 18(2)125-131.
- Muñoz, R.C.; Virgen, C.G.; Herrera, E.A.; Olalde, P.V. 2001. Introducción de agentes de control biológico de *Rhizoctonia solani* en suelos solarizados o encalados en condiciones de invernadero. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 59: 10-14.
- Ogoshi, A. 1987. Ecology and Pathogenicity of Anastomosis and Intraespecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25: 125-143.
- Ogoshi, A. 1996. Introducción, The genus *Rhizoctonia* In: Sneha B, Jabaji-Hare S, Neate S, Dijkstra G (eds) *Rhizoctonia* species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Kluwer Dordrecht, Netherlands. Academic Publishers. 578 p.
- Olaya G., Abawi G. S. and Barnard J. 1994. Response of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* to five fungicides and control of pocket rot of table beets with foliar sprays. *Phytopathology*, 78: 1033-1037.
- Paredes, E.J.E.; Carrillo, F.J.A.; García, E.R.S.; Allende, M.R.; Sañudo, B.J.A.; Valdez, T.J.B. 2009. Microorganismos antagonistas para el control del complejo de hongos causantes de la rabia del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el Estado de Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 27: 27-35.
- Parmeter, J. y Whitney, H. 1970. Taxonomy and nomenclature of the imperfect state In: Parmeter, J (ed) *Rhizoctonia solani*, Biology and Pathology., Berkeley, Los Angeles, U.S.A. University of California Press. 255 p.
- Patel, A.K., Ahire, J.J., Pawar, S.P., Chaudhari, B.L. and Chincholkar, S.B. 2009. Comparative accounts of probiotic characteristics of *Bacillus* spp. isolated from food wastes. *Food Res Int* 42:505–510
- Plascencia, R.A. 2008. Biocontrol de *Rhizoctonia solani* en papa con *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis*. Tesis de Licenciatura. Departamento de Parasitología Agrícola. División de Agronomía. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila. México.

- Poromarto, S. H., Nelson, B. D., and Freeman, T. P. 1998. Association of Binucleate *Rhizoctonia* with soybean and mechanism of biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 88:1056-1067.
- Rashid, M. H. Mori M. and Sekiguchi J. 1995. Glucosaminidase of *Bacillus subtilis*: cloning, regulation, primary structure and biochemical characterization. *Microbiology*, 141: 2391-2404.
- Rodríguez, G.R., Ramírez, R.M.T., y Simpson, J. 2004. Capacidad de anastomosis de cepas del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib., agente causal de la antracnosis del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22:37-43.
- Rodríguez, L.V. 2002. Efecto antagónico y biocontrolador de algunos microorganismos saprofitos contra *Rhizoctonia solani* un fitopatógeno causante del (Damping Off) en plantas de tomate. Tesis de Maestría. Unidad de Post-Grado. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- Russell J. tweddell, suha h. jabaji-hare, and pierre m. charest. 1994. production of chitinases and 1,3-glucanases by *stachybotrys elegans*, a mycoparasite of *rhizoctonia solani*. *applied and environmental microbiology* 60 (2): 489-495.
- Sneh B, Burpee L, Ogoshi A 1991 *Identification of Rhizoctonia species*. APS Press, St. Paul, USA.
- Sora, M., E. (1984). Algunas consideraciones nutricionales y químicas de sorgos con diferente contenido de taninos. Tesis M.C.-C.P México.
- Taheri, P., Gnanamanickam, S., and Höfte, M. 2007. Characterization, genetic structure, and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. associated with rice sheath diseases in India. *Phytopathology* 97:373-383.
- Tewoldemedhin, Y. T., Lamprecht, S. C., McLeod, A., and Mazzola, M. 2006. Characterization of *Rhizoctonia* spp. recovered from crop plants used in rotational cropping systems in the Western Cape province of South Africa. *Plant Dis.* 90:1399-1406.
- Travers, R.S., Martin, P.A. and Reichelderfer, C.F. 1987. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. *Appl Environ Microbiol* 53:1263-1266
- Virgen, C. G., Olalde, P. V, and Carling, D. E. 2000, Anastomosis Groups of *Rhizoctonia solani* on Potato in Central Mexico and Potential for Biological and Chemical Control. *Amer J of Potato Res* 77:219-224.
- Zhang, J. X., Xue, A. G., and Tambong, J. T. 2009. Evaluation of seed and soil treatments with novel *Bacillus subtilis* strains for control of soybean root rot caused by *Fusarium oxysporum* and *F. graminearum*. *Plant Dis.* 93:1317-1323.

Parmeter, J. R. 1970. *Rhizoctonia solani*, biology and pathology. Online <http://books.google.com.mx/books?id=KNktsuZMtboC&pg=PA57&dq=parasexualism+in+r+solani&hl=es&sa=X&ei=1psLT6LFFqbC2wWZ6IH4Bw&ved=0CC0Q6AEwAA#v=onepage&q=parasexualism%20in%20r%20solani&f=false>.