

UCLV
Universidad Central
"Marta Abreu" de Las Villas



FCA
Facultad de
Ciencias Agropecuarias

TRABAJO DE DIPLOMA

UCLV
Universidad Central
"Marta Abreu" de Las Villas



FCA
Facultad de
Ciencias Agropecuarias

Departamento: Agronomía

TRABAJO DE DIPLOMA

Cepas de actinomicetos como agentes de biocontrol de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid en frijol común (*Phaseolus vulgaris*, L)

Autor: Juan Pablo Mesa Marcillas

Tutores: Dr.C Alexander Bernal Cabrera

Dr.C Ricardo Medina Marrero

Consultante: MSc. Miriam Díaz Díaz

Santa Clara , junio de 2018
Copyright©UCLV

Este documento es Propiedad Patrimonial de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, y se encuentra depositado en los fondos de la Biblioteca Universitaria “Chiqui Gómez Lubian” subordinada a la Dirección de Información Científico Técnica de la mencionada casa de altos estudios.

Se autoriza su utilización bajo la licencia siguiente:

Atribución- No Comercial- Compartir Igual



Para cualquier información contacte con:

Dirección de Información Científico Técnica. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuaní. Km 5½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP. 54 830

Teléfonos.: +53 01 42281503-1419

Pensamiento

Lo que el mundo necesita son ejemplos de personas capaces de vivir sus sueños y luchar por sus ideas.

Las Valquirias

Dedicatoria

A todas esas personas que me apoyaron y confiaron en todo momento en mí en especial a mi hermano, padres, familia y amigos que son lo mejor que me han sucedido en esta vida.

Agradecimientos

A mis tutores Dr.C Alexander Bernal Cabrera, Dr.C Ricardo Medina Marrero y MSc. Miriam Díaz Díaz un inmenso agradecimiento por su paciencia, colaboración, disposición y apoyo en todo momento.

A Cupull, Marlen, Novisel y al Yía, gracias por la orientación y ayuda brindada; por enseñarme lo necesario para realizar este trabajo; por sus invaluable aportes y oportunos consejos, además de ofrecerme con humildad todos sus conocimientos siempre con buena disposición, amabilidad y cariño.

Le quiero agradecer a mis padres por sus sabios consejos, confianza y apoyo incondicional que me han brindado siempre los quiero mucho siempre estaré en deuda con ustedes.

A mi hermano que me da fuerza para seguir adelante y darle el ejemplo.

Al claustro de profesores de la carrera, de alto grado científico y profesionalidad, que con amor, dedicación y exigencia contribuyeron al logro de esta meta; en especial a Cristóbal, José, Yamisey, Jesús, Edith, Arahis, Ubaldo, Andreu y Tania.

Agradecer a todos mis amigos en especial a Carlos Ernesto, Eliannys y Yandy.

En fin, gracias de nuevo a todos ustedes sin su presencia en mi vida no hubiera llegado a donde estoy les deseo lo mejor de esta vida se lo merecen son personas extraordinarias.

Resumen

Con el objetivo de determinar el efecto de tres cepas de actinomicetos (CB14, EA2 y B8) sobre *Macrophomina phaseolina* en frijol común, se realizó el enfrentamiento *in vitro* de estas cepas contra el hongo fitopatógeno *M. phaseolina* (CCibp-MP2) por el método de cultivo dual, así como se evaluó la compatibilidad *in vitro* entre las cepas de actinomicetos. Finalmente, se determinó el efecto del recubrimiento a las semillas de *Phaseolus vulgaris* cv. Quivicán con cepas de actinomicetos aplicadas de forma individual y combinadas, *T. harzianum* y Celest Top sobre la incidencia y severidad de la enfermedad tizón ceniciento del tallo en condiciones semicontroladas. Los tratamientos se compararon con dos controles (positivo y negativo). Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 8 tratamientos y seis réplicas. Los resultados mostraron que las cepas de actinomicetos empleadas ejercieron un efecto antagónico *in vitro* sobre el hongo fitopatógeno *M. phaseolina*, destacándose la cepa B8 con un porcentaje de inhibición de 82,07 %. De igual forma, se demostró que las combinaciones de las cepas de actinomicetos empleadas no presentaron incompatibilidad alguna entre ellas. En la incidencia del tizón ceniciento del tallo pre emergente, las cepas de actinomicetos B8 y B8+EA2 presentaron los mejores efectos de control; mientras en la post emergencia y severidad de la enfermedad las combinaciones de actinomicetos CB14+EA2 y B8+CB14.

Palabras clave: actinobacterias, control biológico, incidencia, severidad, tizón ceniciento del tallo, tratamiento de la semilla

Índice

1.	Introducción	1
2.	Revisión Bibliográfica	4
2.1	Cultivo del frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	4
2.1.1	Distribución e importancia	4
2.1.2	Características generales	4
2.1.3	Clasificación taxonómica	5
2.1.4	Principales problemáticas agronómicas del cultivo en Cuba	5
2.2	<i>Macrophomina phaseolina</i> (Tassi) Goid. Características generales	6
2.2.1	Sintomatología de la enfermedad tizón ceniciento del tallo	7
2.3	Métodos de lucha	8
2.3.1	Medidas culturales	8
2.3.2	Resistencia genética	8
2.3.3	Lucha química	8
2.4	Microorganismos biocontroladores de hongos fitopatógenos del suelo	9
2.5	Actinomicetos	11
2.5.1	Hábitat e importancia	11
2.5.2	Características generales y clasificación	11
2.5.3	Medios de cultivo para el aislamiento y multiplicación	12
2.5.4	Antagonismo sobre hongos fitopatógenos del suelo	13
3.	Materiales y Métodos	15
3.1	Determinación de la actividad antagónica “ <i>in vitro</i> ” de las cepas de actinomicetos frente <i>M. phaseolina</i>	15
3.2	Evaluación de la compatibilidad entre cepas de actinomicetos	16
3.3	Evaluación del efecto de cepas de actinomicetos en el tratamiento a la semilla sobre la incidencia y severidad de la enfermedad tizón ceniciento del tallo	17
3.3.1	Incidencia del tizón ceniciento del tallo causado por <i>M. phaseolina</i> sobre semillas de frijol común tratadas con	19

	actinomicetos	
3.3.2	Severidad del tizón ceniciento del tallo causado por <i>M. phaseolina</i> sobre semillas de frijol común tratadas con actinomicetos	20
4.	Resultados y discusión	22
4.1	Determinación de la actividad antagónica “ <i>in vitro</i> ” de las cepas de actinomicetos frente <i>M. phaseolina</i>	22
4.2	Evaluación de la compatibilidad entre cepas de actinomicetos	26
4.3	Evaluación del efecto de cepas de actinomicetos en el tratamiento a la semilla sobre la incidencia y severidad de la enfermedad tizón ceniciento del tallo	27
4.3.1	Incidencia del tizón ceniciento del tallo causado por <i>M. phaseolina</i> sobre semillas de frijol común tratadas con actinomicetos	27
4.3.2	Severidad del tizón ceniciento del tallo causado por <i>M. phaseolina</i> sobre semillas de frijol común tratadas con actinomicetos	32
5.	Conclusiones	37
6.	Recomendaciones	38
7.	Referencias bibliográficas	
	Anexos	

1. Introducción

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la especie más conocida del género *Phaseolus* en la familia Fabaceae. Es una especie anual nativa de Mesoamérica y Suramérica, y sus numerosos cultivares se cultivan en todo el mundo para el consumo, tanto de sus legumbres verdes como de sus semillas frescas o secas (de Ron *et al.*, 2016; Rejane *et al.*, 2018)

En Cuba es uno de los principales rubros de la economía campesina en varias regiones, de mucha importancia como generador de ingresos y empleo rural y como producto básico en la dieta alimenticia de la población por su alto contenido de proteínas y de elementos minerales esenciales. A su cultivo se dedican más de 120 000 pequeños productores, con una producción de 99 200 t al año, que no son suficientes para abastecer el consumo interno, por eso se ha hecho necesario la importación de más 130 000 t de este alimento (ONEI, 2014).

En muchos lugares donde se cultiva el frijol común, las enfermedades son el factor más importante en la reducción del rendimiento agrícola. Entre los microorganismos causantes de enfermedades se encuentran los hongos del suelo, existiendo en nuestro país, de clima subtropical, condiciones favorables para el desarrollo y proliferación de una vasta y heterogénea microbiota del suelo. Se destacan entre las especies más importantes *Rhizoctonia solani* Kühn, *Sclerotium rolfsii* Sacc, *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. y *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) (de Bary), las que pueden ocasionar pérdidas en el rendimiento agrícola de hasta un 90 % en América Latina (CIAT, 1988), y entre 25 y 50 % en Cuba (González, 1988).

M. phaseolina es agente causal del tizón ceniciento del tallo que ocasiona la muerte de plántulas de frijol común pre y post-emergencia, reduce el vigor de las plantas adultas, así como el rendimiento agrícola (Mayek *et al.*, 1997). Los síntomas típicos causados por el patógeno en frijol incluyen la aparición de lesiones oscuras e irregulares en los cotiledones, marchitez, clorosis sistémica, defoliación prematura, madurez temprana o muerte en plantas adultas y epinastia

(Olaya y Abawi, 1996). Las infecciones tardías causan la aparición de áreas grises en los tallos, donde se producen los microesclerocios y picnidios del hongo (Abawi y Pastor, 1990).

El interés por el control biológico de los organismos patógenos de plantas ha aumentado considerablemente con el transcurso de los años debido al uso excesivo de plaguicidas, peligrosos para la salud y el medio ambiente, además de elevar los costos de producción y precios de los alimentos (Franco- Correa, 2009).

Numerosos estudios demuestran la importancia de los actinomicetos; específicamente las especies del género *Streptomyces* (Goodfellow y Williams, 1983) citado por El-Tarabil y Sivasithampara (2006), por la capacidad de producir enzimas biodegradativas como quitinasas, glucanasas, peroxidasas y otras, involucradas en la actividad micoparasítica contra varios agentes fitopatógenos (Márquez *et al.*, 2003). El género *Streptomyces* ha sido descrito como: colonizador de la rizósfera, capaz de ejercer biocontrol sobre hongos fitopatógenos, producir sideróforos, sustancias promotoras del crecimiento vegetal *in vitro*, promover la nodulación y ayudar a los bacteriodes de *Rhizobium* a la asimilación del hierro, en la fijación de nitrógeno en leguminosas, lo cual contribuye indirectamente a la promoción del crecimiento vegetal (ToKala *et al.*, 2002).

Una ventaja de los microorganismos biocontroladores es que protegen a la planta de los agentes patógenos. Por tanto, es necesario desarrollar una agricultura orgánica sostenible usando recursos naturales nativos para disminuir paulatinamente el uso de agroquímicos.

Problema

Las afectaciones causadas por *M. phaseolina* sobre el rendimiento agrícola en el cultivo del frijol común, indican la necesidad del empleo de nuevas alternativas biológicas, como los actinomicetos.

Hipótesis

La determinación de cepas de actinomicetos compatibles y con acción antagonista sobre *Macrophomina phaseolina*, permitirá su uso como agente de biocontrol en el cultivo del frijol común.

Objetivo general

Determinar cepas de actinomicetos como agentes de biocontrol sobre *Macrophomina phaseolina* en el frijol común.

Objetivos específicos

1. Determinar la acción antagónica *in vitro* de cepas de actinomicetos sobre *Macrophomina phaseolina*.
2. Evaluar la compatibilidad *in vitro* entre cepas de actinomicetos.
3. Evaluar el efecto de cepas de actinomicetos en el tratamiento de la semilla de frijol común sobre la incidencia y severidad de la enfermedad por *M. phaseolina*.

2. Revisión bibliográfica

2.1 Cultivo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

2.1.1 Distribución e importancia

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa comestible más importante en el mundo, cultivada en muchos países, en especial América Latina y África; siendo este una fuente importante de calorías, proteínas, fibra dietética, minerales y vitaminas para la alimentación humana (Argaw y Akuma, 2015).

La producción mundial de frijol común creció a una tasa promedio anual de 1.6 % entre 2003 y 2014, para ubicarse en 25.1 millones de toneladas. Esta tendencia se deriva de un crecimiento promedio anual de 0.5 % en la superficie cosechada y de 1 % en el rendimiento promedio. En siete países se concentró el 63 % de la producción mundial de frijol común en el 2014: India (16.4 %), Myanmar (14.9 %), Brasil (13.1 por ciento), Estados Unidos (5.3 %), México (5.1 %), China (4.1 %) y Tanzania (4.1 %) (FIRA, 2016)

2.1.2 Características generales

El género *Phaseolus* se clasifica dentro de la familia Fabaceae. Se cultiva en zonas tropicales y regiones templadas. La intolerancia a las bajas temperaturas la agrupa en las denominadas especies termófilas (Arias *et al.*, 2007).

El frijol común es una planta dicotiledónea de consistencia herbácea, ciclo biológico corto, carácter anual y tamaño y hábitos variables, ya que hay tanto variedades de crecimiento determinado como indeterminado (arbusto pequeño y trepadoras) (Socorro *et al.*, 1989). Las flores son vistosas, hermafroditas, por lo general zigomorfas (UNEX, 2005). El fruto generalmente es seco y dehiscente (legumbre). Las semillas presentan un hilum especializado y complejo, pueden tener varias formas y ser de un solo color o poseer varios colores (UNEX, 2005). El sistema radical está compuesto por una raíz principal, un gran número de raíces secundarias y raicillas. Al germinar, es de crecimiento rápido. Este cultivo posee la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico por la simbiosis con la bacteria del género *Rhizobium* a partir de la formación de nódulos en sus raíces (Quintero, 2002).

2.1.3 Clasificación taxonómica

Según Cronquist citado por Franco *et al.* (2004) su ubicación taxonómica es:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Género: Phaseolus

Especie: *Phaseolus vulgaris* L.

2.1.4 Principales problemáticas agronómicas del cultivo en Cuba

La producción de frijol común es afectada por muchos factores agronómicos como son la fertilidad del suelo, suelos con inadecuadas condiciones físicas, la presencia de plagas y enfermedades, deficiente calidad de la semilla y su conservación, condiciones climáticas adversas. En Cuba, el descenso de los rendimientos de este grano se origina fundamentalmente por el déficit nutricional así como por la incidencia de plagas y enfermedades (MINAG, 2003).

Las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos del suelo son de gran importancia en este cultivo sobre todo en regiones cálidas (Mora, 1996).

De acuerdo con la Dirección Nacional de Sanidad Vegetal, las enfermedades que más afectan al cultivo del frijol común en Cuba son las de origen viral y las fúngicas (Roya, causada por *Uromyces phaseoli* y las pudriciones radiculares causadas por *R. solani*, *S. rolfsii* y *M. phaseolina*) la cuales causan daños severos (Lastres y Soza, 2009).

Los hongos fitopatógenos del suelo constituyen un grupo de microorganismos que por su hábitat y sus relaciones ecológicas con otros grupos, requieren métodos particulares tanto para su estudio, como para su combate, si se les compara con los productores de enfermedades foliares y de almacén (Herrera y Camara, 1988). Las formas de propagación, de infección y de supervivencia son igualmente distintas a las de los hongos patógenos aéreos, destacándose además que las

partes de las plantas que atacan se circunscriben a la porción subterránea de estas (raíces, bulbos, tubérculos y base del tallo), aunque pueden afectar partes aéreas que incluyen hasta los frutos (Tello, 1984). Estos hongos constituyen un grupo de organismos patógenos para los cuales no existen medios eficientes de control.

2.2 *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Características generales

Este hongo fitopatógeno es considerado un serio problema en el sur de los Estados Unidos, el Caribe, América Central y Suramérica, provocando grandes pérdidas en diferentes cultivos, entre los que se destaca el frijol común (Hall, 1991). *M. phaseolina* pertenece a la Familia Botryosphaeriaceae, Orden Botryosphaerales, Subclase Incertae sedis, Clase Dothideomycetes, División Ascomycota, Reino Fungi (Index-Fungorum, 2008).

Es un hongo fitopatógeno del suelo que infecta a más de 500 especies de plantas y tiene una amplia distribución geográfica (Cardona, 2006); es muy variable, con aislados que difieren en el diámetro de los microesclerocios así como en la presencia o ausencia de picnidios. Los microesclerocios se mantienen en la tierra y en los desechos de las plantas infectadas y sirven como fuente primaria de inóculo. Se ha encontrado que pueden persistir dentro del suelo al menos tres años (Dhingra y Sinclair, 1977). La penetración al tejido se produce directamente y lo invade extra e intracelularmente; este hongo produce enzimas pectinolíticas y toxinas de importancia para la patogénesis (Mayek *et al.*, 2001).

En semilleros produce damping off pre y post-emergente con una reducción del vigor de las plantas (Mayek *et al.*, 2004). El hongo causa clorosis, defoliación prematura, maduración temprana, acaparamiento y muerte de la planta (Roy *et al.*, 2008; Suryawanshi *et al.*, 2015). Los cotiledones de las semillas portadoras de la enfermedad aparecen manchados de color pardo oscuro a pardo violáceo y en las hojas y tallos de las plantas adultas se puede observar necrosis acompañada de las fructificaciones del hongo. La presencia de *M. phaseolina* en las semillas es la causa de la descalificación de las legumbres como material de propagación (MINAG, 2007).

2.2.1 Sintomatología de la enfermedad tizón ceniciento del tallo

La enfermedad puede presentarse en cualquier estado de desarrollo de la planta (Díaz, 1985). En el caso del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), la pudrición carbonosa ataca particularmente en condiciones de sequía y de altas temperaturas durante ciertas etapas del crecimiento del cultivo, en regiones áridas (Díaz, 1992; Mayek *et al* 1997), aunque también se ha observado en regiones tropicales.

M. phaseolina ocasiona la muerte de plántulas de frijol en pre- y post-emergencia, reduce el vigor de las plantas adultas, así como el rendimiento de la semilla (Mayek *et al.*, 1997). Los síntomas típicos causados por el hongo fitopatógeno en el frijol común incluyen la aparición de lesiones oscuras e irregulares en los cotiledones, marchitez, clorosis sistémica, defoliación prematura, madurez temprana o muerte en plantas adultas y epinastia (Olaya y Abawi, 1996). Las infecciones tardías causan la aparición de áreas grises en los tallos, donde se producen los microesclerocios y picnidios del hongo (Abawi y Pastor, 1990).

Las estructuras infectivas de *M. phaseolina* germinan y luego infectan los tallos de las plántulas cerca de la superficie del suelo, en la base de los cotiledones en desarrollo y penetran a través de la raíz. El hongo produce chancros negros con un margen bien definido y a menudo presentan anillos concéntricos. Se observa una pudrición carbonosa dentro del tallo. El hongo afecta los hipocótilos y produce manchas oscuras hundidas tan pronto como los mismos emergen del suelo. Los cotiledones de las semillas portadoras de la enfermedad aparecen manchados de color pardo oscuro o pardo violáceo y en las hojas y tallos de la planta adulta se pueden observar necrosis acompañadas de las fructificaciones del hongo (Netzahualcoyotl *et al.*, 2004).

Cuando las plantas jóvenes son afectadas, estas suelen morir o parte de las ramas mueren y si son capaces de resistir las lesiones pueden seguir creciendo, una vez adultas son resistentes, con el peligro de la afectación de las vainas y los granos (de la Garza y Díaz, 1989).

La patogenicidad en frijol común origina síntomas típicos de la enfermedad, las plántulas recién emergidas presentan lesiones oscuras en el hipocotilo que se extienden y estrangulan la base de los cotiledones. Las plántulas presentan una lesión café-rojiza en el hipocotilo que avanza hasta estrangularla. Las infecciones pueden provenir de semillas infectadas (Pupo y Heredia, 1998).

2.3 Métodos de lucha

Para el control de dicha enfermedad se utilizan diferentes métodos de lucha como son las medidas culturales, la resistencia genética, la lucha química, la utilización de controles biológicos, entre otros.

2.3.1 Medidas culturales

Existen grandes posibilidades en la lucha contra la enfermedad mediante el empleo de técnicas de cultivo apropiadas como son las siembras a profundidades adecuadas. Profundidades de más de 2 cm no son recomendadas a fin de evitar las infecciones que se producen por el mantenimiento del hongo en los suelos, dada las características polífagas del mismo.

2.3.2 Resistencia genética

Existen posibilidades de la utilización de variedades de frijoles más resistentes correlacionadas con un mayor contenido de antocianinas en sus hipocótolitos (parte vulnerable al patógeno). Existe una mayor resistencia de los frijoles del tipo negro, en comparación con los de color rojo o blanco. Durante los últimos 45 años se ha venido demostrando y comprobándose por distintos investigadores la relación existente entre la resistencia a patógenos de gran número de cultivos y su contenido de polifenoles o productos de oxidación (Viteri y Linares, 2017).

2.3.3 Lucha química

La lucha química ha sido un tópico tocado por diferentes autores, pero no resulta del todo efectiva a causa del difícil acceso de los distintos productos protectores de las semillas. Bouhot (1967) demostró que la instalación de *M. phaseolina* en las vainas no favorece la formación de aflotoxinas en la semilla ya que el hongo es un patógeno de esta. Wedgworth (1928) estableció que las posturas podían ser

protegidas contra la *Rhizoctonia* y *Macrophomina* si se tratan primeramente las semillas con compuestos mercuriales.

Peterson y Edgington (1971) demostraron que el Benomil, otro producto sistémico, se descomponía rápidamente en soluciones acuosas y dentro de las plantas de frijol común en otros sistémicos, abriendo así grandes posibilidades de control contra las enfermedades fúngicas.

Ellis *et al* (1976) emplearon los fungicidas Captan, Thiram y Benomil a una dosis de 50, 70 y 100 mg/40g de semilla respectivamente para tratar un lote de semillas de frijol de mala calidad y comprobaron la penetración del fungicida sistémico Benomyl, el cual fue efectivo contra todos los hongos que infectaban el embrión de la semilla. Igualmente, Peterson y Edgington (1971) estudiaron el transporte del fungicida sistémico Benomil dentro de diferentes partes de la planta de frijol. Plantas que ya tenían las vainas mostraron que el fungicida fue primeramente transportado al follaje, el fruto del frijol acumuló mucha más cantidad de fungicida en relación con el follaje.

2.4 Microorganismos biocontroladores de hongos del suelo

Entre los microorganismos más empleados en el control biológico de hongos fitopatógenos del suelo se destaca el género *Trichoderma* Pers, el cual ha sido investigado por diferentes autores en Cuba (Stefanova, 2006; Folgueras, 2010; Reyes, 2011). Otros microorganismos han sido reportados como antagonistas de hongos del suelo, entre los que se encuentran *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) como antagonista de *S. rolfsii* (Kimm *et al.*, 1997); *Pseudomonas fluorescens* (Trevisan) Migula como antagonista de *R. solani*, *S. rolfsii* y *M. phaseolina*; *Pseudomonas cepacia* (Palleroni y Holmes) Yabuuchi y *Bacillus cereus* como antagonistas de *R. solani* (Echávez y Gómez, 1997) y *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli* como antagonista de *R. solani* (Mora, 1996).

Pseudomonas aeruginosa (Migula) según Hernández (2005) tiene la capacidad de ser antagonista de varios patógenos asociados a las raíces de las plantas, además de producir sideróforos, antibiosis e inducción de resistencia a la planta. Fue demostrado por Hernández (2007) que el uso de cepas de *Pseudomonas*

aeruginosa (7NSK2) y *Burkholderia cepacia* (556) inhibieron el crecimiento radial de los aislados de *M. phaseolina*.

El Gluticid (fungicida biológico compuesto por los metabolitos de *P. aeruginosa*) se ha empleado también en el control de enfermedades foliares y del suelo reduciendo las afectaciones por *Alternaria solani* Sor., *Uromyces phaseoli* Arth., *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. y Curt.) Rostow. y *Mycosphaerella fijiensis* Deigh (Stefanova et al., 2001).

Bocourt et al. (2009) en una prospección realizada en un suelo ferralítico rojo sembrado con *Nicotiana tabacum* L., *Arachis hypogea* L. y *Sorghum bicolor* (L.) Moench., encontraron nueve especies de hongos con potencialidades para el control biológico, entre las que citan a: *Aspergillus candidus* Link. antagonista de *Sclerotium cepivorum* Berk. y *M. phaseolina*; *Clonostachys rosa* (Link) Schoers, Samuel, Seyfery WW. Gams. antagonista de *R. solani* y *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., y *Paecilomyces lilacinus* (Thorne) Samsan, biocontrolador de *M. phaseolina* y *S. cepivorum*. Por otra parte, Cuervo et al. (1998) destacan que las micorrizas vesicoarbusculares (MVA) *Glomus fasciculatum* (Thaxt.) Gerd. & Trappe y *G. mosseau*, solas o en combinación, disminuyeron el ataque de *R. solani* y *Fusarium oxysporum* E.F. Sm. & Swingle. El control biológico de enfermedades en plantas es utilizado como una alternativa en aquellos casos de patógenos en los cuales se dificulta la aplicación de otros métodos de combate, especialmente el uso de productos químicos. Varios ejemplos de patógenos como *S. rolfii* Sacc, *R. solani* y *Pythium spp.* han sido controlados biológicamente utilizando bacterias antagonistas (Szczecz y Shoda, 2004).

En la última década han aumentado los estudios de bacterias del género *Streptomyces* que son capaces de inhibir el crecimiento micelial *in vitro* de *M. phaseolina* y reducir significativamente la incidencia del tizón ceniciento del tallo en diferentes cultivos (Gopalakrishnan et al., 2011; Yadav et al., 2013).

2.5 Actinomicetos

2.5.1 Hábitat e importancia

Los actinomicetos representan un grupo de microorganismos ampliamente distribuido en ecosistemas naturales (Ghanem *et al.*, 2000; Franco, 2009). En un principio los actinomicetos se incluyeron entre los hongos porque su morfología y desarrollo presentaban gran similitud con éstos, dotados de un micelio verdadero; debido a esto se les denominó “hongos radiados”. Sin embargo, hoy en día, dado su carácter procariótico, se sustenta muy bien su clasificación como bacterias (Koneman, 2001; Prescott, 2002; Franco, 2009).

Estos microorganismos resultan ser abundantes en suelos, tanto o más que las mixobacterias (Ben-Omar *et al.*, 1997); sin embargo, también se encuentran en ambientes acuáticos, dulces y marinos (Leiva *et al.*, 2004). Dentro de sus características presentan un olor típico a suelo húmedo por la producción de un metabolito llamado geosmina; presentan una actividad metabólica alta, producen terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares (Ezziyyani *et al.*, 2004). Como la gran mayoría de las bacterias que son abundantes en el suelo, presentan un importante papel ecológico (Franco, 2009). Por lo general se aíslan de la superficie del suelo y en profundidades entre 2,0 y 15,0 cm. El tamaño de la comunidad depende del tipo de suelo (Tate, 2000).

Los actinomicetos son microorganismos productores de metabolitos secundarios por excelencia. Hasta el presente, se conocen más 10 000 compuestos bioactivos producidos por estos microorganismos, fundamentalmente a partir del género *Streptomyces*, los cuales producen más de 7 600 antibióticos, muchos de los cuales han encontrado aplicación en la medicina humana, veterinaria y la agricultura (Berdy, 2005).

2.5.2 Características y clasificación

Los actinomicetos constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos, son bacterias Gram positivas que se caracterizan por su capacidad de formar filamentos ramificados. El orden de los *Actinomycetales* comprende 63 géneros

constituyendo, aproximadamente del 20-60 % de la población microbiana del suelo (Ezziyyani *et al.*, 2004). Estos se encuentran incluidos en el Dominio Bacteria debido a varias razones: la pared celular está compuesta por peptidoglicano, el diámetro de sus hifas es inferior al de los hongos (0,5 a 2,0 μm), son sensibles a los antimicrobianos pero presentan resistencia a los antifúngicos y la disposición de su material genético es típicamente procariótico (Sylvia, 2005); aunque se caracterizan por presentar un alto contenido de guanina y citosina en su ADN, encontrándose en el rango de 51 a 78% G+C. Estas bacterias son aerobias y algunas anaerobias, pudiéndose encontrar en animales o en el hombre; son heterótrofas, por lo cual pueden utilizar fuentes de carbono simples, complejas y compuestos moleculares orgánicos tales como ácidos, azúcares, polisacáridos, lípidos, proteínas e hidrocarburos alifáticos. Utilizan como fuentes de nitrógeno, amonio, nitratos, aminoácidos, peptonas y un gran número de proteínas (Leveau y Bouix, 2000). Frecuentemente, alcanzan grandes densidades poblacionales en suelos con alto contenido de materia orgánica y amplias reservas de carbono asimilable y humus (Fernandez, 1988).

Los principales géneros que se aíslan a partir de suelos son *Nocardia*, *Streptomyces* y *Micromonospora*, que pueden estar presentes como conidios o como hifas vegetativas (Martin, 1980). Sin embargo, los métodos de aislamiento convencionales muestran que el 95 % de los actinomicetos aislados a partir de suelo pertenecen al género *Streptomyces* (Lacey, 1973). Algunos de estos organismos no han sido identificados específicamente, y la posición filogenética de algunos subgrupos muestra que su divergencia corresponde con la de los géneros tradicionales de actinomicetos (Rheims *et al.*, 1999). Algunos géneros han sido reportados como fijadores de nitrógeno atmosférico, como *Frankia* y algunas cepas de las familias *Thermomonosporaceae* y *Micromonosporaceae* (Valdes *et al.*, 2005; Franco-Correa, 2008).

2.5.3 Medios de cultivo utilizados para el aislamiento y multiplicación

La mayoría de los actinomicetos crecen en medios como agar nutritivo, agar tripticasa soja, agar sangre o agar infusión cerebro corazón. Sin embargo, para la

diferenciación y el desarrollo de esporas y/o pigmentos se necesita de medios suplementados con quitina coloidal, extracto de suelo, avena, almidón con sales inorgánicas, agar agua con determinados polisacáridos como fuente de carbono, extracto de levadura o peptona (Bergey y Holt, 2000).

El crecimiento de las colonias de actinomicetos en medio sólido se puede ver a los tres ó cuatros días de incubación pero el desarrollo de micelio aéreo maduro con esporas puede tardar entre siete y catorce días en desarrollarse y en algunas cepas de crecimiento lento hasta más de un mes de incubación.

2.5.4 Antagonismo sobre hongos del suelo

Los actinomicetos se caracterizan por producir enzimas con actividad antimicrobiana, aspecto que ha sido evaluado en relación al biocontrol de fitopatógenos (Park *et al.*, 2002). Entre las enzimas hidrolíticas, las quitinasas son de suma importancia teniendo en cuenta que la quitina es el mayor constituyente de la pared celular en la mayoría de los hongos fitopatógenos. Las quitinasas inhiben la germinación de las esporas fúngicas y la elongación del tubo germinal y lisan los tipos hifales (Kishore *et al.*, 2005).

EL suelo representa una fuente óptima para el aislamiento de microorganismos con actividad antagónica, los cuales pueden ser empleados como agentes de control. Entre los mecanismos de acción que utilizan los microorganismos antagonistas para el control biológico se encuentran: antibiosis, competencia, parasitismo, lisis celular y resistencia inducida en el hospedante. Diversos investigadores citan a las quitinasas, glucanasas y proteasas como enzimas involucradas en el control biológico de fitopatógenos (Aceves *et al.*, 2005).

Los actinomicetos producen una amplia variedad de hidrolasas extracelulares, importantes en la descomposición de la materia orgánica en el suelo; estos parecen tener importancia entre la biota microbiana de la rizósfera (Valois *et al.*, 1996). El antagonismo de los actinomicetos contra hongos ha sido demostrado para una amplia variedad de patógenos de plantas, tales como *Alternaria*, *Rhizoctonia*, *Verticillum*, *Fusarium* y *Macrophomina* sp. Por ejemplo, la cepa 5406

de *Streptomyces* sp. ha sido usada en China por más de 30 años para proteger los cultivos de algodón de patógenos del suelo (Valois *et al.*, 1996). Adicionalmente, Lahdenpera *et al.* (1991) desarrollaron un biofungicida que contiene células de *Streptomyces griseoviridis* Anderson (L.E.), Ehrlich (J.), Sun (S.H.) & Burkholder (P.R.) para proteger los cultivos contra infecciones de *Fusarium* y *Alternaria*. Por otro lado, *Streptomyces siوياensis* Nishimura exhibe antagonismo contra varios hongos patógenos como *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitz., *Colletotrichum higginsianum* Sacc., *Acremonium lactucum* y *Fusarium oxysporum* Schlecht. emend. Snyder & Hansen (Hong *et al.*, 2002).

3. Materiales y métodos

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Microbiología del Centro de Bioactivos Químicos, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba; durante el período comprendido entre octubre de 2017 y mayo de 2018.

Cepas de actinomicetos

Se emplearon tres cepas de actinomicetos pertenecientes a la colección de cultivos microbianos del propio Centro, seleccionadas a partir de su actividad antagonista “*in vitro*” frente a cuatro hongos fitopatógenos que afectan el frijol común (García, 2014) (Tabla1).

Tabla 1. Cepas de actinomicetos utilizadas en los estudios

Cepas	Origen	Lugar
CB14	Sedimento	Cueva de Bellamar. Matanzas
EA2	Endófito	Arco Iris, Santa Clara. Villa Clara
B8	Rizósfera	Jardín Botánico UCLV

3.1 Determinación de la actividad antagonica “*in vitro*” de las cepas de actinomicetos frente a *M. phaseolina*

Para determinar la actividad antagonica *in vitro* se sembraron 3 cepas de actinomicetos en placas de Petri con Agar caseína almidón a pH 7, luego se incubaron (Incubadora, Modelo: Memmert) en la oscuridad entre 28-30 °C por siete días para permitir el crecimiento, esporulación y producción de metabolitos secundarios. El hongo fitopatógeno *M. phaseolina* (CCibp-MP2) se sembró en Agar Papa Dextrosa (PDA) e incubó en la oscuridad entre 28-30 °C, tres días previos a la realización del ensayo de bioactividad. Ambos microorganismos se enfrentaron mediante cultivo dual en placas de Petri de 90 mm de diámetro con medio de cultivo PDA (Dávila *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2016; Sellem *et al.*, 2017). Se

colocaron en un extremo de la placa un disco de 7 mm de diámetro de micelio del hongo fitopatógeno (tomado del crecimiento en placa de Petri inoculada con suspensión micelial en medio de cultivo PDA) y en el extremo opuesto otro disco de 7 mm con micelio del actinomiceto y 5 cm de separación entre ellos. Los cultivos se incubaron entre 28-30 °C y oscuridad, y cada 24 horas se midió el crecimiento radial del micelio de los hongos hasta los siete días de incubación.

Se midió el porcentaje de inhibición para cada pareja de hongo-actinomiceto, según la siguiente formula:

$$PICR (\%) = \frac{C. micelial (M. phaseolina) - C. micelial (actinomiceto)}{C. micelial (M. phaseolina)} \times 100$$

(Misk y Franco, 2011, Cuesta *et al.*, 2012).

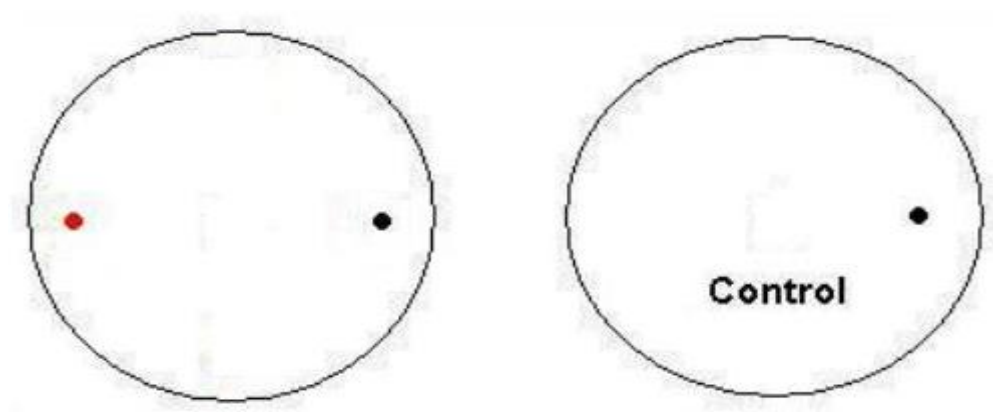


Figura 1. Montaje del enfrentamiento dual Actinomiceto/hongo. ●

Actinomiceto, ● Hongo Fitopatógeno.

El experimento se montó bajo un diseño completamente aleatorizado con cinco réplicas por tratamiento (cepas de actinomicetos) y control (hongo fitopatógeno).

3.2. Evaluación de la compatibilidad entre cepas de actinomicetos

Para determinar la compatibilidad *in vitro* de las cepas de actinomicetos en estudio, se sembraron las mismas por separado en placas de Petri de 90 mm de diámetro con Agar Caseína Almidón a pH 7. Estas se incubaron en la oscuridad entre 28-30 °C por siete días para permitir el crecimiento, esporulación y producción de metabolitos secundarios. Pasado este tiempo de incubación, se

extendió con un hisopo estéril las esporas de la cepa a compatibilizar de forma perpendicular a las otras cepas. Luego los cultivos se incubaron en las mismas condiciones antes descritas y se hicieron observaciones diarias hasta los 15 días.

El criterio que se utilizó para determinar la compatibilidad entre las cepas de actinomicetos fue la no existencia de zonas de inhibición ni sobrecrecimiento de acuerdo a lo descrito por Zaim (2018).

3.3. Evaluación del efecto de cepas de actinomicetos en el tratamiento a la semilla sobre la incidencia y severidad de la enfermedad

Cepas de actinomicetos y hongo fitopatógeno *M. phaseolina*

Con el objetivo de evaluar el efecto del tratamiento de la semilla con cepas de actinomicetos (CB14, EA2 y B8), sobre la incidencia y severidad de la enfermedad causada por el hongo fitopatógeno *M. phaseolina* (CCibp-MP2), se realizó un experimento en condiciones de casa de cultivo.

Para ello, se utilizó suelo Pardo mullido medianamente lavado según la clasificación de Hernández *et al.* (2015) proveniente de un suelo anteriormente sembrado con maíz (*Zea mays* L.)

Preparación del inóculo de los actinomicetos

Los actinomicetos se subcultivaron en erlenmeyers con 100 mL de Caldo Triptona Soya (BioCen) y se colocaron en un agitador orbital Gerhardt, durante cinco días a 120 rpm y temperatura entre 28-30 °C. El inóculo se ajustó a una concentración total de $9,5 \times 10^8$ células mL⁻¹ mediante el empleo de la cámara de Neubauer y microscopio óptico (Motic) con aumento 400X.

Preparación del inóculo de *Trichoderma harzianum* (cepa A-34)

Para la multiplicación de *T. harzianum* (cepa A-34) procedente del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV) se utilizaron erlenmeyer estériles de 250 mL en los que se vertieron 100 mL del medio de cultivo líquido Caldo de Papa Dextrosa (BioCen), a un pH de 5,5. En cada frasco se inoculó un disco de micelio

de 10 mm de diámetro del cultivo previamente crecido durante 72 h en el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) y se colocaron en un agitador orbital Gerhardt, durante tres días a 120 rpm y temperatura aproximada entre 28-30 °C. El inóculo se ajustó a una concentración de $2,5 \times 10^8$ conidios mL⁻¹ mediante el empleo de la cámara de Neubauer, y microscopio óptico (Motic) con aumento 400X.

Material vegetal utilizado en el experimento

Se emplearon semillas de *P. vulgaris* L. cv. Quivicán (Testa blanca) registradas en el Listado oficial de variedades comerciales (MINAG, 2016) procedentes de la Unidad Estatal Básica (UEB) Semillas Villa Clara. El poder germinativo de las semillas empleadas fue de 100%, las que fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1% y lavadas con agua destilada estéril durante 3 min.

Recubrimiento de las semillas

Las semillas se recubrieron según la metodología de Hamdi (1985) modificada por Cupull *et al.* (2003), la cual emplea zeolita procedente de la cantera de San Juan de los Yeras, Ranchuelo, Villa Clara (0,5 mm de diámetro de partículas) como sustrato y almidón de yuca preparado al 8% como adherente. A 5 g de zeolita se añadieron 5 mL de suspensión de los agentes biológicos a la concentración antes referida. La proporción de semilla/zeolita empleada fue de 7:1 (m/m). Se secaron al aire durante 48 h y se sembraron posteriormente.

Multiplicación del hongo fitopatógeno *M. phaseolina*

Para la multiplicación del hongo fitopatógeno *M. phaseolina* se utilizó erlenmeyer estéril con 100 g de arroz con cáscara en 100 mL de agua destilada y se esterilizó a 121°C en autoclave durante 1h; pasado 24 horas y a temperatura ambiente se inoculó con 4 discos de micelio del hongo de 1 cm de diámetro y se incubaron entre 28-30 °C por 10 días.

Inoculación

El hongo fitopatógeno se inoculó al suelo al 2 % en recipiente plásticos (marca Magenta), con capacidad de 450 g, homogenizando suelo-hongo fitopatógeno

48 h antes de la siembra. En cada magenta se sembraron de forma manual tres semillas, las cuales ya estaban recubiertas con los agentes biológicos. La humedad del suelo se mantuvo agregando inicialmente 150 mL de agua destilada por magenta y manteniendo el riego periódicamente según las necesidades de las plantas y de forma uniforme. Se utilizaron ocho tratamientos (cepas de actinomicetos EA2, CB14 y B8) y la combinación de las cepas CB14+EA2, CB14+B8 y EA2+B8, que se compararon con *T. harzianum* (cepa A-34), Celest Top FS 312 (tiametoxan+difenoconazol+fludioxonilo) a dosis de 0,192 L. ia/kg de semilla y otros dos controles (positivo y negativo) con seis réplicas bajo un diseño completamente aleatorizado. El control positivo consistió en no realizar tratamiento de semilla e inocular el hongo fitopatógeno y el control negativo no se hizo tratamiento de la semilla ni se inoculó el suelo con el hongo fitopatógeno.

3.3.1 Incidencia del tizón ceniciento del tallo causado por *M. phaseolina* sobre semillas de frijol común tratadas con actinomicetos

Se evaluó el porcentaje de incidencia del tizón ceniciento del tallo pre-emergente a los 7 días posteriores a la siembra de las semillas y el porcentaje de incidencia post-emergente a los 35 días posteriores a la germinación de las semillas mediante las fórmulas descritas por Nawar (2007).

$$\% \text{ Incidencia pre-emergente} = \frac{\text{Número de semillas no germinadas}}{\text{Número total de semillas sembradas}} \times 100$$

$$\% \text{ de incidencia post-emergente} = \frac{\text{Número de plantas muertas}}{\text{Número de plantas sobrevivientes}} \times 100$$

A las semillas no germinadas o plantas con lesiones en el hipocotilo, raíces y/o tallo se les realizaron cámara húmeda y preparaciones microscópicas para confirmar la identidad del hongo fitopatógeno que se inoculó. Para esto último se empleó los criterios descritos por Watanabe (2002).

3.3.2 Severidad del tizón ceniciento del tallo causado por *M. phaseolina* sobre semillas de frijol común tratadas con actinomicetos

Se evaluó la severidad de la enfermedad provocadas por *M. phaseolina* en raíces y tallos, mediante la fórmula de Townsend y Heuberguer (1943) y el empleo de la escala propuesta por Van Schoonhoven y Pastor Corrales (1987) (Tabla 2).

$$S (\%) = \frac{\Sigma(n \times v)}{G \times N} \times 100$$

S = Severidad

n = Número de plantas por grado de la escala

v = Grado de ataque según la escala

G = Número total de grados

N = Número total de plantas observadas

Tabla 2. Escala para la evaluación de la severidad de la enfermedad causada por *M. phaseolina* en frijol común

Grado	Descripción
1	Sin síntomas visibles de la enfermedad
3	Pudrición carbonosa restringida a los cotiledones. En <i>Sclerotium rolfsii</i> , 1 % del hipocotilo con síntomas. Tejidos inferiores del tallo con lesiones pequeñas y susceptibles.
5	Aproximadamente 10 % del hipocotilo y tejidos inferiores del tallo con lesiones, acompañadas con estructuras de fructificación del hongo.
7	Aproximadamente 25 % del hipocotilo y tejidos inferiores del tallo con lesiones, acompañadas con estructuras de fructificación del hongo.
9	Aproximadamente 50 % o más del hipocotilo y tejidos inferiores del tallo con lesiones, y gran número de estructuras de fructificación del hongo.

Procesamiento estadístico de los datos

El procesamiento estadístico de los datos consistió en análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA), previa comprobación de la normalidad y homogeneidad de varianzas. Se realizaron comparaciones de medias mediante las pruebas de Tukey y H de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$). Se empleó el paquete estadístico *Statistic Package for Social Science* (SPSS) v. 21 sobre Windows.

4. Resultados y discusión

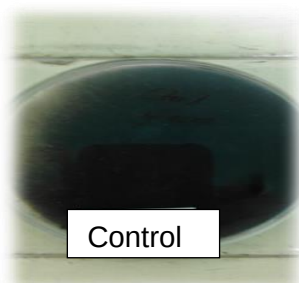
4.1 Determinación actividad antagonica *in vitro* de los actinomicetos frente a *M. phaseolina*

El ensayo de antagonismo *in vitro* (Tabla 3) mostró que las tres cepas de actinomicetos mostraron actividad antagonica frente a *M. phaseolina*. La cepa que mostró mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial fue B8 con un valor de 82,07 % (Tabla 3 y Figura 2).

Tabla 3. Porcentaje de inhibición de cepas de actinomicetos sobre el crecimiento micelial de *M. phaseolina*

Cepas	Porcentaje de inhibición (%)
B8	82,07 a
CB14	76,08 c
EA2	78,76 b
E.E (±)	0,98
C.V (%)	4,25

(a, b) Medias con letras diferentes en la misma columna difieren significativamente por la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$) $n=5$



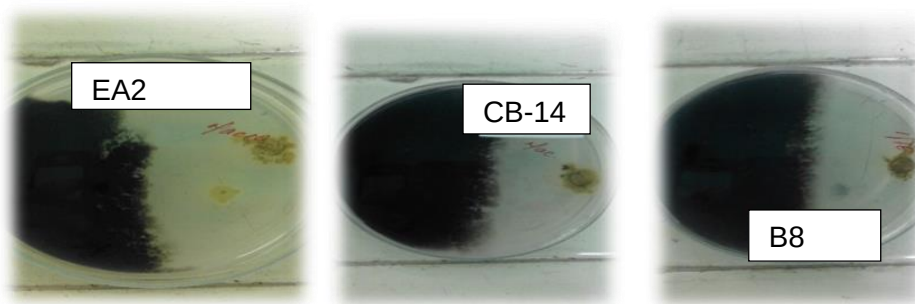


Figura 2. Ensayo de antagonismo *in vitro* de cepas de actinomicetos frente a *M. phaseolina*

Estos resultados se corresponden con los obtenidos por Priya (2012) el cual obtuvo en su investigación que el 18,5 % de las cepas enfrentadas contra varios hongos fitopatógenos presentaron porcentajes de inhibición, tales como un 12,3 % contra *Fusarium solani*, 30,7 % contra *Phytophthora infestans*, un 32,3 % contra *Macrophomina phaseolina* y un 38,5 % contra *Botrytis cinerea* y *Rhytisma acerinum*.

En una investigación similar, El-Hussein *et al.* (2014) evaluaron la actividad antifúngica *in vitro* de 104 aislamientos de actinomicetos frente a los hongos fitopatógenos *Drechslera halodes*, *Alternaria alternata*, *Alternaria sesami* y *M. phaseolina*, encontrando un aislado de actinomicetos (R92) que era altamente antagonista frente a todos los hongos fitopatógenos probados.

Harikrishnan *et al.* (2014) aislaron un total de 132 cepas de actinomicetos de diferentes suelos de la rizósfera de arroz de Tamil Nadu, India, con el propósito de evaluar su actividad antagonista frente a 4 agentes fitopatógenos que afectan el cultivo del arroz. De ellos, 57 mostraron actividad antagonista hacia *Rhizoctonia solani*, agente causal del tizón de la vaina de arroz y los otros hongos patógenos tales como *M. phaseolina*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium udum* y *Alternaria alternata* presentaron zonas de inhibición variable.

Malleswari (2014) evaluó *in vitro* la actividad antagonista de 219 aislados bacterianos obtenidos a partir de muestras de suelo de la rizósfera de plantas medicinales y aromáticas contra *M. phaseolina*. Del total de aislados bacterianos sólo 43 cepas mostraron actividad antagónica contra el hongo fitopatógeno, y un

sólo aislado mostró la máxima inhibición del crecimiento micelial (52,22%) por el método de cultivo dual. Este autor seleccionó los mejores candidatos bacterianos para su posible uso dentro de los sistemas de manejo integrado de la enfermedad.

Kamara y Gangwar (2015) aislaron 100 cepas de actinomicetos a partir de 30 muestras de suelo rizosférico de *Catharanthus roseus* y *Withania somnifera* en diferentes lugares en Ludhiana, India, con el objetivo de probar su actividad antifúngica contra siete hongos fitopatógenos: *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Helminthosporium oryzae*, *M. phaseolina*, *Penicillium* sp., *R. solani* y *Sclerotium rolfsii*. Estos autores, informaron un total de 39 aislamientos con actividad antifúngica; de ellos 9 cepas contra *Alternaria alternata*, 19 contra *Fusarium oxysporum*, 20 contra *Helminthosporium oryzae*, 14 contra *M. phaseolina*, 10 contra *Penicillium* sp. y 16 contra *R. solani*. También, concluyeron que estos actinomicetos del suelo rizosférico son candidatos prometedores a utilizar como agentes de control biológico contra hongos fitopatógenos.

Los actinomicetos del suelo han revelado su amplia actividad antifúngica (Tinatin y Nuzrat, 2006). Se ha demostrado que protegen a varias plantas contra diversos hongos fitopatógenos transmitidos por el suelo. Estos producen un conjunto de compuestos antifúngicos, entre los que se encuentra un miembro de la clase de antimicina, que actúan inhibiendo el flujo de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial de los hongos fitopatógenos, y se han identificado en el género *Streptomyces* (Seipke et al., 2011; Seipke et al., 2012; Schoenian et al., 2014).

En el presente trabajo, aunque no se determinó la capacidad enzimática extracelular de las cepas evaluadas, se puede inferir a partir del halo de inhibición que provocaron sobre *M. phaseolina*, que son altas productoras de enzimas líticas extracelulares tales como quitinasas y glucanasas. Este resultado corrobora lo planteado por Hoster et al. (2005) y El-Tarabily (2006) quienes plantean que las actinobacterias previene el crecimiento de organismos fitopatógenos debido a su capacidad de producir enzimas quitinasas, las cuales están presentes en la mayoría de las especies del género *Streptomyces* spp. (Kämpfer et al., 2014).

Solans *et al.* (2016) evaluaron el potencial de biocontrol *in vitro* de 32 cepas de actinobacterias contra los hongos fitopatógenos *Cercospora sojina*, *Macrophomia phaseolina*, *Phomopsis* sp., *Fusarium oxysporum* y *Fusarium verticilloides*. Del total de cepas, 8 fueron seleccionadas por inhibir el crecimiento de los hongos fitopatógenos.

Shrivastava *et al.* (2016) evaluaron *in vitro* la actividad de biocontrol de una cepa de *Streptomyces aureofaciens* K20 aislada de un suelo con problemas de salinidad contra *M. phaseolina* mediante el método de cultivo dual. Estos autores informaron que la actinobacteria inhibió el crecimiento micelial de *M. phaseolina* al provocar una zona de inhibición de $27 \pm 1,33$ mm.

Singh *et al.* (2016) aislaron un total de 80 cepas de actinomicetos a partir de suelos de diferentes hábitats de la región de Chambal, Madhya Pradesh, para evaluar su capacidad antagónica *in vitro* contra los hongos fitopatógenos de la soya *M. phaseolina*, *F. oxysporum*, *Colletotrichum truncatum* y *R. solani*. De estos, solo un actinomiceto ACITM-1 mostró actividad antifúngica contra *M. phaseolina*, *F. oxysporum*, *R. solani* y *C. truncatum*.

Vijayabharathi *et al.* (2018) informaron sobre la actividad antifúngica de una cepa de *Streptomyces griseoplanus* SAI-25 aislada de la rizósfera del arroz contra el hongo fitopatógeno *M. phaseolina*, agente causal de la pudrición carbonosa en sorgo, sugiriendo su uso como una alternativa dentro del manejo de esta plaga en el marco de una agricultura sostenible.

Las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR) como inoculantes microbianos en los cultivos agrícolas desempeñan un papel importante en el biocontrol de los hongos fitopatógenos transmitidos por el suelo. Estos inhiben el crecimiento de agentes patógenos mediante la secreción de antibióticos, toxinas, bio-surfactantes, enzimas de degradación de la pared celular, quitinasas, glucanasas. La antibiosis es un modo de acción altamente eficaz de las PGPR en la supresión de enfermedades transmitidas por el suelo como el trigo, el arroz, el maíz, el garbanzo y la cebada. Muchas cepas bacterianas de PGPR tales como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acetobacter*, *Paenibacillus*, *Streptomyces* y otras han sido

implicadas como agentes de control biológico, lo que sugiere que muchas cepas bacterianas tienen potencial para ser usadas con este propósito.

Muchos investigadores han demostrado que *Streptomyces* spp. produce valiosos metabolitos bioactivos con actividades de amplio espectro como antibacterianos, antimicóticos, antiparasitarios, antitumorales, antivirales, insecticidas y herbicidas (Baltz, 2008; Liu *et al.*, 2008).

Actualmente están disponibles en el mercado internacional 5 formulaciones comerciales de bioproductos obtenidos a partir de diferentes cepas de *Streptomyces* para el control de agentes fitopatógenos de plantas transmitidos por semillas y suelos (Krishna *et al.*, 2018).

4.2 Evaluación de la compatibilidad entre cepas de actinomicetos

En la Figura 3. se observa la compatibilidad exhibida entre las cepas de actinomicetos CB14+EA2, CB14+B8 y B8+EA2. Como se observa no existió inhibición del crecimiento ni sobrecrecimiento entre las cepas.

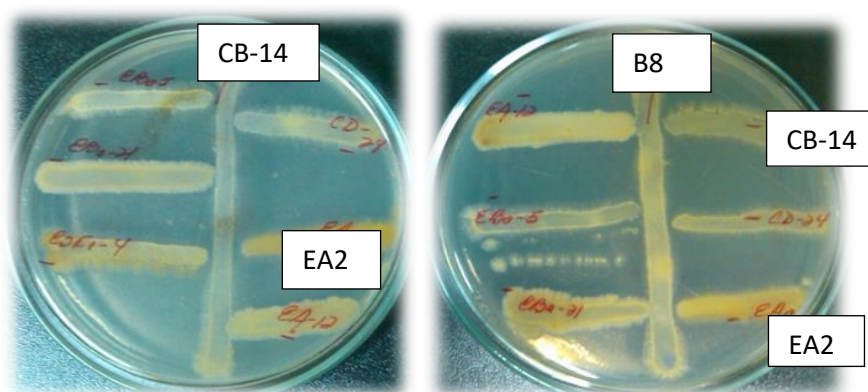


Figura 3. Ensayo de compatibilidad *in vitro* entre cepas de actinomicetos

Estos resultados son de suma importancia previo a la evaluación *in vivo* del efecto combinado entre cepas de un mismo microorganismo. Varios estudios han sugerido, que a menudo el uso de cepas individuales resulta inconsistente en el control de una enfermedad. Una de las estrategias para superar tal efecto es

combinar dos o más microorganismos beneficiosos en las preparaciones de biocontrol (Raupach y Kloepper, 1998).

Por otra parte, Droby (2001) y Meyer y Roberts (2002) informaron que las mezclas de agentes de biocontrol tienen la ventaja de ejercer un amplio espectro de acción, aumentar la eficacia y confiabilidad del control biológico en general al asegurar la inducción de enzimas de defensa sobre las cepas individuales.

Whipps (2001) informó que una forma de mejorar el control biológico en la rizósfera puede ser agregar una mezcla o combinaciones de agentes de control biológico, particularmente si exhiben diferencias o modos de acción o habilidades complementarios para colonizar micrositios de raíz. Tales interacciones múltiples son la situación normal en la rizósfera. Este mismo autor, señala que el uso de mezclas o combinaciones de diferentes cepas puede practicarse siempre que ningún miembro de la mezcla sea inhibidor para otro o interfiera excesivamente con otros microorganismos existentes en la rizósfera.

4.3 Evaluación del efecto de cepas de actinomicetos en el tratamiento a la semilla sobre la incidencia y severidad de la enfermedad

4.3.1 Incidencia del tizón ceniciento del tallo causado por *M. phaseolina* sobre semillas de frijol común tratadas con actinomicetos

En la Figura 4 se muestran los porcentajes de incidencia pre-emergente de la enfermedad tizón ceniciento de tallo provocado por el hongo fitopatógeno *M. phaseolina* al tratar las semillas de frijol común con las cepas de actinomicetos, *T. harzianum* y Celest Top. Se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos.

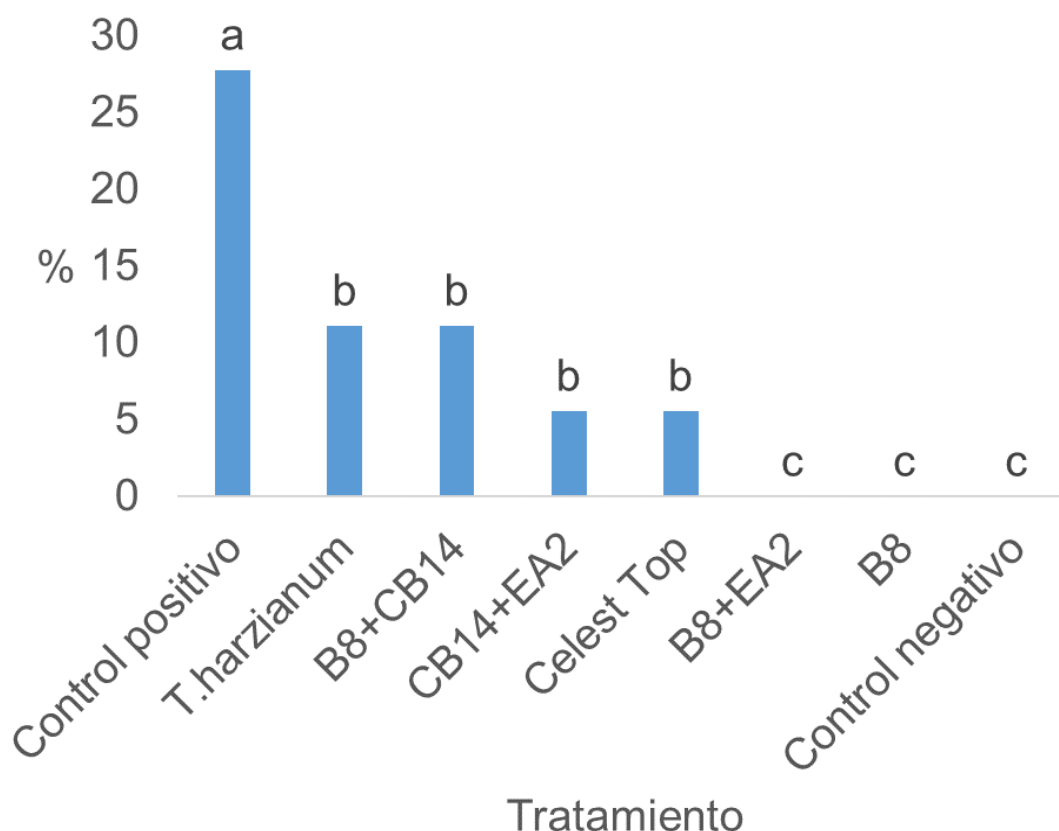


Figura 4 Porcentaje de incidencia pre-emergente del tizón ceniciento del tallo en semillas tratadas con cepas de actinomicetos, *T. harzianum* y Celest Top a los 7 días de la inoculación del suelo con *M. phaseolina*

Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas según la prueba no paramétrica H de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$) $n=24$

Los menores porcentajes de incidencia se hallaron en los tratamientos donde las semillas se protegieron con las cepas de actinomicetos B8+EA2 y B8, los cuales a su vez no difirieron estadísticamente del control negativo, pero sí del resto de los tratamientos. Valores intermedios de incidencia de la enfermedad se encontraron para los tratamientos en los que las semillas fueron recubiertas con *T. harzianum*, la combinación de las cepas de actinomicetos (B8+CB14 y CB14+EA2) y el tratamiento con el producto químico Celest Top. Entre estos tratamientos no se encontraron diferencias estadísticas, pero sí con respecto al control positivo, que exhibió los mayores porcentajes de incidencia.

Los resultados obtenidos con las cepas de actinomicetos B8 y la combinación B8+EA2 en la reducción de la incidencia pre-emergente de la enfermedad, indican el control efectivo que ejercieron estas cepas en la inhibición del desarrollo del hongo fitopatógeno *M. phaseolina*, al permitir la germinación de las semillas a diferencia de los otros tratamientos biológicos (cepas de actinomicetos B8+CB14, CB14+EA2, B8 y *T. harzianum*), que no lograron frenar el proceso infectivo de *M. phaseolina*, haciendo posible que se manifestaran pudriciones de los cotiledones de las semillas e impedir su germinación (Figura 5).

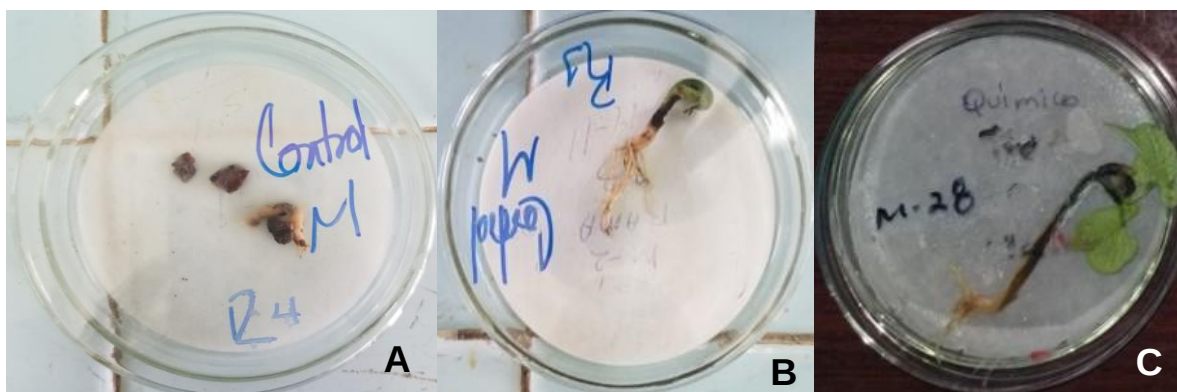


Figura 5. Síntomas pre-emergentes de la enfermedad tizón ceniciento del tallo provocada por el hongo fitopatógeno *M. phaseolina* en los tratamientos. Control positivo (A-B) y Celest Top (C)

Diversos autores han encontrado resultados favorables al aplicar rizobacterias como agentes de control biológico en otros sistemas planta-patógeno. Por ejemplo, Hernández *et al.* (2008) al aplicar las cepas de *P. fluorescens* en el cultivo del frijol común, lograron disminuir la cantidad de lesiones provocadas por *Colletotrichum lindemuthianum*. Pujol *et al.* (2005) aplicaron una cepa de *P. fluorescens* para controlar los altos índices de afectación provocados por *Erwinia amylovora* en plantas de pera, obteniendo resultados satisfactorios.

La disminución de la incidencia de los hongos fitopatógenos ante la presencia de bacterias antagonistas ha sido bien documentada. De acuerdo con Raaijmakers *et al.* (2009) los microorganismos biocontroladores afectan las actividades

metabólicas de los patógenos del suelo, así como la distribución temporal y espacial de estos, a través de la competencia, antagonismo e hiperparasitismo.

Gopalakrishnan *et al.* (2011) demostraron que cinco cepas de actinomicetos (CAI-17, CAI-68, CAI-78, KAI-26 y KAI-27) ejercieron buen efecto biocontrolador sobre el tizón ceniciento del tallo en el cultivo del sorgo.

Yadav *et al.* (2013) demostraron que la cepa de *Streptomyces* sp. S160 inhibió en un 50 % el crecimiento micelial *in vitro* de *M. phaseolina* y redujo significativamente la incidencia del tizón ceniciento del garbanzo en un 33,3 % en invernaderos. Este experimento también reveló que el tratamiento de las semillas de conjunto con la aplicación de suelo sustentó la mejor germinación de la semilla (88,6 %), mejor índice de vigor (7326,91) y mayor reducción en la incidencia del tizón ceniciento (12,5 %) al compararlo con la aplicación del tratamiento y el suelo solos. Esta cepa de *Streptomyces* también incrementó el crecimiento y la actividad de las enzimas relacionadas con la defensa de las plantas de garbanzo.

Estos resultados se corresponden con informes anteriores que destacan las potencialidades de *Streptomyces* como agentes de control biológico. Por ejemplo, *Streptomyces ambofaciens* controló la caída de las hojas en el tomate y la marchitez por *Fusarium* en el algodón (Reddi y Rao, 1971). Lee y Hwang (2002) recomendaron el uso de *S. lipmanii* como agente de control de la piriculariosis del arroz causado por *Magnaporthe grisea*. Kanini *et al.* (2013) informaron la capacidad de *Streptomyces rochei* ACTAI55I para proteger las semillas de tomate del efecto patogénico de *Fusarium oxysporum*. También se ha informado que el filtrado de cultivo de *S. spectabilis* CMU-PA101 controla la mancha púrpura causada por *Alternaria porri* (Khamna *et al.*, 2009).

Al analizar el porcentaje de incidencia post-emergente, de forma similar al experimento anterior se hallaron diferencias estadísticas entre los tratamientos evaluados. Las combinaciones de las cepas de actinomicetos B8+CB14 y CB14+EA2 fueron las que lograron la mayor protección biológica de las plantas, al exhibir los menores porcentajes de incidencia post-emergente del tizón ceniciento del tallo, sin diferencias estadísticas con los tratamientos donde se aplicó

T. harzianum y Celest Top. Los tratamientos de las semillas con el resto de los agentes biológicos no tuvieron diferencias estadísticas entre ellos, pero sí con respecto al control positivo (Figura 6).

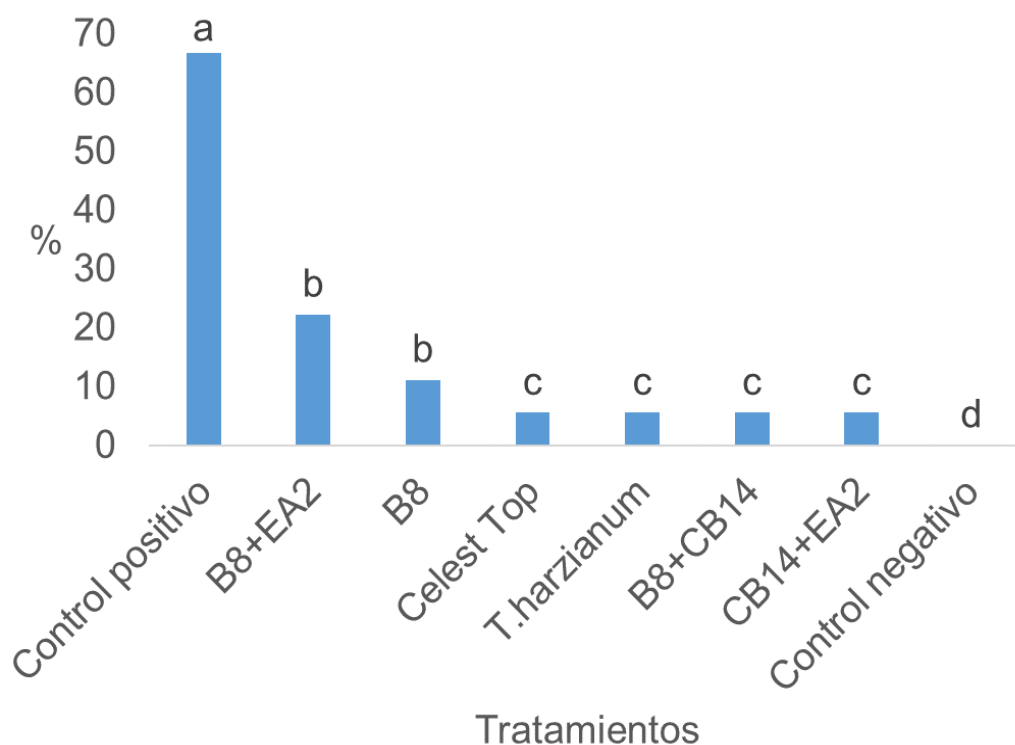


Figura 6. Porcentaje de incidencia post-emergente del tizón ceniciento del tallo en semillas tratadas con cepas de actinomicetos, *T. harzianum* y Celest Top a los 35 días posteriores a la inoculación del suelo con *M. phaseolina*

Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas según la prueba no paramétrica H de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$) $n=24$

Estos resultados se corresponden con los obtenidos por Kumar *et al.* (2013) quienes evaluaron la eficacia de *Streptomyces* sp. S160 en condiciones de invernadero a través del tratamiento de semillas y la aplicación del suelo. La aplicación del suelo dio como resultado una reducción del 74,8% de la podredumbre carbonosa causada por *M. phaseolina* y el tratamiento de la semilla mostró una reducción del 64,5%, en comparación con el control (20,85%). Sin embargo, una combinación de tratamiento de semillas y aplicación del suelo con el agente de control biológico resultó ser más efectiva y redujo la podredumbre de

carbón en un 87,5%. Estos autores concluyeron que este resultado fue posible al efecto sinérgico de ambos tratamientos sobre los tratamientos individuales.

Abou-Elaid *et al.* (2014) evaluaron tres métodos de aplicación de los agentes biológicos *T. harzianum*, *T. viride* y *B. subtilis* para el control de los hongos fitopatógenos *Fusarium solani*, *M. phaseolina* y *R. solani*, agentes causales de la pudrición de las raíces en uva bajo condiciones de campo. Estos autores obtuvieron que en las combinaciones de los métodos empleados fue donde lograron reducir los porcentajes de incidencia y severidad de la enfermedad, considerando el mismo como una técnica promisorio a utilizar en la uva en condiciones de campo.

Villela (2014) evaluó la eficacia *in vivo* de 19 aislados de *Bacillus*, obtenidos de la rizósfera y rizoplasma de plantas de frijol común, para el control del hongo fitopatógeno *M. phaseolina*. Los resultados obtenidos indicaron que la cepa RP 5, aislada del rizoplasma, fue la más efectiva en proteger las plantas de la infección por el hongo fitopatógeno, al causar una mejor colonización de las raíces de las plantas.

Sabatéa *et al.* (2018) evaluaron el efecto *in vivo* del tratamiento de las semillas de frijol común con varias cepas de *Bacillus* spp. aplicadas de forma individual y combinada contra *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) y obtuvieron que la inoculación de las semillas con las combinaciones de las cepas B14+P12, B14+B19 o B19+P12 redujo el efecto del patógeno y el progreso de la enfermedad.

4.3.2 Severidad del tizón ceniciento del tallo causado por *M. phaseolina* sobre semillas de frijol común tratadas con actinomicetos

En la Figura 7 se observan los porcentajes de severidad de la enfermedad tizón ceniciento del tallo a los 35 días posteriores a la inoculación con *M. phaseolina*. Los menores porcentajes se encontraron en los tratamientos con las combinaciones de las cepas de actinomicetos B8+CB14 y CB14+EA2, los cuales a su vez no difirieron estadísticamente de *T. harzianum* y Celest Top.

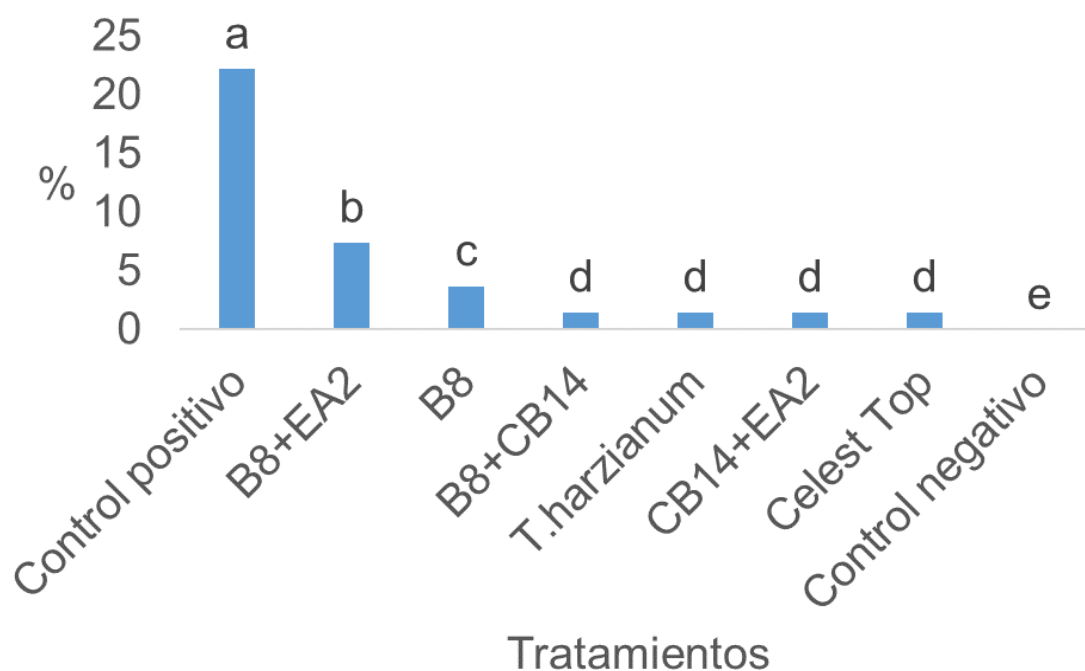


Figura 7. Porcentaje de severidad del tizón ceniciento del tallo en semillas tratadas con cepas de actinomicetos, *T. harzianum* y Celest Top a los 35 días posteriores a la inoculación del suelo con *M. phaseolina*

Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas según la prueba no paramétrica H de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$) $n=24$

Los mayores porcentajes de severidad de la enfermedad se alcanzaron en los tratamientos donde se recubrieron las semillas con la cepa de actinomiceto B8 y la combinación B8+EA2 con diferencias estadísticas entre ellas y con respecto al control positivo. Este resultado demuestra la baja eficacia biológica que tuvieron estos tratamientos en la protección de las plantas (Figura 8).

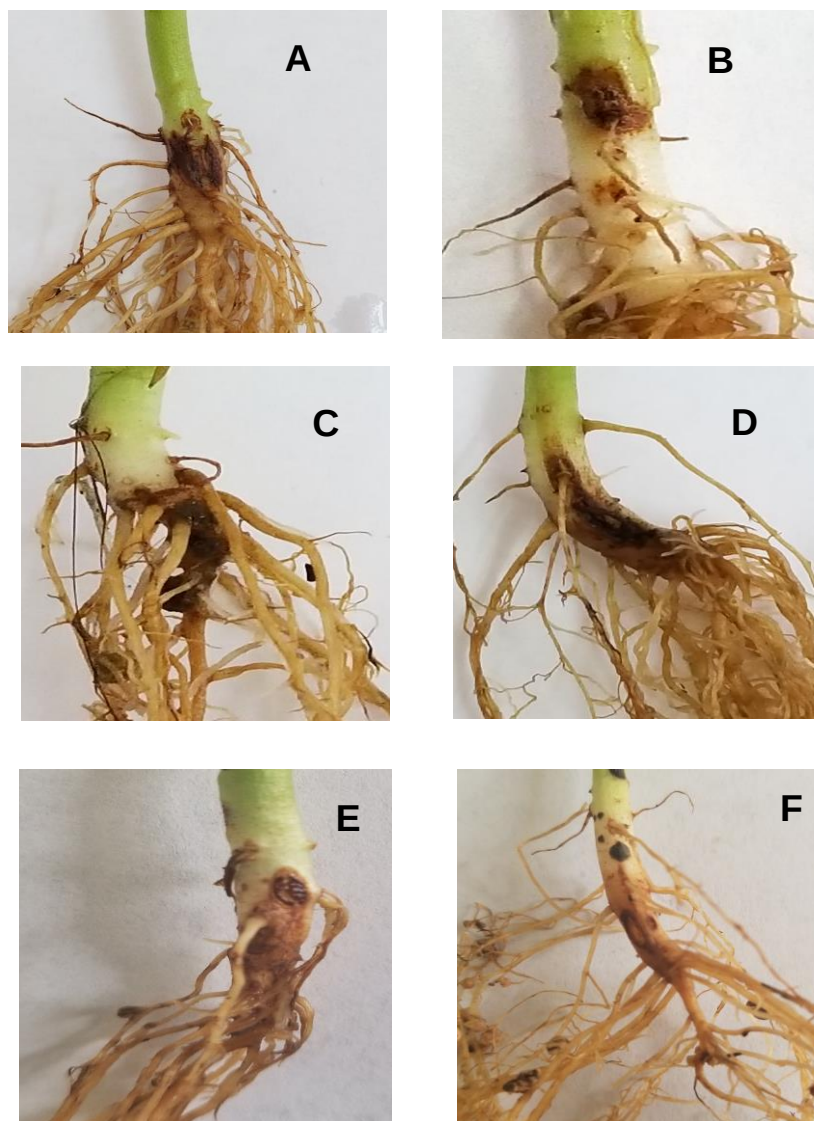


Figura 8. Lesiones en el tallo y raíces del cultivar de frijol común Quivicán a los 35 días posteriores a la inoculación del suelo con *M. phaseolina*.

(A-B) Combinación de actinomicetos B8+EA2, (C-D) Control positivo, (E-F) Cepa de actinomiceto B8

Estos resultados se corresponden en parte con los obtenidos por Thilagavathi *et al.* (2007), quienes evaluaron la efectividad individual y combinada de varias cepas de los agentes de biocontrol *T. viride*, *P. fluorescens* y *B. subtilis* contra *M. phaseolina*, el agente causal de la pudrición de las raíces en *Vigna radiata* bajo condiciones de casa de cultivo y campo. Estos autores informaron una reducción

de la incidencia de la enfermedad con la combinación de una cepa de *P. fluorescens* y *T. viride* al compararla con las cepas individuales y el control.

Maketon *et al.* (2008) estudiaron la eficacia de la formulación comercial Trisan TM de *T. harzianum* (AP-001) y Larminar TM de *B. subtilis* (AP-01), aplicada sola o en combinación para suprimir tres enfermedades del tabaco, incluida la marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*), desprendimiento de la hoja (*Pythium aphanidermatum*) y mancha foliar (*Cercospora nicotiana*). *T. harzianum* AP-001 y *B. subtilis* AP-01 solo poseían eficacias más bajas en el control de *R. solanacearum* en comparación con su combinación donde ocurría algún efecto sinérgico. Su mezcla también fue efectiva en la supresión del desarrollo de la enfermedad de la mancha foliar de la hoja y la caída. De acuerdo con estos resultados, Nel *et al.* (2006) informaron que la formulación comercial; Patostop (*Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. y *Gliocladium* spp.) redujo la severidad de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*.

En Cuba, García (2014) seleccionó siete cepas de actinomicetos eficientes, las que mostraron actividad antagonista *in vitro* frente a *S. sclerotiorum*, *S. rolfsii*, *M. phaseolina* y *R. solani*.

Arias (2015) en estudios en frijol común encontró actividad antagónica *in vitro* e *in vivo*, en el tratamiento a la semilla con actinomicetos contra *M. phaseolina*.

Amule *et al.* (2018) evaluaron el efecto de la inoculación simple y combinada entre actinobacterias, *Rhizobium* y rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en soya bajo condiciones de casas de cultivo y campo. Estos autores informaron que el consorcio microbiano mejoró el rendimiento de la soya y salud del suelo al compararlo con el control y la aplicación simple de los microorganismos.

Resultados similares obtuvieron Zaim *et al.* (2018) al evaluar el efecto combinado de la bacteria antagonista *B. subtilis* con *T. harzianum* en el tratamiento de la semilla del garbanzo contra *F. oxysporum* f.sp *ciceris* en condiciones semicontroladas. Los mismos informaron una reducción de la severidad de la enfermedad del 93,67 % al aplicar ambos antagonistas, además de sugerir que su

eficacia está asociada a sus propiedades antagónicas y competitividad en la zona de la rizósfera.

Después de analizados los experimentos, relacionados con el efecto del tratamiento de las semillas con actinobacterias antagonistas sobre la incidencia y severidad del tizón ceniciento del tallo en frijol común, concluimos que las cepas utilizadas tienen potencial para ser usadas como agentes de biocontrol de *M. phaseolina* en condiciones de campo.

5. Conclusiones

1. La cepa de actinomiceto que mostró mayor actividad antagónica *in vitro* frente a *M. phaseolina* fue B8.
2. Las cepas de actinomicetos CB14+EA2, B8+CB14 y B8+EA2 son compatibles entre sí.
3. Las semillas tratadas con la cepa de actinomiceto B8 y su combinación con la cepa EA2 (B8+EA2) presentaron el mejor control de la incidencia pre-emergente del tizón ceniciento del tallo.
4. Las semillas tratadas con las combinaciones de las cepas de actinomicetos CB14+EA2 y B8+CB14 presentaron el mejor control de la incidencia post-emergente y severidad del tizón ceniciento del tallo, sin diferencias con el hongo antagonista *T. harzianum* y el Celest Top.

6. Recomendaciones

1. Repetir la evaluación del efecto del tratamiento de las semillas de frijol común con las mejores combinaciones de cepas de actinomicetos frente a *M. phaseolina* en condiciones semicontroladas.
2. Extender el período de evaluación de la enfermedad tizón ceniciento del tallo a más de 35 días posteriores a la inoculación con *M. phaseolina*.

7. Referencias bibliográficas

1. Abawi, G. S. y Pastor, M. A (1990). Root rot of beans in Latin American and Africa Diagnosis, Research, Methodologies and management strategies. CIAT. Resúmenes Analíticos sobre el frijol común XV (3): 68-120.
2. Abou-Elaid, H., El-Naggar, M. A., Abdel-Kareem, F., El-Deeb, H. M. and El-Shahawy, I. E. (2014). Field Application with Biocontrol Agents for Controlling Root-rot Disease of Grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Middle East Journal of Agriculture Research* 3(4): 775-781.
3. Aceves, M., Otero-Sánchez, M. A., Rebolledo-Domínguez, O., Lezama-Gutiérrez, R. y Ochoa-Moreno, M. E. (2005). Producción y efecto antagónico de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma spp.*, en la inhibición de *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum* *in vitro*, *Chapingo* 11: 273-278.
4. Amule, F. C., Sirothiya, P., Rawat, A. K. and Mishra, U. S. (2018). Effect of actinobacterial, *Rhizobium* and plant growth promoting rhizobacteria consortium inoculation on rhizosphere soil properties in soybean in Jabalpur district of Madhya Pradesh. *International Journal of Chemical Studies* 6 (1): 583-586.
5. Argaw, A. and Akuma, A. (2015). *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* sp. inoculation improves the agronomic efficiency of N of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Environ. Syst. Res.* 14:11. DOI 10.1186/s40068-015-0036-z.
6. Arias, J. H., Jaramillo, M. y Rengifo, T. (2007) Manual Buenas Prácticas Agrícolas en la producción de frijol voluble. Ed. Colombia, p. 25-48.
7. Arias, J. R. (2015). Selección de cepas de actinomicetos biocontroladoras de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, con efecto estimulante en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis en opción al Título Académico de Master en

Agricultura Sostenible. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Cuba, 68pp.

8. Baltz, R. H. (2008). Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Curr. Opin. Pharmacol.* 8(5):557-63.
9. Ben-Omar, N., Merroun, M. L., Arias Peñalver, J. M. and Gonzalez Muñoz, M. T. (1997). Comparative heavy metal biosorption study of Brewery yeast and *Myxococcus xanthus* biomass. *Chemosphere* 35 (10): 2217-2283.
10. Berdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* 58(1):1-26.
11. Bergey, D. H. and Holt, J. (2000). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Lippincott. Williams & Wilkins. Philadelphia edn.: Williams & Wilkins Company, 1957, p. 1094.
12. Bocourt, Y., Cantillo, T., Ramos, E., González, M. y López, M. (2009). Prospección de hongos del suelo con potencialidades para el control biológico en suelos de agroecosistema cubanos. *Fitosanidad* 13(1):3-5.
13. Bouhot, D. (1967). Contribution a l'étude des maladies des gousses et des graines d'arachides dues au *Macrophomina phaseoli*. *L'Agronomie Tropicale*, 9: 865-887.
14. Cardona, R. (2006). Distribución vertical de esclerocios de *Macrophomina phaseolina* en un suelo infestado naturalmente en el estado Portuguesa. *Rev. Fac. Agron.* 23(3): 285-293.
15. CIAT (1988). Pudriciones radicales del frijol y su control. Unidad Auditorial. Guía de estudio. 52 p. *Resúmenes analíticos sobre frijol* XIII (1):50.
16. Cuervo, U. Y., Soroa, C. A. and Basante, B. G. (1998). Respuesta del chile inoculado con micorrizas al ataque de *F. oxysporium* y *R. solani* durante el

trasplante bajo condiciones de invernadero. Tercer Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Junio 1-5. La Habana. Cuba, p. 466.

17. Cuesta, G., García -de la Fuente, R., Abad, M., Fornes, F., Torriani-Gorini, A., Yagil, E. and Silver, S. (2012). Isolation and identification of actinomycetes from a compost-amended soil with potential as biocontrol agents. *Journal of Environmental Management* 95: S281-S282.
18. Cupull, R., Andreu, C. M, Pérez, C., Delgado, I. y Cupull, M. (2003). Efecto de *Trichoderma viride* como estimulante de la germinación, en el desarrollo de posturas de cafetos y el control de *Rhizoctonia solani* Kühn. *Centro Agrícola* 30 (1):21-25.
19. Dávila-Medina, M. D., Gallegos Morales, G., Hernández Castillo, F. D., Ochoa Fuente, Y. M. y Flores Olivas, A. (2013). Actinomicetos antagonicos contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola. *Revista Mexicana de Ciencias agrícolas* 4(8): 1187-1196.
20. de la Garza, J. L y Díaz, A. (1989). *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, Un patógeno importante en los cultivos. Folleto técnico # 2.
21. de Ron, A. M., González, A. M., Rodiño, A. P., Santalla, M., Godoy, L. y Papa, R. (2016). History of the common bean crop: its evolution beyond its areas of origin and domestication. *Arbor*, 192 (779): a317. doi.org/10.3989/arbor.2016.779n3007.
22. Dhingra, O. and Sinclair, J. (1977). An annotated bibliography of *Macrophomina phaseolina*. 1905-1975. Universidade Federal de Vicosa, Minas Gerais, Brazil. Diaga, D, Tahir A y Ndoeye I (2003). Actinorhizal, mycorrhizal and rhizobial symbioses: how much do we know. *African Journal of Biotechnology* 2(1):1-7.

23. Díaz, A. (1985). Transmisión de *Macrophomina phaseolina* en el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) 1 Reunión Nal. Problemática de poscosecha de granos y semillas. Irapuato, Gto. Resumen HM-10.
24. Díaz, A. (1992). Evaluación de genotipos de frijol e influencia de las temperaturas con relación a la pudrición carbonosa. *Agricultura Técnica en México* 18:3-10.
25. Droby, S. (2001). Enhancing biocontrol activity of microbial antagonists of postharvest diseases, in *Enhancing Biocontrol Agents and Handling Risks* (M. Vurro, J. Gressel, T. Butt, G.E. Harman, A. Pilgeram, R.J. St Leger, D.L. Nuss) IOS Press, Amsterdam, Netherlands, 295 p.
26. Echávez, R. y Gómez, J. E. (1997) Rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR) controlan *R. solani* y *M. phaseolina* en Puerto Rico. IX Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Libro de Resúmenes. Montevideo, Uruguay, p. 290.
27. El-Hussein, A. A., Alhasan, R. E. M., Abdelwahab, S. A and El-Siddig, M. A. (2014). Isolation and Identification of *Streptomyces rochei* strain active against phytopathogenic fungi. *British Microbiology Research Journal* 4(10): 1057-1068.
28. El-Tarabily, K. A. (2006). Rhizosphere-competent isolates of streptomycete and non-streptomycete actinomycetes capable of producing cell-wall-degrading enzymes to control *Pythium aphanidermatum* damping-off disease of cucumber. *Can. J. Bot.* 84:211–222.
29. El-Tarabil, K. A y Sivasithampara, K. (2006). Non-Streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soilborne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 1505–1520.

30. Ellis, M. A., Gálvez, G. E y Sinclair, J. B. (1976). Effect of pod contact with soil on fungal infection of dry seeds. *Plant Disease Reporter* 60(11): 974-976.
31. Ezziyyani, M., Pérez, C., Requena, M., Ahmed, A. y Candela, M. (2004). Evaluación del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*, *Anales de Biología* 26: 61-68.
32. Fernández, C. (1988). Vida microbiana en el suelo. Ed. Pueblo y Educación. Habana, Cuba. p. 306-331.
33. FIRA. (2016). Panorama agroalimentario Frijol 2016. Dirección de Investigación y Evaluación económica y sectorial. 36p
34. Folgueras, M. (2010). Las pudriciones radicales de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) en Cuba. Etiología. Epifitiología y manejo. Tesis presentada para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. UCLV. Santa Clara. Cuba, 98p.
35. Franco-Correa, M. (2008). Evaluación de caracteres en Actinomicetos e Interacciones de estas Rizobacterias (PGPR) con Hongos Formadores de Micorrizas. Universidad de Granada, p. 38-90.
36. Franco-Correa, M. (2009). Use of actinomycetes in processes biofertilization. *Rev. Peru. Biol.* 16 (2): 239-242.
37. Franco, F., Pedroso, R., Noa, A., Castañeda, I., Ríos, C., Aredondo, I. y Chacón, A. (2004). Lista oficial de plantas. Material complementario para la Botánica. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Centros de Estudios del Jardín Botánico. Cuba.

38. García, N. B. (2014). Selección de cepas de actinomicetos para el control de *Rhizoctonia solani* Kühn, *Sclerotium rolfsii* Sacc., *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. y *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis de Diploma, Departamento de Biología. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Cuba, 51p.
39. Ghanem, N., Sabry, S., El-sherif, Z. & El-Ela, A. (2000). Isolation and Enumeration of marine Actinomicetes from seawater and sediments in Alexandria. *Applied and Environmental Microbiology* 46:105-111.
40. González, Mirta. (1988). Enfermedades fungosas de frijol en Cuba. Ed. Científico-Técnica. La Habana, p. 152.
41. Goodfellow, M y Williams, S. T. (1983). Ecology of Actinomycetes. *Ann. Rev. Microbial.* 37:189-216.
42. Gopalakrishnan, S., Humayun, P., Kiran, B., Kannan, I., Vidya, M., Deepthi, K., and Rupela, O. (2011). Evaluation of bacteria isolated from rice rhizosphere for biological control of charcoal rot of sorghum caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27:1313-1321.
43. Hall, R. (1991). Compendium of Bean Disease. *American Phytopat. Society*. St. Paul. Maine. USA.
44. Hamdi, Y. A. (1985). La fijación del nitrógeno en la explotación de los suelos. Boletín de suelos de la FAO. 49. ONUFAO, 188 p.
45. Harikrishnan, H., Shanmugaiah, V., Balasubramanian, N., Sharma, M. P., Kotchoni, S. O. (2014). Antagonistic potential of native strain *Streptomyces aurantiogriseus* VSMGT1014 against sheath blight of rice disease. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30:3149–3161.
46. Hernández, A., Heydrich, M., Acebo, Y., Velazquez, M. G., Hernández, A. N. (2008). Antagonistic activity of Cuban native rhizobacteria against

Fusarium verticilloides (Sacc.) Nirenb. in maize (*Zea mays* L.). *Applied Soil Ecology* 39: 180–186.

47. Hernández, A., Pérez, J. M., Bosch, D., Rivero, N. (2015). Clasificación de los Suelos de Cuba. Edición. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Cuba, 93 p.
48. Hernández, D. (2005). Uso de la bacterización en el control de los contaminantes fungosos en la micropropagación de *Musa* spp., Trabajo de diploma. Universidad Central de las Villas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.
49. Herrera, L. y Camara, H. (1988). Bioecología y Metodología de la lucha con hongos fitopatógenos suelo en Cuba. Universidad Central de las Villas. p.2.
50. Hong, T., Cheng, C., Huang, J. and Meng, M. (2002). Isolation and biochemical Characterization of an endo-1,3- β -glucanase from *Streptomyces sioyaensis* containing a C-terminal family 6 carbohydrate-binding module that binds to 1,3- β -glucan. *Microbiology* 148: 1151-1159.
51. Hoster, F., Schmitz, J.E., Daniel, R. (2005). Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66:434–442.
52. Index-Fungorum (2008). Disponible en: <http://www.indexfungorum.org/Index.htm>. (Consultado: 12 marzo 2018).
53. Kamara, V. and Gangwar, M. (2015). Antifungal Activity of Actinomycetes from Rhizospheric Soil of Medicinal plants against phytopathogenic fungi. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 4 (3): 182-187.
54. Kämpfer, P., Glaeser, S.P., Parkes, L., van Keulen, G., et al. (2014). The family Streptomycetaceae, in: DeLong, E.F., Lor, S., Stackebrandt, E.,

Thompson, F. (Eds.), The Prokaryotes. Actinobacteria, 4th edn., Springer, Berlin, 889–1010.

55. Kanini, G. S., Katsifas, E. A., Savvides, A. L., Karagouni, A. D. (2013). *Streptomyces rochei* ACTA1551, an indigenous Greek isolate studied as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *BioMed Res. Int.* 11.
56. Khamna, S., Yokaota, A., Peberdy, F. J., Aiumyong, S. (2009). Antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from rhizosphere of Thai medicinal plants. *Int. J. Integ. Biol.* 6:143147.
57. Kimm, D. S., Cook, R. J. and Weiller, D. M. (1997). *Bacillus* spp. (Lt-324-92), biological control of three root disease of wheat growth with reduced tillage. *Phytopatology* 87(5): 551-558.
58. Kishore, K., Pande, S. and Podile, A. R. (2005). Biological control of late leaf spot of peanut (*Arachis hypogaea*) with chitinolytic bacteria. *American Phytopathological Society* 95: 1157-1165.
59. Koneman, E. W. (2001). Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas a Color. *Médica Panamericana*, Buenos Aires, Argentina, p. 10-16 y 75-82.
60. Krishna–Prasad, S., Giovanardi, D. and Stefani. (2018). Plant Growth Promoting and Biocontrol Activity of *Streptomyces* spp. as Endophytes. *Int. J. Mo. Sci.* 19:952.
61. Kumar, A., Yandigeri, M. S., Vardhan, S., Sivakumar, G., Rangeshwaran, R. and Tripathi, C. P. M. (2013). *Streptomyces* sp. S160: a potential antagonist against chickpea charcoal root rot caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Ann Microbiol.* DOI 10.1007/s13213-013-0750-6.

62. Lacey, J. (1973). Actinomycetes in soils, compost and fodders in Actinomycetales: Characteristics and Practical Importance, G Sykes, FA Skinner (Eds) Academic Press, London. p. 231-251.
63. Lahdenpera, M. L., Simon, E. and Uoti, J. (1991). Mycostop a novel biofungicide based on *Streptomyces* bacteria. Elsevier, p. 258-263.
64. Lastres, L., Soza, F. (2009). Manual de Sanidad vegetal. Programa para la Agricultura Sostenible en Laderas de América Central. Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, Honduras. 75 p.
65. Lee, J. Y. and Hwang, B. K. (2002). Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Canadian J. Antibiot.* 48:407-417.
66. Leiva, S., Yáñez, M. y Zaror, L. (2004). Actividad Antimicrobiana de actinomicetes aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile. *Revista Médica de Chile* 132: 151-159.
67. Leveau, J. Y. y Bouix, M. (2000). Microbiología industrial: los microorganismos de interés industrial, Acribia.
68. Liu, H., Qin, S., Wang, Y., Li, W., Zhang, J. (2008). Insecticidal action of Quinomyci A from *Streptomyces* sp KN-0647, isolated from a forest soil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24:2243-8.
69. Maketon, M., Apisitsantikul, J., Siriraweeikul, C. (2008). Greenhouse evaluation of *Bacillus subtilis* AP-01 and *Trichoderma harzianum* AP-001 in controlling tobacco diseases. *Braz J. Microbiol.* 39:296–300.
70. Malleswari, D. (2014). *In vitro* antagonistic activity of diverse bacterial isolates against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 3(5): 755-763

71. Márquez, M., Martínez, M. y Franco, M. (2003). Aislamiento de *Trichoderma sp.* y actinomicetes a partir de suelos de clavel (*Dianthus caryophyllus*) y evaluación de su capacidad antagónica sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Revista Agronomía Colombiana* XIX (1-2): 81-88.
72. Martin, A. (1980). Introducción a la microbiología del suelo. Ciudad de México, p. 134-262.
73. Mayek, N., López, C., López, E., Cumpián, J. and Acosta, J. A. (2001). Resistencia a *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en frijol común en condiciones de campo en México. *Agrociencia* 35:649-661.
74. Mayek, N., López, E., Cumpián, J. and Acosta, J. A. (2004). Reacción de germoplasma de frijol común a *Macrophomina phaseolina* En condiciones de riego seco en Veracruz, Mexico. *Agronomía Mesoamericana* 15(1):46.
75. Meyer, S. L. F. and Roberts, D. P. (2002). Combinations of biocontrol agents for management of plant-parasitic nematodes and soilborne plant-pathogenic fungi. *Journal of Nematology* 34(1):1-8.
76. MINAG (2003). Estadísticas del Ministerio de la Agricultura, Republica de Cuba
77. MINAG (2007). Base de datos del Sistema de Inspección y Calificación de Semillas. Villa Clara.
78. MINAG. (2016). Listado oficial de variedades comerciales. Subdirección de certificación de semilla. CENSA. Cuba, 41 p.
79. Misk, A. and Franco, C. (2011). Biocontrol of chickpea root rot using endophytic actinobacterias. *Biocontrol* 56(5): 811-822.

80. Mora, F. (1996). Combate biológico de *R. solani* mediante el empleo de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli* en el campo. *Agronomía Mesoamericana* 7(2): 21-23.
81. Nawar, L. S. (2007). Pathological and rhizospherical studies on root-rot disease of squash in Saudi Arabia and its control. *Afri. J. Biotechno* 6 (3): 219-226.
82. Nel, A., Xia, T., Mädler, L. and Li, N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311 (5761):622-627.
83. Netzahualcayatl, M., López, E., Cumpiam, J y Acosta, J. A. (2004) Reacción de germoplasmas de frijol común a *Macrophomina phaseolina* en condiciones de riego –secano. *Agronomía Mesoamericana* 1(10):45-51.
84. Olaya, G. and Abawi, G. S. (1996). Effect of water potential on micelial growth and germination of *M. phaseolina*. *Plant Disease* 80(12):1347-1350.
85. ONEI (2014). Disponible en: <http://www.one.cu/publicaciones/08informacion/panoramateritorial2014/26%20Produccion%20frijol.pdf>.
86. Park, J. O., El-Tarabily, K. A., Ghisalberti, E. L. and Sivasithamparam, K. (2002). Pathogenesis of *Streptovercillium albireticuli* on *Caenorhabditis elegans* and its antagonism to soilborne fungal pathogens. *Applied Microbiology* 35: 361-365.
87. Peterson, C. A y Edgington., L. W. (1971). Transport of systemic fungicide, Bynomil in bean plant. *Phytopathology* 60(3): 475-478.
88. Prescott, L. M. (2002). Microbiology. McGraw-Hill. Boston, Massachusetts, USA., p. 524- 528.

89. Priya, M. R. (2012). Endophytic actinomycetes from Indian medicinal plants as antagonists to some phytopathogenic fungi. 1: 259. doi:10.4172/scientificreports.259.
90. Pujol, M., Badosa, E., Cabrefiga, J., Montesinos, E. (2005). Development of a strain-specific quantitative method for monitoring *Pseudomonas fluorescens* EPS62e, a novel biocontrol agent of fire blight. *FEMS Microbiol Lett.* 249(2):343-352.
91. Pupo, Elsie y Heredia, I. (1998). Lista de hongos asociados a la semilla. Boletín Técnico No. 1. IISV. Cuba, p. 47.
92. Quintero, F. E. (2002). Manejo agrotécnico del frijol en Cuba. Monografía. Facultad de Ciencias Agropecuarias, UCLV, Santa Clara, p. 28.
93. Raaijmakers, J. M., Paulitz, T. C., Steinberg, C., Alabouvette, C. and Moënne-Loccoz, Y. (2009). The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* 321:341–361. DOI 10.1007/s11104-008-9568-6.
94. Raupach, G. S. and Kloepper, J. W. (1998). Mixtures of plant growth promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology* 88:1158–1164.
95. Reddi, G. S. and Rao, A. S. (1971). Antagonism of soil actinomycetes to some soil-borne plant pathogenic fungi. *Indian Phytopathol.* 24:649–657
96. Rejane, M., Machaculeha, A., Martins, F. and Hungria, M. (2018). Polyphasic characterization of rhizobia microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) isolated in Mato Grosso do Sul, a hotspot of Brazilian biodiversity. *Symbiosis* <https://doi.org/10.1007/s13199-018-0543-6>.
97. Reyes Y. (2011). Aislamientos de *Trichoderma* spp. promisorios para el control biológico del tizón de la vaina (*Rhizoctonia solani* Kühn) en arroz.

Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Agraria de La Habana, La Habana, Cuba, 93p.

98. Rheims, H., Spróer, C., Rainey, F. A. and Stackebrandt, E. (1999). Molecular biological evidence for the occurrence of uncultured members of the Actinomycete line of descent in different environments and geographical locations. *Microbiology* 142: 2863-2870.
99. Roy, A., De R. K, Ghosh S. K. (2008). Diseases of bast fibre crops and their management in jute and allied fibres. In: Karmakar, P. G., Hazara, S. K., Subramanian, T. R., Mandal, R. K., Sinha, M. K., Sen, H. S (eds) Updates production technology. Central Research Institute for Jute and Allied Fibres, Barrckpore, p 327.
100. Sabatéa, D. C., Pérez, C., Petrosellic, G., Erra-Balsells, R. and Audisio, M. C. (2018). Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary on common bean by native lipopeptide-producer *Bacillus* strains. *Microbiological Research* 211:21–30.
101. Schoenian, I., Spiteller, M. M., Manoj, M. J. (2014). Chemical basis of the synergism and antagonism in microbial communities in the nests of leaf cutting ants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 3: 801-32.
102. Shrivastava, P., Kumar, R. and Yandigeri, M. S. (2015). *In vitro* biocontrol activity of halotolerant *Streptomyces aureofaciens* K20: A potent antagonist against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Saudi Journal of Biological Sciences* <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.12.004>
103. Seipke, F. R., Barke, J., and Brearley, C. (2011). A single *Streptomyces* symbiont makes multiple antifungals to support the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. *PLoS ONE* 6: 8

104. Seipke, F. R., Gruschow, S., Goss, R. J. and Hutchings, M. I. (2012). Isolating antifungals from fungus growing ant symbionts using a genome-guided chemistry approach. *Methods in Enzymol.* 517:47-70.
105. Sellem, I., Triki, M., Elleuch, L., Cheffi, M., Chakchouk, A., Smaoui, S., Mellouli, L. (2017). The use of newly isolated *Streptomyces* strain TN258 as potential biocontrol agent of potato tubers leak caused by *Pythium ultimum*. *Journal Basic Microbiol.* 9999: 1. DOI 10.1002/jobm.201600604.
106. Singh, C., Singh, R., Jadon, P. and Kumar, A. (2016). Characterization of actinomycetes against phytopathogenic fungi of *Glycine max.* (L.). *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 9 (1):216-219
107. Socorro, M. y Martín, D. (1989). Granos. Editorial Pueblo y Educación. La Habana, Cuba, p. 1-53.
108. Solans, M., Martin, J., Messuti, M. I., Vobis, G. and Wall, L. G. (2016). Potential biocontrol actinobacteria: Rhizospheric isolates from the Argentine Pampas lowlands legumes. *J. Basic Microbiol.* 56:1 –10.
109. Stefanova, M., Rodríguez, F., Almandoz, J., Pérez, L., Castellanos, L., Muiño, B. L., Villa, P., Gutiérrez, I. and Cordovez, M. (2001). Eficiencia de un nuevo fungicida biológico para el control de enfermedades en cultivos de importancia económica. Cuarto Seminario Científico Internacional de Sanidad vegetal. Segundo Congreso de la Sección Regional Neotropical de la Organización Internacional de Control Biológico. La Habana, p. 150.
110. Suryawanshi A. P., Mule V. P., Apet, K. T., Dey, U., Kuldhar, D. P (2015). Managing *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of sunflower (*Helianthus annus*) by soil amendment. *Indian Phytopathol.* 68:196–200.
111. Sylvia, D. M. (2005). Principles and applications of soil microbiology. New Jersey, USA edn., pp. 259-306.

112. Szczech, M y Shoda, M. (2004). Biocontrol of *Rhizoctonia* Damping-off of Tomato by *Bacillus subtilis* Combined with *Burkholderia cepacia*. *Journal of Phytopatholog*152(10):549-556.
113. Tate, R. L. (2000) Soil Microbiology. Wiley, New York, p. 47-56.
114. Tello, C. (1984). Enfermedades criptogámicas en hortalizas. INIA. 22, p.342.
115. Thilagavathi, R., Saravanakumar, D., Ragupathi, N. and Samiyappan, R. (2007). A combination of biocontrol agents improves the management of dry root rot (*Macrophomina phaseolina*) in greengram. *Phytopathol. Mediterr.* 46:157–167.
116. Tinatin, D., and Nurzat, T. (2006). Biodiversity of *Streptomyces* of high-mountainous ecosystems of Kyrgystan and its biotechnological potential. *Antonie Leeuwenhoek* 89:325-28.
117. ToKala, K., Strap, C., Jung, D., Crawford, L., Salove, L., Deobald, F., Baile, J. and Morra, J. (2002). Novel plant microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus*. WYEC 108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2161-2171.
118. Townsend, G. R. y Heuberger, J. W. (1943). Methods for stimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Disease Report*, 27(17), 340-343.
119. UNEX (2005). Lecciones hipertextuales de Botánica. Familia Fabaceae. Disponible en: <http://www.unex.es/botanica/LHB/rosidae/fabaceae.htm> (Consultado: 21 de abril de 2018).
120. Valois, D., Fayad, K., Barasubiye, T., Garon, M., Déry, C., Brzezinski, R., Singh, P. P., Shin, Y. C., Park, C. S. and Chung, Y. R. (1996). Biological

Control of *Fusarium* wilt of cucumber by Chitinolytic Bacteria. *Phytopathology* 89: 92-99.

121. Van Schoonhoven, A. y Pastor Corrales, M. (1987). Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol. CIAT. Colombia. 56 p.
122. Vijayabharathi, R., Sathya, A. and Gopalakrishnan, S. (2018). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Streptomyces griseoplanus* SAI-25 and its antifungal activity against *Macrophomina phaseolina*, the charcoal rot pathogen of sorghum. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.03.006>.
123. Villela, I. (2014). Screening of bacteria of the genus *Bacillus* for the control of the plantpathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. *Biocontrol Science and Technology*. DOI: 10.1080/09583157.2014.976178.
124. Viteri, D. M. and Linares, A. M. (2017). Reaction of *Phaseolus* spp. genotypes to ashy stem blight caused by *Macrophomina phaseolina*. *Euphytica* 213:199. DOI 10.1007/s10681-017-1989-y
125. Watanabe, T. (2002). Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi. Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species. (2^a Edition). Ed. CRC Press. 486p.
126. Whipps, J. M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J Exp Bot.* 52:487–511.
127. Wu, L., Shang, H., Wang, Q., Gu, H., Liu, G. and Yang, S. (2016). Isolation and characterization of antagonistic endophytes from *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl., and the biofertilizing potential of a novel *Pseudomonas saponiphila* strain. *Applied Soil Ecology* 105: 101-108.
128. Yadav, A., Yandigeri, M., Vardhan, S., Sivakumar, G., Rangeshwaran, R., and Tripathi, C.P.M. (2013). *Streptomyces* sp. S160: a potential antagonist

against chickpea charcoal root rot caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Ann. Microbiol.* 64:1113-1122.

129. Zaim, S., Amine-Bekkar, A. and Belabid, L. (2018). Efficacy of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum* combination on chickpea Fusarium wilt caused by *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. <https://doi.org/10.1080/03235408.2018.1447896>.