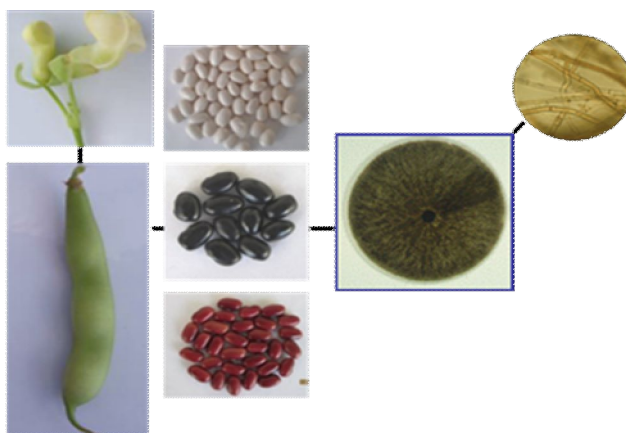


UNIVERSIDAD CENTRAL “MARTA ABREU” DE LAS VILLAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
Departamento de Agronomía



**Tesis presentada en opción al Título Académico de Máster en Agricultura
Sostenible Mención “Sanidad Vegetal”**

**Bases para el manejo integrado de hongos fitopatógenos del
suelo en el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)**



Aspirante. Lic. Miriam Ramírez López

Tutor. Dr. C. Manuel Díaz Castellanos

MSc. Rafael Sosa Martínez

Santa Clara, 2014

Pensamiento

En la ciencia no existen calzadas reales, y quien aspire a remontar sus luminosas cumbres; ha de estar dispuesto a escalar la montaña por senderos escabrosos.

Karl Marx.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor el Dr. C. Manuel Díaz Castellanos por dejarme ser parte de su investigación doctoral y poder aprender tantas cosas en mi vida profesional.

A mi hija, por ser mi mayor inspiración y por su amor infinito y a Arnaldo Dávila por su apoyo y cariño.

Al mi gran amigo Cupul por su incondicional apoyo y brindarme sus conocimientos, ayudarme en todo lo que me hizo falta.

A Rafael Sosa, por apoyarme en toda la parte bioquímica de mi tesis.

Al Dr Horacio Grillo por ayudarme con los cortes del tejido en las testas del frijol.

AL Dr Sinecio por darme un tiempito más, al Dr Lyscay por brindarme sus conocimientos

A todos los profesores de mi Departamento que me han dado ánimo para terminar la investigación, en especial Florentino con sus consejos ,Mallelyn, Maroto ,Ana María ,Enma ,Dianella, Daimi, a todos en general.

A Héctor Pablo por darme su mano cuando la necesite, a Ray ,Yaquelin, Yordany ,Amhed, Nury por sus consejos.

A Novisel ,Felipe, trabajadores del IBP por brindarme su apoyo:

A Duby por estar siempre ahí y por brindarme un tiempo más de máquina.

A todos mis familiares y amigos, que de una u otra forma contribuyeron a la realización del presente trabajo.

A todos, GRACIAS!!!

DEDICATORIA

*A Dios por darme la hija que tengo, mi amiga, mi consejera, mi ángel
de la guarda, la estrella que me ilumina.
Por ser la razón principal de mi existencia
Y por todas las innumerables razones que me hacen amarla.
A ella,*

*A toda mi familia:
Por ser mi todo.... Porque siempre están ahí para darme fuerzas para
seguir adelante*

A Dávila por su compañía y ayuda.

GRACIAS!!!

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
2 REVISION BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	4
2.2. Cultivares	4
2.3. Microorganismos patógenos del suelo	4
2.4. Hongos	5
2.4.1. <i>Rhizoctonia solani</i> Kühn.	5
2.4.2. <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc.	7
2.4.3. <i>Macrophomina phaseolina</i> (Tassi.) Goid.	8
2.5. Métodos de lucha	10
2.5.1. Control cultural	10
2.5.2. Control químico	11
2.5.3. Solarización	12
2.5.4. Control biológico	12
2.5.5. Control con sustancias naturales y metabolitos secundarios	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1. Determinación del efecto de la composición química de testas y raíces de frijol común en la incidencia de hongos fitopatógenos del suelo.	18
3.1.1 Tamizaje fitoquímico de extractos de testas de semillas y raíces de variedades de frijol común	19
3.1.2 Cuantificación de compuestos fenólicos en extractos acuosos obtenidos de testas de variedades de frijol común	20
3.1.3 Cuantificación de flavonoides totales de la testa de semillas de variedades de frijol común	20
3.1.4 Determinación del efecto <i>in vitro</i> de extractos acuosos de testas y raíces de variedades de frijol común, sobre el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos	21
Método del Antibiograma	21

3.2 Determinación del efecto <i>in vitro</i> de bacterias antagonistas, sobre el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos del suelo.....	23
3.3 Evaluación <i>in vivo</i> , del efecto del tratamiento a la semilla con bacterias antagonistas, sobre la incidencia de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos del suelo, en frijol común.....	24
3.4 Procesamiento estadístico de los datos.....	26
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4.1 Determinación del efecto de la composición química de testas y raíces de frijol común en la incidencia de hongos fitopatógenos del suelo.	28
4.1.1 Tamizaje fitoquímico de extractos de testas de semillas y raíces de variedades de frijol común.....	28
4.1.2 Cuantificación de compuestos fenólicos en extractos acuosos obtenidos de testas de variedades de frijol común	30
4.1.3 Cuantificación de flavonoides totales de la testa de semillas de variedades de frijol común.....	33
4.1.4 Determinación del efecto <i>in vitro</i> de extractos acuosos de testas y raíces de variedades de frijol común, sobre el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos	34
4.2 Determinación del efecto <i>in vitro</i> de bacterias antagonistas, sobre el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos del suelo.....	43
4.3 Evaluación <i>in vivo</i> , del efecto del tratamiento a la semilla con bacterias antagonistas, sobre la incidencia de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos del suelo, en frijol común.....	45
4.3.1 Efecto de la aplicación de bacterias antagónicas frente a hongos fitopatógenos del suelo sobre indicadores morfosiológicos en plantas de <i>P.vulgaris</i>	47
CONCLUSIONES	55
RECOMENDACIONES	56
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar el efecto de la testa de semillas de *Phaseolus vulgaris* L., y bacterias antagonistas, sobre *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* y *Sclerotium rolfsii*, se determinó la composición química de extractos acuosos obtenidos de testas de variedades comerciales, mediante tamizaje fitoquímico, y se cuantificaron los contenidos de fenoles y flavonoides totales. Se evaluó el efecto *in vitro* de extractos acuosos de testas y raíces de frijol común sobre el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos del suelo, y el efecto *in vitro* e *in vivo* de bacterias antagonistas sobre el crecimiento micelial de los hongos estudiados, y en la reducción de la mortalidad de plantas, en condiciones semicontroladas, respectivamente. Se encontraron compuestos fenólicos, lo que estuvo relacionado con el color de la testa de la semilla. Se encontraron diferencias significativas entre los extractos de la testa de las variedades, en cuanto al contenido de fenoles totales, con menores valores para el extracto de testa blanca. El contenido de flavonoides totales, fue superior en el cultivar de testa roja, mientras que en el de testa blanca no se detectó la presencia de estos compuestos. Mediante la cromatografía de exclusión molecular las fracciones obtenidas no mostraron inhibición frente a los hongos fitopatógenos, a diferencias del extracto acuoso puro. Las bacterias antagonistas inhibieron *in vitro* el crecimiento micelial de las especies fitopatógenas estudiadas, e *in vivo* *Macrophomina phaseolina* y *Rhizoctonia solani* fueron las que presentaron mejor porcentaje de inhibición en cuanto a la reducción de plantas afectadas en la variedad BAT-482, y T-93 respectivamente además todas las bacterias estimularon el crecimiento de la parte foliar y radicular de las variedades estudiadas.

Palabras clave: bacterias antagonistas, extractos acuosos, hongos fitopatógenos del suelo, *Phaseolus vulgaris*.

ABSTRACT

In order to evaluate the effect of the testa of seeds of *Phaseolus vulgaris* L., and antagonistic bacteria on *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* and *Sclerotium rolfsii*, the chemical composition of aqueous extracts from seed coats of commercial varieties was determined by phytochemical screening , and the contents of total phenols and flavonoids were quantified. The in vitro effect of aqueous extracts of seed coats and roots of common bean on mycelial growth of plant pathogenic soil fungi was evaluated, and the in vitro and in vivo antagonistic bacteria on the mycelial growth of the fungi studied effect and the reduction in mortality of plants under controlled conditions, respectively. Phenolic compounds were found, which was associated with the color of the seed coat. Significant differences between the extracts of the seed coat varieties, in the content of total phenols, with lower values for white head extract were found. The total flavonoid content was higher in the red head cultivar, while the white head of the presence of these compounds were not detected. By size exclusion chromatography fractions obtained showed inhibition against phytopathogenic fungi, a pure aqueous extract differences. The in vitro antagonistic bacteria inhibited mycelial growth of phytopathogenic species studied, and in vivo *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* and were the best presented as percent inhibition of the reduction in affected plants variety BAT-482, and T-93 respectively besides all bacteria stimulated the growth of leaf and root of the varieties studied.

Keywords: antagonistic bacteria, aqueous extracts, plant pathogenic soil fungi, *Phaseolus vulgaris*.

1. INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es ampliamente consumido en todo el mundo. El frijol se considera como la segunda fuente de proteína en África oriental y meridional, y la cuarta en América, es especialmente importante en la nutrición de las mujeres y los niños (Romero-Arenas *et al.*, 2013). Además, contienen abundante fibra dietética, carbohidratos multifacéticos, vitaminas y minerales (Hayat *et al.*, 2012).

Estadísticas de la FAO proporcionan información sobre el estado económico de los frijoles (géneros *Phaseolus* y *Vigna*) en todo el mundo. La producción total de granos secos en el mundo fue de 23,14 millones de toneladas (MT). La producción de frijol es más del doble que la de garbanzos, que es la segunda de las leguminosas de grano más importante. En Cuba la producción del frijol en 2012 fue de 135 000 toneladas (FAO, 2013).

En nuestro país, el rendimiento de este cultivo es bajo debido principalmente al ataque de plagas y enfermedades, esto ha ocasionado un aumento en el número de aplicaciones de plaguicidas e incremento de los costos de producción de este cultivo (Velcheva *et al.* 2005).

Entre los organismos causantes, se encuentran los hongos del suelo, existiendo en el país, condiciones favorables para el desarrollo de los mismos. Se destacan entre las especies más importantes *Rhizoctonia* spp., *Sclerotium rolfsii* Sacc. y *Macrophomina phaseolina* Tassi (Goid.), los que pueden ocasionar pérdidas en el rendimiento del cultivo del orden del 90 % en América Latina (CIAT, 1988) y entre 25 y 50 % en Cuba (González, 1988).

Dentro de las enfermedades causadas por hongos del suelo *Rhizoctonia solani* es el organismo patógeno de mayor importancia ya que está presente en la mayoría de los suelos agrícolas y por otra parte causa pérdidas de plantas superiores a un 25%. (Herrera, 1988) y su incidencia en los campos comerciales de frijol oscila alrededor del 7 % siendo mayor en las siembras tempranas (Díaz, 1999).

Para el control de estos microorganismos se han empleado métodos que incluyen el control cultural, resistencia varietal, control químico, solarización, control biológico, entre

otros. Estos métodos tienen sus inconvenientes específicos, por lo que las tendencias actuales se inclinan por un manejo integrado de los mismos (Folch *et al.*, 1997).

Entre los microorganismos que se usan para este fin se encuentran las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB según sus siglas en inglés), las cuales aportan beneficios a las plantas y al ecosistema (Lugtenberg B *et al.*, 2009). Se ha demostrado de forma independiente sus potencialidades como control biológico de patógenos (Hu QP, *et al.*, 2008).

Numerosos estudios se han desarrollado en nuestro país sobre la bioecología y control de especies de hongos fitopatógenos que habitan en el suelo (Martín, 2001; Herrera, 2004). Sin embargo, en la actualidad estas enfermedades constituyen una causa importante de bajos rendimientos en los cultivos, por lo que se hace necesario ampliar los estudios y utilizar e incluir alternativas que reduzcan las pérdidas y contribuyan a la sostenibilidad de nuestras producciones agropecuarias.

El color de la testa de las semillas se relacionan con su contenido de determinados compuestos fenólicos (taninos, flavonoides, flavonoles, antocianinas, entre otros) (Calatayud, 2010). Los compuestos fenólicos, son constituyentes de las células vegetales y otros se inducen y liberan como respuesta a factores bióticos y abióticos (Winkel-Shirley, 2002).

Conocer la composición química de la testa de semillas y raíces de frijol común y determinar su efecto sobre microorganismos del suelo, podría contribuir al conocimiento de estas interacciones y al desarrollo de bioinoculantes más efectivos.

Teniendo en cuenta las pérdidas ocasionadas por estos organismos, se hace necesario determinar caracteres químicos de las variedades asociados a la resistencia, así como alternativas de control que contribuyan al establecimiento de una estrategia de lucha para reducir sus afectaciones y elevar los rendimientos agrícolas del cultivo, con menores impactos negativos al agroecosistema.

Para darle solución al problema anterior, se enuncia la siguiente hipótesis:

Hipótesis

La determinación de compuestos con propiedades antifúngicas, en testas de semillas ,y raíces de frijol común; así como el empleo de bacterias antagonistas en el tratamiento a la

semilla, aportarán elementos para la lucha integrada contra hongos fitopatógenos del suelo, en el cultivo.

Objetivo general

Evaluar el efecto de la testa de la semilla, y raíces de frijol común, y el tratamiento a las semillas con bacterias antagonistas, sobre los hongos fitopatógenos del suelo.

Objetivos específicos:

1. Determinar el efecto de la composición química de testas y raíces de frijol común sobre el crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos del suelo.
2. Determinar el efecto *in vitro* de bacterias antagonistas, sobre el crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos del suelo.
3. Evaluar *in vivo*, el efecto del tratamiento a la semilla con bacterias antagonistas, sobre la incidencia de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos del suelo, en frijol común.

2. REVISION BIBLIOGRÁFICA

2.1. Frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es un cultivo de gran importancia económica que se encuentra distribuido a nivel mundial. Tiene alto valor nutritivo para el consumo humano y amplia aceptación, a la vez se considera un componente indispensable de la dieta en Centroamérica y Suramérica (Ulloa *et al.*, 2011).

En Cuba, existe una gran tradición de consumo de frijol y se produce en varias regiones de país, sin embargo, la producción en el período marcado desde el 2000 y hasta el 2010 estuvo entre 43 800 y 79 200 t (ONE, 2011), lo cual ha conllevado a elevadas suma en importaciones. Por estas razones se están instrumentando en el país estrategias que permitan el incremento de sus producciones.

2.2. Cultivares

En los sistemas de producción del mundo en general, y de Cuba en particular, existe un problema, la baja diversidad de variedades dentro de las especies cultivadas. El caso específico del frijol común, aunque se dispone de un grupo bastante amplio de variedades comerciales a nivel de país, 34 según la lista oficial de variedades comerciales del Ministerio de Agricultura, (MINAGRI, 2010), el acceso de los productores, principalmente aquellos pertenecientes a organizaciones productivas de mayor tamaño como las Cooperativas de Producción Agropecuaria (CPA), Unidades Básicas de Producción Cooperativa (UBPC), y Granjas Estatales, que tienen una alta dependencia del sector formal de Semillas, por diversos motivos, es limitado. El rendimiento histórico del frijol se encuentra por debajo de la media nacional, y no cuenta con una amplia diversidad de cultivares, siendo Japonés y Bat-304, los que se cultivan, este último a mayor escala por presentar mejor adaptación a las condiciones del territorio (García, 2009).

2.3. Microorganismos patógenos del suelo

En muchos lugares donde se cultiva el frijol, las enfermedades son el factor más importante en la reducción de los rendimientos (Opio y Senguoba, 1991), encontrándose entre los organismos causantes los hongos del suelo.

La incidencia y daño ocasionado varían significativamente entre estaciones y entre localidades, por lo que es imposible obtener información para clasificarlas en orden de prioridad. Entre las enfermedades fúngicas más importantes del cultivo se reportan la roya

(*Uromyces phaseoli* var. *typica* Arthur), la antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum* Sacc. & Magnus), (*Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk) y las pudriciones radicales probocadas por (*Rhizoctonia solani* Kühn, *Fusarium* spp. *Sclerotium rolfsii* Sacc. (*Athelia rolfsii* (Curzi) C.C. Tu & Kimbr.) y *Thielaviosis bassicola* (Berk y Br.) Ferr. causantes de pérdidas que pueden alcanzar el ciento por ciento de las pérdidas en el cultivo (CIAT, 1988).

Mayea *et al.* (1983) destacaron entre las principales enfermedades del frijol en Cuba al tizón común (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith)), Antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*), la Roya (*Uromyces phaseoli typica.*), Mancha angular (*Isariopsis griseola* Sacc.), Tizón ceniciento del tallo (*Macrophomina phaseolina* Tassi. (Goid.)), la Pudrición del tallo (*Rhizoctonia solani*) y la marchitez por *Sclerotium*.

Estudios realizados en la región central del país por Martin (2001) abordaron aspectos bioecológicos y de control de *S. rolfsii*, especie fitopatógena presente en numerosos cultivos de la región y en diferentes suelos. Investigaciones realizadas por Herrera (2004), estudio aspectos sobre la bioecología y control de especies de los géneros *Ceratocystis* Ellis & Halst, *Fusarium* Link 1809, *Macrophomina* Petr., *Rhizoctonia* DC, *Sclerotium* Tode y *Thanatephorus*.

En la actualidad las pudriciones radicales continúan entre las enfermedades que ocasionan pérdidas considerables en el cultivo, destacándose entre los agentes causales: *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*. y *Macrophomina phaseolina*, los cuales pueden ocasionar pérdidas en el rendimiento entre un 25 y un 50% (González, 1988).

2.4. Hongos

2.4.1. *Rhizoctonia solani* Kühn.

Este hongo se clasifica dentro de la Clase Deuteromycetes u hongos imperfectos, Orden Mycelia Sterilia. En su etapa perfecta se corresponde con *Thanatephorus cucumeris* (A. B. Frank) Donk, Familia Ceratobasidiaceae, Orden Cantharellales, Clase Agaricomycetes, División Basidiomycota, perteneciente al Reino Fungi (Index Fungorum, 2008).

Rhizoctonia solani es el agente causal de la rizoctoniosis, también conocida en muchos lugares como chancro del cuello, tallo hueco, *damping off* (marchitez de las posturas), pudriciones del tallo y órganos subterráneos, en numerosas plantas cultivadas y silvestres,

con una amplia distribución mundial, afectando a las plántulas jóvenes y el tejido de las plantas adultas. Por lo general dentro de las parcelas pueden observarse fácilmente, pequeños parches donde han muerto las plantas (González, 1988).

Mayea *et al.* (1983) señalan que en plantas pequeñas, aparecen en el tallo e hipocotilo úlceras de color pardo-rojizo, de varios tamaños, delimitadas usualmente por un borde oscuro, las que luego se vuelven ásperas, se secan y destruyen la médula (González, 1988).

Según Pichardo (1990) y Nerey (2009) los aislados de *R. solani* difieren en patogenicidad y morfología, así como en características culturales y fisiológicas, lo que evidencia que no es una especie única, sino una colección de poblaciones o Grupo de Anastomosis (AG) en el cual se agrupan organismos de la misma especie que pueden entrecruzar sus hifas entre sí.

González (2008a) señala que *R. solani* es la especie más estudiada dentro del complejo *Rhizoctonia*. Se encuentra dividida en 14 grupos de anastomosis (AG) que se subdividen en grupos según caracteres morfológicos, bioquímicos y moleculares.

Este hongo, según Pupo y Heredia (1998) se transmite, además, por las semillas infectadas y la penetración en el hospedante es directa, formando agregados hifales (cojines de infección) en las raíces, que más tarde ocasionan la decoloración y muerte de las mismas (Según Finch y Finch, 1987).

Cuando la hifa de *Rhizoctonia* se pone en contacto con la superficie externa del hospedante se produce un fenómeno de reconocimiento que origina un aumento de la ramificación micelial y formación de estructuras de infección. Esto ocurre preferentemente en suelos húmedos. Según Llacer (1996) los propágulos de esta especie son orientados por los exudados radicales de sus hospedantes.

Según Mayea y Padrón (1983) una parte de su ciclo lo pasa saprofiticamente sobre las partículas orgánicas del suelo o formando micorrizas, hasta que por determinados factores se vuelve perjudicial para los semilleros provocando pudriciones y otros trastornos. Herrera (2004) señala que la actividad saprofítica de *R. solani* permanece inalterable durante los primeros 6 meses de establecerse en el suelo, mientras que a partir de este período la supervivencia decrece a 25 cm de profundidad hasta un 60% y a 15 cm a 90%,

manteniéndose el 100% en la superficie del suelo, lo que evidencia que la actividad saprofítica del patógeno disminuye a medida que aumenta la profundidad.

El efecto de la temperatura ha sido muy estudiado Allison (1952) y Sherwood (1969) encontraron que el rango óptimo de temperatura es de 25 a 30 C°. En cuanto al pH se ha reportado que el género *Rhizoctonia* presenta un crecimiento limitado a valores que oscilan entre 2,3 y 3,8 y que el valor óptimo varía de 4,5 a 7, estando los límites máximos entre 6,7 y 9.

2.4.2. *Sclerotium rolfsii* Sacc.

Desde que en 1892, Rolfs reportó y describió por primera vez en el sur de la Florida a *Sclerotium rolfsii* Sacc. causando la enfermedad conocida como Tizón del Sur, en el cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum* L.), muchos estudios se han desarrollado sobre esta importante especie por el gran número de problemas que ha ocasionado en numerosos cultivos.

El hongo se clasifica dentro de la Clase *Deuteromycetes*, Orden *Mycelia Sterilia*. Presenta como teleomorfo un basidiomiceto denominado primeramente *Corticium rolfsii* Curzi., después *Pellicularia rolfsii* (Curzi.) West. y actualmente conocida como *Athelia rolfsii* (Curzi.) (Domsch *et al.*, 1980), Familia *Atheliaceae*, Orden *Atheliales*, Subclase *Agaricomycetidae*, Clase *Agaricomycetes*, División *Basidiomycota*, Reino *Fungi* (Indexfungorum, 2008).

En cuanto a los hospederos Díaz y Castro (2005) plantean que este hongo afecta a más de 200 géneros de plantas. Arnold (1986) reporta entre las principales especies hospedantes del organismo patógeno a *Ipomoea batatas* (L.) Lam., *Solanum tuberosum* L., *Phaseolus vulgaris* L. y *Helianthus annuus* L., entre otras.

El hongo ataca las posturas en los semilleros durante la germinación de las semillas o posteriormente, causando lesiones en la base de los hipocotilos de las plántulas, caracterizada por hundimiento, ablandamiento y decoloración de la corteza, justamente en la línea del suelo, donde aparece una mancha oscura en la base del tallo. Los síntomas de la parte aérea son: clorosis, lenta defoliación y marchitez permanente.

En las partes subterráneas la infección también progresa y causa separación de la corteza de los tejidos de la raíz (González, 1988). Sobre los tallos afectados se forma una capa de

micelio extramatricial, dentro del cual se forman los esclerocios del hongo, de tamaño pequeño, 859 μm los redondos y 852-976 μm los ovoides, inicialmente blancos y posteriormente pardo oscuros (Mayea y Padrón, 1983).

Sclerotium presenta micelio compuesto por hifas tabicadas y finas, de paredes delgadas que se integran en cordones (González, 1988). El organismo puede transmitirse por semilla (Pupo y Heredia, 1998), así como mediante esclerocios y micelio transportado por semillas agámicas de diferentes cultivos, suelo, restos de cosecha, implementos agrícolas, y por el hombre mismo (González, 1988). Según Beaute y Rodríguez-Kabana (1981) los esclerocios pueden sobrevivir en el suelo de 2 a 5 años, lo cual dificulta las prácticas de rotación de cultivo para su control. La alta humedad y temperatura mayor de 20 °C disminuyen su supervivencia. Con relación al efecto de la temperatura Herrera (2004) destaca que para *S. rolfsii* coinciden las temperaturas para el crecimiento del micelio con las de la infección (28-34 grados). El efecto del pH ha sido estudiado por numerosos autores, Punja (1985) reportó que *S. rolfsii* crece mejor en pH en el rango de 2 a 7, siendo el óptimo entre 4 a 5. Urquijo *et al.* (1971) encontraron que *S. rolfsii* crece mejor en suelos ácidos y Herrera (2004) no encontró formación de esclerocios a pH entre 7 y 8.

Otro factor ambiental importante en el desarrollo y patogenicidad de *S. rolfsii* es la humedad del suelo. Según Herrera (2004) el micelio de patógeno en condiciones de alta humedad reduce su viabilidad a partir de los 7 días. Estos resultados coinciden con los encontrados por Beaute y Rodríguez-Kabana (1981) quienes observaron que el micelio desapareció rápidamente en presencia de alta humedad.

En suelo seco la supervivencia del micelio fue de 100% hasta los 35 días, disminuyendo a un 80% a los 49 días, evidenciándose una caída de la supervivencia debido a las fuertes precipitaciones. La tendencia de germinación de los esclerocios durante los 49 días de sobresaturación del suelo estuvo entre 60-80 % hasta los 35 días, disminuyendo hasta cero Herrera, (2004); Beute y Rodríguez-Kabana, (1981).

2.4.3. *Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid.

Este organismo es considerado, según Hall (1991), un gran 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.

El hongo se ubica taxonómicamente en la Familia *Botryosphaeriaceae*, Orden *Botryosphaeriales*, Clase *Dothideomycetes*, División *Ascomycota*, Reino *Fungi*. (Index Fungorum, 2008).

M. phaseolina presenta una fase esclerocial (Micelia Sterilia) *Rhizoctonia bataticola* (Taub.) Buttler., la cual consiste en micelio y microesclerocios (esclerocios negros) de forma esférica e irregular, los cuales se desarrollan con facilidad en medios de cultivo. En la naturaleza se forma sólo en algunos hospederos y en ciertas condiciones. Las picnidiosporas son ovaladas, hialinas, sin septas (Díaz, 1999).

El hongo ataca la raíz y el tallo de las especies hospedantes mediante las picnidiosporas y microesclerocios que sobreviven en el suelo y constituyen el inóculo primario mostrando persistencia en el suelo de 3 meses a 7 años. La penetración al tejido se produce directamente mediante apresorios y lo invade extra e intracelularmente, produciendo enzimas pectinolíticas y toxinas de importancia para la patogénesis. Las plantas de frijol son atacadas en todos los estados. En semilleros produce damping off pre y post-emergente con una reducción del vigor de las plantas. El hongo causa clorosis, defoliación prematura, maduración temprana, achaparramiento y muerte de la planta (Olaya y Abawi, 1993). Frecuentemente afecta los hipocotilos y produce manchas oscuras hundidas. Los cotiledones de las semillas portadoras de la enfermedad aparecen manchados de color pardo oscuro a pardo violáceo, en las hojas y tallos de las plantas adultas se puede observar necrosis acompañada de las fructificaciones del hongo (Tarakanta *et al.*, 2005).

Souza *et al.* (1980) plantean que *M. phaseolina* es el hongo más frecuente en el cultivo del frijol, con una reducción acentuada de la germinación causando la muerte de hasta el 70% de las plántulas. Las infecciones pueden provenir de semillas infectadas (Pupo y Heredia, 1998).

Olaya y Abawi (1996) señalan que altas temperaturas y estrés hídrico incrementan la susceptibilidad del hospedero y reducen la actividad de los antagonistas del hongo.

Banerje *et al.* (1985) señalan que la alta humedad estimula la acción lítica del micelio. La población decrece a 85% a una humedad de saturación después de 180 días. No obstante Dhingra (1985) plantea que a 60% de humedad la población se reduce de 99-96%, siendo estimulada la producción de esclerocios con la baja humedad de suelo. La presencia de

residuos de cultivo permite la colonización y sobrevivencia del patógeno hasta 70% de humedad.

2.5. Métodos de lucha

Los métodos de lucha contra las enfermedades provocadas por hongos del suelo se distinguen de los empleados contra otros organismos patógenos foliares por la integración de prácticas culturales como el enmendado del suelo con materia orgánica, la rotación de cultivos, el control químico, el control biológico y el manejo del riego, entre otros factores a tener en cuenta para el control de las mismas.

2.5.1. Control cultural

2.5.1.1. Enmiendas orgánicas

Se ha demostrado que la mayor influencia de la materia orgánica (MO) sobre los patógenos radicales es a través de modificaciones de las actividades microbianas. El control de éstos se produce por inacción o lisis de los esclerocios o hifas, directamente o seguido de un corto período de estimulación del crecimiento. La adición de microorganismos mejora el vigor de las plantas e incrementa la resistencia de las mismas al ataque de organismos patógenos (Lampkin, 1999)

Morales *et al.* (2007) encontraron una reducción de la enfermedad causada por *S. rolfii* cuando emplearon estiércol líquido de cerdos. Estos autores explican este efecto a través del incremento de la actividad microbiana, la cual posee una elevada concentración de amonio, además de Zinc y Cobre en el suelo, coincidiendo con Blum y Rodríguez-Kábana (2004) al emplear enmiendas con *Mucuna deeringiana*, *Pueraria lobata*, y corteza de *Pinus* sp. en el control de *S. rolfii* en el suelo.

2.5.1.2. Rotación de cultivos

Rosado *et al.* (1987) plantean que la resistencia a *R. solani* depende del manejo dado al agrosistema y destacan a la rotación de cultivos como una técnica que garantiza una menor incidencia de hongos en el suelo. Estos autores encontraron que la rotación maíz-frijol redujo notablemente las pérdidas producidas por organismos patógenos del suelo. Reportándose por Hagan (1983) la rotación de cultivos con el maní, para disminuir las afectaciones de *S. rofsii*, como maíz, sorgo, algodón. Además investigaciones realizadas por Zeidan (1986) reportan que la integración de la cebolla dentro de los esquemas de

rotación de maní y frijol, provocó una significativa reducción del porcentaje de plantas afectadas entre un 25 y 30 %.

Además en estudios realizados sobre sistemas de rotación, Hernández (1996) encontró que en rotaciones cuyo cultivo fundamental es el frijol, se cuantificaron densidades de esclerocios por kg de suelo significativamente superiores que aquellos donde se cultivó papa.

Para *M. phaseolina* Bhattacharyta y Malhotra (1979) reportaron en la India, que la incidencia se redujo en el cultivo de la papa cuando fue precedida por *Crotalaria juncea*. Singh *et al.* (1996) señalaron que el manejo de enfermedades mediante sistemas de rotación de cultivos puede ser un método más práctico, al intercalar cultivos no compatibles con los principales patógenos; señalando que el ciclo de dichos cultivos es de vital importancia para implementar medidas de manejo.

2.5.1.3. Labores agrotécnicas

Entre las labores agrotécnicas que pueden emplearse efectivamente para el combate de hongos del suelo se encuentran la aradura profunda fundamentalmente en el cultivo de la zanahoria donde se disminuyó la densidad del inóculo de *S. rolfsii* en un 50% (Gurkins y Jenkins, 1985).

Tanaka *et al.* (1993) señalaron como un método para controlar *S. rolfsii* la reducción de la viabilidad de los esclerocios con el anegamiento de los suelos provocado por la disminución de O₂, producción de sustancias antifúngicas (ácidos orgánicos) y el incremento de organismos competitivos en el suelo.

2.5.1.4. Resistencia varietal

Mora y Blumm (1990) plantean que debido al alto rango de hospederos, se ha complicado el trabajo de los fitomejoradores en la búsqueda de resistencia genética a hongos del suelo, lo que coincide con Singh *et al.* (1996) respecto a *M. phaseolina* para la cual muestra cierta susceptibilidad el cultivo de frijol en dependencia de las variedades.

2.5.2. Control químico

Los intentos de control químico de hongos del suelo han sido infructuosos debido a la poca persistencia de los productos en el suelo, la existencia de un alto número de hospedantes, la rápida proliferación de patógenos, así como abundante producción de

esclerocios, los cuales persisten en el suelo por varios años. Sharma y Sohi (1981) redujeron completamente las afectaciones por *R. solani* con el uso de Benomil, Carbendazim y Tridemorfe en tratamientos a la semilla, sin embargo Pozo (1988) obtuvo buenos resultados empleando Benotiazol, Thiram, y Carboxin+Thiram en tratamientos a la semilla en la variedad de frijol Carioca en el control de enfermedades radicales. Por otra parte Acimovic *et al.* (1982) reportan al Benomil como el fungicida más efectivo en el control de *M. phaseolina*. En Cuba, González y Pupo (1985) destacan buenos resultados con Benomil, Captan, Captan + Benomil y Benmil + TMTD. Martín (2001) obtuvo buenos resultados con el empleo in vitro de Difeconazol 25% (Score), Tebuconazol 25% (Folicur), Propiconazol 25% (Tilt) y Tebuconazol+Triadimenol triademol, en el control de *S. rofsii*. Palavan (2001) utilizó el fungicida Difluoromethylornithine (DFMO) el cual inhibió el crecimiento micelial de *Macrophomina phaseolina*. Resultados positivos in vitro obtuvo Folgueras (2010) con el empleo del TMTD, aunque autores como Partridge (2007) plantea que en la actualidad no existen fungicidas eficientes para el control de hongos del suelo como *M. phaseolina* en condiciones de producción siendo lo más apropiado el manejo agrotécnico del cultivo.

2.5.3. Solarización

La solarización es otro de los métodos utilizados con un gran potencial para el control de organismos patógenos del suelo, aplicado por primera vez por los israelíes a mediados de la década de los setenta con resultados positivos informados por Esqueda-Valle y Zenteno-Zevada (1991) en el control de *R. solani* y Mihail y Alcorn (1984) en el control de *S. rofsii*. Según estos autores, el método es inefectivo contra *M. phaseolina*.

En Cuba, González *et al.* (2002a, b) lograron reducir la supervivencia de *R. solani* con el empleo de un cobertor plástico.

2.5.4. Control biológico

2.5.4.1. Bacterias estimuladoras del crecimiento e inhibidoras de patógenos fúngicos

El cobre es uno de los elementos que ha dado mejores resultados en el control de enfermedades de origen bacteriano. Sin embargo, éstos no han sido muy eficaces cuando se presentan condiciones ambientales favorables para el desarrollo y diseminación de

estos microorganismos; a ello se suma la aparición de cepas bacterianas resistentes. En la búsqueda de alternativas más efectivas, dirigidas al control con *Bacillus subtilis* han sido señaladas por varios autores ya que el género *Bacillus* presenta el mayor número de especies conocidas con propiedades insecticidas, entre las que destaca *B. thuringiensis*. Las nuevas tendencias de manejo han sido inducidas dada la aparición sistemática de resistencia a los antibióticos usados, los que ha generado la búsqueda de una nueva gama productos alternativos, y el uso de los tradicionales en la agricultura (Fundación para la Innovación Agraria, (2011).

Según García (2012) existen numerosas evidencias en la literatura que indican que la utilización de bacterias promotoras del crecimiento vegetal puede tener un rol significativo en la sustentabilidad de los agroecosistemas (Reed y Glick, 2004; Antoun y Prevost, 2006).

Las bacterias del grupo de *Pseudomonas fluorescens* y las del género *Bacillus* son consideradas las más eficaces para controlar enfermedades foliares y de las raíces.

Estos MO mostraron la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos del suelo, tales como *Fusarium oxysporium*, *F. S. lycopersici*, *Pythium aphanidermatum*, *R. solani*, *S. rolfsii*, *Phytophthora nicotianae*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium solani*. Castellanos *et al.* (1995) en evaluaciones realizadas con *B. subtilis* para el control de *Alternaria porri* en plantas de cebolla, alternando aplicaciones del producto biológico con las de los fungicidas zineb y oxiclورو de cobre, evidenciándose que aquellos tratamientos que consistían en la combinación de fungicidas sintéticos y biológicos mostraron mejor control que el resto de los tratamientos.

En Estados Unidos hay registrados comercialmente varias especies de microorganismos para el control de patógenos del suelo. Estos incluyen dos hongos (*Gliocladium virens* y *Trichoderma harzianum*), tres bacterias gram negativas (*Agrobacterium agrobacter* K-84, *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia* tipo Wisconsin) y dos bacterias del género *Bacillus* (*Bacillus subtilis* GB 03 y *B. subtilis* MB 1600). Actualmente, se comercializan a gran escala productos a base de *B. subtilis* siendo los Estados Unidos los líderes en este campo. En 1994, estos productos se aplicaron en 2 millones de ha en ese país. En 1997 Alemania aprobó la comercialización de productos con *B. subtilis* como

ingrediente activo. Se han realizado muchas investigaciones sobre el uso de los componentes activos presentes en el caldo de cultivo.

2.5.4.2. *Bacillus subtilis*

Dada la diversidad genética en el género *Bacillus*, tanto en el suelo como en la rizosfera, se considera a estos microorganismos como colonizadores eficaces. Las potencialidades del género *Bacillus* sobre *P. fluorescens* han sido señaladas por quienes encontraron mayor emergencia y control de patógenos del trigo cuando utilizaron este género.

Estas bacterias se han evaluado para el control de enfermedades fungosas, determinándose que aplicaciones con *Bacillus subtilis* pre y poscosecha en el cultivo del aguacate (*Persea americana*) tienen un efecto similar al de los fungicidas comerciales (Korsten *et al.*, 1997). En investigaciones futuras deberán evaluarse el modo de acción de *B. subtilis*, como habitante natural del filoplanio del árbol de aguacate.

Recientemente, formulados desarrollados de *B. subtilis* para controlar la pudrición radical del frijol, se determinó que fue el más eficaz en condiciones de laboratorio. No obstante, en condiciones de campo la formulación a base de pectina fue la que logró mejor control (Lazarete *et al.*, 1994).

El efecto de *Bacillus* sp. sobre la germinación y el desarrollo de semillas de tomate infectadas con *Fusarium oxysporium* var *cubensis* (Brada *et al.*, 1995); también se realizaron pruebas *in vitro* con *Pseudomonas* sp. y *B. subtilis* aislados de plátano y arroz, respectivamente (Torres *et al.*, 2001).

Uno de los usos de *B. subtilis* como agente de control biológico es mediante el tratamiento de semillas. Su efecto benéfico cuando se aplica junto a las semillas o en forma individual no se debe exclusivamente al antagonismo con los patógenos sino que influye positivamente en la germinación, desarrollo y rendimiento del cultivo debido a la producción de sustancias promotoras del crecimiento y al mejoramiento de la nutrición de las plantas.

Con respecto a *B. subtilis*, se ha estudiado la liberación de compuestos con propiedades antifúngicas como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las Iturinas. Estas últimas son polipéptidos que actúan sobre la pared celular de los hongos donde se observó

vacuolización y deformación de las hifas de *R. Solani* y *P. ultimum* provocadas por la formación de un compuesto volátil con propiedades antifúngicas.

En cuanto al control de patógenos mediante antagonismos o competencia muchas bacterias, en particular las pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, son capaces de controlar patógenos, sobre todo hongos, sintetizando moléculas antifúngicas. Así mismo, existen cepas bacterianas capaces de sintetizar sustancias contra otras bacterias, los antibióticos (Whipps, 2001)

2.5.4.3. *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacea*

En papa se ha informado el efecto antagónico, de biopreparados a partir de cepas de *Pseudomonas*, contra *Phytophthora infestans*. En plantas ornamentales, también se ha corroborado el efecto benéfico de los mismos Cortés, (1999). Meyer *et al.*, (1995) informaron la actividad antagónica de sideróforos producidos por cepas de *B. vietnamiensis* y *B. cepacia* contra varios hongos fitopatógenos, tales como *Rhizoctonia*, *Helminthosporium*, *Fusarium* y *Pithium*

Asimismo, Maurhofer *et al.*, 1992 demostró que la cepa CHAO de *P. fluorescens* controlaba varias enfermedades en plantas mediante la producción de Pyoluteorin y 2,4 diacetylfloroglucinol, ejemplo *Pythium aphanidermatum* en pepino. Por otro lado, se ha demostrado que cepas de *B. cepacia* controlan el ataque de *Fusarium* al maíz y plantas ornamentales (Hebbar *et al*, 1992; 1998)

Por otro lado se ha demostrado el efecto bioestimulador de este biopreparado sobre otros parámetros fisiológico del cultivo como es el caso de la altura Hernández 1995, al inocular plantas de maíz con biopreparados a base de cepa de *Pseudomonas*. Pazos (2000) encontró incrementos en los parámetros al tratar plantas de arroz con cepas nativas de *Azospirillum brasilense*.

Con el reciente análisis de secuencias del RNAr 16S se han definido la taxonomía de muchas especies bacterianas y como resultado, el género *Pseudomonas* incluyen algunas cepas clasificadas anteriormente dentro de las *Chryseomonas* y *Flavimonas*. Otras cepas clasificadas previamente en el género *Pseudomonas*, ahora son agrupadas en los géneros *Burkholderia* y *Ralstonia*.

Debido a que el control químico de patógenos es costoso y el control cultural difícil de aplicar, además del encarecimiento de variedades resistentes, surge la alternativa del control biológico como una posible solución para la reducción de las enfermedades.

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 (Punja, 1985; Papavizas, 1989) y Stephanova, (2007); Folgueras (2010 y Reyes (2011) en Cuba.

Otros microorganismos han sido reportados como antagonistas de hongos del suelo, entre los que se encuentran *Bacillus subtilis* (Ehrenberg.) como antagonistas de *S. rolfii* (Kimm *et al.* 1997); *Pseudomonas fluorescens* (Trevisan.) Migula, como antagonista de *R. solani*, *S. rolfii* y *M. phaseolina* (Thara, 1994), *Pseudomonas cepacia* y *Bacillus cereus*, como antagonistas de *R. solani*. (Echávez *et al.*, 1997) y *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli* como antagonista de *R. solani* (Mora, 1996).

Bocourt *et al.* (2009) en una prospección de hongos del suelo con potencialidades para el control biológico en agroecosistema cubanos informaron, en un suelo Ferralítico Rojo con *Nicotiana tabacum*, *Arachis hypogea* y *Sorghum bicolor*, nueve especies con potencialidades para el control biológico, entre las que citan a: *Aspergillus candidus* Link. antagonista de *Sclerotium cepivorum* y *M. phaseolina*; *Clonostachys rosa* (Link) Schoers, Samuel, Seyfery WW. Gams. antagonista de *R. solani* y *Fusarium solani*, y *Paecilomyces lilacinus* (Thorne) Samsan, biocontrolador de *M. phaseolina* y *S. cepivorum*.

Por otra parte Cuervo *et al.* (1998) destacan que las micorrizas vesico arbusculares (MVA) *Glomus fasciculatum* (Thaxt.) Gerd. & Trappe y *G. mosseae*, solas o en combinación, disminuyeron el ataque de *R. solani* y *Fusarium oxysporum* E.F. Sm. & Swingle.

Pseudomonas fluorescens se encuentra dentro del grupo de las bacterias Gram negativas, no entéricas, aerobias, en forma de bacilos rectos o ligeramente curvos, son no fermentadores y móviles, que pertenecen a las glico-proteobacterias (Galli *et al.*, 1992). Son comunes habitantes de la tierra, el agua y la filósfera pero predominantes en la rizosfera de plantas, debido a la exudación de ácidos orgánicos, azúcares y aminoácidos (Lugtenberg y Dekkers, 1999). *Pseudomonas* fluorescentes son el grupo más prometedor de las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas

(PGPR) que participan en el biocontrol de enfermedades ocasionadas por fitopatógenos (Rodríguez y Martín, 2009).

2.5.5. Control con sustancias naturales y metabolitos secundarios

Como una forma de explorar nuestros recursos vegetales y animales en la búsqueda de compuestos bioactivos, que representen una alternativa en el control de organismos fitopatógenos se ha profundizado en el estudio de las plantas aromáticas y muchos constituyentes de aceites esenciales, debido a su actividad biológica, entre las que se destacan propiedades antimicrobianas, antioxidantes y antimutagénicas.

Begum *et al.* (2004) reportaron actividad antifúngica de un compuesto orgánico aislado a partir del extracto de rizoma de *Acorus calamus* contra *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn y *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl.

Resultados positivos encontraron Pirajno *et al.* (2004) con aceites esenciales de *Laurus nobilis*, *Mentha piperita* y *Ruta graveolaens* contra *R. solani* y *Sclerotinia sclerotiorum*.

Vaillant *et al.* (2008) al evaluar el efecto inhibitorio de cinco monoterpenos sobre un aislado de *R. solani* en papa: timol, alcanfor, citronelal (*Cymbopogon nardus* L.) y 1,8 cineol encontrados en aceites esenciales. (Zamora-Natera *et al.*, 2005) en estudios realizados en México, encontraron actividad antifúngica *in vitro* del extracto crudo de semilla de *Lupinus exaltatus* contra *S. Rolfsii* y *A. solani* (Ellis & G. Martin) L.R. Jones & Grout, *R. solani* y *F. oxysporum*. Resultados similares fueron obtenidos por Bernal-Alcocer *et al.* (2005) y Puente (2007) encontrando efecto antifúngico *in vitro* de extractos acuosos de *Bixa orellana* L., *Euphorbia lactea* Haw., *Petiveria aliaceae* L., *Phyla strigulosa* Mart y Gal. y *Wedelia trilobata* Hitchc. frente a *R. solani* y *S. rolfsii*. En condiciones de campo, Robaina *et al.* (2008) encontraron, con el empleo del extracto de *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc aplicado a la semilla, efecto fúngico sobre *S. rolfsii*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en la Facultad de Ciencias Agropecuarias (FCA) de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas (UCLV), Santa Clara, Villa Clara, Cuba; en el período comprendido entre septiembre del 2010 y mayo del 2013.

Material vegetal utilizado en el experimento

Se emplearon semillas de tres variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), registradas en el Listado oficial de variedades comerciales (MINAGRI, 2009) (Tabla 1), procedentes del Banco de semillas del Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP) de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, con 20 días de cosechadas

Tabla 1. Variedades de frijol común utilizadas en la investigación.

Variedades	Color de la testa
Delicias 364	Rojo
Bat 482	Blanco
Tomeguín 93	Negro

3.1. Determinación del efecto de la composición química de testas y raíces de frijol común en la incidencia de hongos fitopatógenos del suelo.

Preparación de los extractos acuosos de testas de *P.vulgaris*.

Las testas fueron separadas de los cotiledones con el empleo de un bisturí. Se tomó 1 g del material seco, triturado y tamizado (diámetro aproximadamente 5mm) de cada variedad, y se le adicionaron 20 mL de agua destilada y desionizada. Luego se llevaron a un proceso de maceración durante 24 horas en la oscuridad, y sometidos, posteriormente, a un proceso de filtrado con el empleo de una membrana miliporo de 0,2µm para eliminar diferentes microorganismos, utilizándose posteriormente estos extractos en las pruebas biológicas *in vitro*.

Preparación del extracto acuoso con raíces de *P. vulgaris*.

Las raíces fueron tomadas a partir de las variedades utilizadas en el experimento, empleándose la técnica descrita por Prattley *et al.* (1997). Se seleccionaron plantas de 20 días de sembradas en un sustrato con Zeolita. Tabla 2, el cual fue esterilizado previamente en una autoclave (Raypa) a 121°C durante 1 hora.

Tabla 2. Composición química de la Zeolita empleada en el experimento

Material	SiO ₂	AlO ₃	F ₂ O ₃	FeO	MgO	CaO	K ₂ O
Zeolita	57.06	11.91	4.09	1.33	1.45	9.35	1.89

Con el objetivo de lograr un mayor número de raíces por plantas se humedeció el sustrato para extraer la raíz lo más completa posible, posteriormente se lavaron para eliminar todos los residuos del sustrato y fueron secadas al sol durante 72h eliminando la humedad, seguidamente se colocaron en una estufa (Memmert Made in Germany) a una temperatura de 60°C. Una vez secadas las muestras se molinarón mecánicamente, hasta obtener partículas de 0,5 mm de diámetro, en una balanza analítica (Explorer[®] Pro) se peso 1 g del material obtenido agregándole 10ml de agua destilada estéril hasta obtener una disolución la cual es filtrada por una membrana miliporo de 0,2µm para eliminar diferentes microorganismos, utilizándose posteriormente estos extractos en la pruebas biológicas *in vitro*.

3.1.1 Tamizaje fitoquímico de extractos de testas de semillas y raíces de variedades de frijol común

Con el objetivo de determinar la composición química de la testa y raíces de variedades de frijol común, se realizó un tamizaje fitoquímico a los extractos acuosos, para lo cual se siguieron los procedimientos referidos en la Norma Ramal de Salud Pública 311/98.

Extractos acuosos en testas y raíces del frijol

- Ensayo de Espuma (Saponinas).
- Ensayo de Fehling (Carbohidratos reductores)

- Ensayo de Shinoda (Flavonoides).
- Ensayo de Dragendorff y Mayer (Alcaloides).
- Ensayo de cloruro férrico (Fenoles y/o taninos)

Los análisis se realizaron por triplicado. Para la descripción del resultado de los ensayos, se utilizó el sistema de cruces para especificar la presencia o ausencia de los metabolitos, en los tratamientos.

3.1.2 Cuantificación de compuestos fenólicos en extractos acuosos obtenidos de testas de variedades de frijol común

La determinación de fenoles totales se realizó según el método descrito por Tuberoso *et al.* (2009), con algunas modificaciones. A 1 mL de cada extracto vegetal se adicionó 80 μ L de Folin-Cioalteau 1N, se dejó reposar durante 5 min y se adicionaron 800 μ L de Na₂CO₃ al 7%, se completó hasta 2 mL con agua destilada, se mezcló empleando vórtex y se incubó durante 90 min a una temperatura de 23 °C. Finalmente, se realizó la lectura a 750 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Rayleigh 1601, China). El contenido de fenoles totales de cada extracto se expresó en mg de ácido gálico/ mL de extracto, mediante extrapolación en una curva de calibración empleando como patrón ácido gálico a diferentes concentraciones. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.1.3 Cuantificación de flavonoides totales de la testa de semillas de variedades de frijol común

La cuantificación del contenido de flavonoides totales se realizó empleando el método NaNO₂ - AlCl₃, descrito por Liu y Zhu (2007), con modificaciones. Se separó la testa de la semilla de cada cultivar con ayuda de una cuchilla afilada.

Se pesó 1g de testa para cada variedad y se agregó en 10 mL de agua desionizada durante 72 h. Posteriormente, se tomó un 1mL de extracto de la testa al cual se le adicionó 60 ml de NaNO₂ al 5% (m/v), y se mezcló durante 5min, seguidamente se añadieron 60 mL de AlCl₃ 5% (m/v), se mezcló y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 6 min. Posteriormente, se adicionaron 400 mL de 1M NaOH, se dejó reposar durante 10 min y se

realizó la lectura espectrofotométrica a 415 nm antes de 30min en un Espectrofotómetro RAILEYGH UV-1601 (República Popular China).

El contenido de flavonoides totales se determinó por extrapolación en una curva de calibración empleando como patrón Quercetina (Sigma-Aldrich (Steinhaus, Alemania) a diferentes concentraciones y se expresó en mg de Quercetina/g de masa fresca. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.1.4 Determinación del efecto *in vitro* de extractos acuosos de testas y raíces de variedades de frijol común, sobre el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos

Método del Antibiograma

El efecto *in vitro* de los extractos acuosos, obtenidos de la testa y raíces de variedades del frijol común sobre el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* (AG4 HGI), *Macrophomina phaseolina* (CCIBP Mp2) y *Sclerotium rolfsii* (CCIBP-Scl 8) se determinó mediante el método del antibiograma.

Para la realización de las pruebas biológicas, los extractos se filtraron a través de membranas miliporos de acetato de celulosa, de 0,2 µm de diámetro MINISART® (Sartorius), para la eliminación de bacterias y/o esporas de hongos causantes de contaminación. En el centro de la placas Petri, de 9 cm de diámetro que contenían PDA (Biocen), se colocó un disco de 10 mm de diámetro con micelio de cada especie fitopatógena. En los extremos se colocaron 4 discos de papel de filtro Whatman® de 5 mm de diámetro, previamente impregnados con 15µl de los extractos estudiados. Las placas fueron incubadas a 28±2 °C. Los controles consistieron en placas con discos impregnados con agua estéril. Se emplearon 4 placas por especie fitopatógena. La determinación de la zona de inhibición fue realizada a los 7 días posteriores.

Las evaluaciones se realizaron cada 24 horas hasta las 72 horas. Para determinar el halo de inhibición se evaluó a las 72h y para calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (**PICR**) se utilizó la fórmula propuesta por Samaniego *et al.* (1989).

PICR=R1-R2/R1*100 donde:

R1. Crecimiento radial de la colonia del patógeno ante el control con agua destilada

R2. Crecimiento radial del patógeno ante el tratamiento

3.1.4.1 Determinación del efecto *in vitro* de fracciones de extractos acuosos de testas de frijol común, sobre el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos

Fraccionamiento del extracto por cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel Sephadex G-10

Para determinar los metabolitos secundarios con efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial de *R. solani*, *M. phaseolina* y *S. rolfsii* presente en los extractos acuosos de testas de frijol, se realizó un fraccionamiento de los mismos para posteriormente probar la acción inhibitoria de cada una de las fracciones sobre el crecimiento micelial y determinar cuál o cuáles fracciones poseían tal efecto. Se utilizó la cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel Sephadex G-10, para la cual se preparó una columna de Sephadex G-10 (Amersham Pharmacia Biotech, Upsala Sweden) que presenta un diámetro de 16 mm y tiene una altura de 40 cm con tamaño de partícula de 40-120 μm . Tiene una resolución capaz de separar compuestos cuya masa molar se encuentre por debajo de 700 g mol⁻¹. En esta cromatografía se utilizó como eluyente agua destilada y desionizada para eliminar posibles interacciones iónicas del tipo inespecífico con moléculas de la muestra (Gel filtración, 1997). El volumen de muestra de extracto acuoso de testa utilizado para la columna fue de 0,15 mL. La fase móvil fue agua destilada y desionizada y el flujo fue de 1 mL min⁻¹. Este tipo de cromatografía permite separar los componentes de una mezcla acuosa en función de sus dimensiones moleculares, aunque también pueden intervenir otras interacciones como la absorción sobre la matriz. Los mecanismos de separación de las moléculas en la muestra pueden conducir a cambios conformacionales, disociación de moléculas, etc., (Gel filtración, 1997). Por esta razón utilizamos como eluyente agua desionizada para equilibrar el lecho, en lugar de un buffer que modificara la fuerza iónica, ya que se desconoce cuál sería la naturaleza del compuesto a obtener y además, permite obtener rangos de fracciones por debajo de 700 g mol⁻¹ de masa molar, lo que aporta criterios de si la actividad se encuentra entre las macromoléculas o no.

Para los registros se utilizó el espectrofotómetro ultravioleta visible (RAILEYGH UV-1601) El seguimiento de la cromatografía se realizó a una longitud de onda de 254 nm, a la cual se absorben determinados compuestos, como alcaloides, flavonoides y fenoles (Gel filtración, 1997, Kim *et al.*, 2003)

Para reducir el número de fracciones y hacer factible el ensayo biológico se unieron las mismas en función de las absorbancia y tiempos de retención en la columna; este proceso se repitió tres veces quedando listas para comprobar su efecto biológico sobre los hongos en estudio.

3.1.4.2 Actividad antifúngica de la mezcla de fracciones de extractos acuosos de testa de variedades de frijol común, sobre el crecimiento micelial *in vitro* de hongos fitopatógenos del suelo

Se tomaron tubos de ensayos (20x2, 5cm), contentivos con 15 mL de las correspondientes mezclas de fracciones esterilizadas por filtración (membranas mili poro de acetato de celulosa (0,2 μ m de poro) las cuales se homogenizaron manualmente. Posteriormente a cada placa de Petri (9cm) con medio de cultivo Agar-Dextrosa-Saboraud se le sembró en el centro un disco de 1cm de diámetro del hongo correspondiente a cada tratamiento y en los extremos se colocaron discos de papel de filtro estéril a los cuales se le añadió 15 μ L de las fracciones seleccionadas. La incubación se realizó a 28 ± 1 °C en la oscuridad por siete días. La evaluación consistió en medir el diámetro de la colonia del hongo fitopatógeno a las 72 horas. Se dio por terminado el experimento cuando los testigos cubrieron completamente las placas. El experimento se repitió dos veces con tres placas como réplica por hongo. Se calculó el PICR (porcentaje de inhibición del crecimiento radial) según lo propuesto por Samaniego *et al.* (1989).

3.2 Determinación del efecto *in vitro* de *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *B. cepacia* y *P. fluorescens*, sobre el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos del suelo.

Método de Difusión en Agar

Con el objetivo de evaluar la actividad antagónica *in vitro* de las cepas bacterianas estudiadas frente a los hongos fitopatógenos del suelo, se utilizó el método de difusión en agar propuesto por Bauer *et al.* (1966). Las especies bacterianas se sembraron en placas de Petri (9cm) que contenían agar nutriente, para las cuatro bacterias, donde se colocaron discos de micelio (7mm) de los tres hongos fitopatógenos en un extremo de la placa y en el otro extremo se perforó el medio, donde se añadió 0,1mL de las suspensiones bacterianas,

que se incubaron a 28⁰C, realizando las evaluaciones a las 48 y 72 horas. La inhibición del crecimiento micelial se evaluó según lo propuesto por Samaniego *et al.* (1989). Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 4 repeticiones por tratamiento. El control consistió en placas que contenían cada hongo cada hongo cultivado sobre PDA (Biocen), sin tratamiento.

3.3 Evaluación *in vivo*, del tratamiento a la semilla con bacterias antagonistas, sobre indicadores morfosiológicos en plantas de *P.vulgaris*

Con el objetivo de determinar el porcentaje de plantas infectadas por hongos del suelo y algunos parámetros morfofisiológicos de las plantas descendientes de semillas tratadas con bacterias antagónicas, se realizó un experimento en condiciones semicontroladas, Se utilizó un diseño completamente aleatorio con 6 tratamientos y 5 replicas en el que se utilizó un suelo Pardo mullido medianamente lavado según la clasificación de Hernández *et al.*, 1999). el cual fue autoclaveado durante 1h a 121 °C en autoclave Raypa® (Tabla 3). Se utilizaron magentas con 400g de suelos estéril.

Preparación de las bacterias

Las bacterias se subcultivaron en tubos de ensayo con 5 mL de caldo nutriente, durante 48 h. Posteriormente se multiplicaron en un erlenmeyer con 100 mL de caldo nutriente y se colocaron en un agitador orbital Gerhardt durante 24h a 30⁰C, alcanzando la bacteria su máximo desarrollo. Seguidamente se inocularon en placas Petri conteniendo Agar nutriente y se incubaron durante 48h a 28±20 C⁰ en incubadora Memmert (Alemania). Se calculó la concentración de la cantidad de bacterias por semillas peletizadas mediante el empleo de la cámara de Neubauer, al microscopio óptico (Motic) (Tabla 3).

Tabla 3. Bacterias utilizadas en concentraciones (UFC/mL).

Bacterias	Concentración (UFC/mL)
<i>Burkholderia cepacia</i> CCIBP556W	4.9 x10 ⁹
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	5.0 x10 ⁹
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 7NSK2	7.1 x10 ⁹
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CMR12	8.0 x10 ⁹

Recubrimiento de las semillas

En el caso de las bacterias en estudio la semilla se recubrió según la metodología de Hamdi (1985) modificada por Cupull *et al.* (2003). Se inoculó con almidón de yuca al 8%, se recubrió la semilla con la zeolita ya cargada con las bacterias con la titulación antes referida.

Después de aislada la cepa se preparó el medio de cultivo con caldo nutriente para multiplicar las bacterias en erlenmeyer que contenían 100mL del medio de cultivo y tubos de ensayos que contenían 5mL del mismo medio para activar las bacterias, se esterilizó a 121⁰C por 20min, posteriormente se tomaron las bacterias y se transfirieron con asa bacteriana a los tubos de ensayos incubándose a 30⁰C por 48horas, después se inocularon a los erlenmeyer y se colocaron en una zaranda orbital (Gerhardt) a 30⁰C por 24horas (alcanzando la bacteria su máximo desarrollo).Cada 10 g de zeolita se añadieron 5 mL de suspensión bacteriana. La proporción de semilla/zeolita empleada fue de 7:1 (p/p).

Se cargó la zeolita con cada una de las bacterias en estudio, se colocaron al aire para su secado por 48horas, se recubrió las semillas, y se procedió a la siembra.

Multiplicación de los hongos fitopatógenos

Para el caso de la multiplicación de los hongos fitopatógenos del suelo en estudio se utilizaron 100 g de arroz con cáscara en 100 mL de agua destilada y se esterilizó a 121C^o durante 1h, posteriormente se inocularon con discos de los tres hongos de 1cm de diámetro y se incubaron a 28±2^oC por 10 días y después se inocularon al suelo a razón de un 2% (g de inóculo/magenta). Las especies fitopatógenas estudiadas fueron las mismas utilizadas en el acápite 3.2.

En cada magenta se sembraron cinco semillas, las cuales ya estaban peletizadas con las bacterias antagónicas y en el suelo el inóculo de los hongos fitopatógenos al 2%. La humedad del suelo fue mantenida a partir de la adición de 230 mL de agua por magentas. Se utilizaron seis tratamientos con cinco replicas a diferentes concentraciones (UFC/mL) (Tabla 4). Para los controles se sembraron semillas sin peletizar, y semillas que se habían sumergido en TMTD durante 10 min.

Tabla 4. Tratamientos evaluados en el experimento en condiciones.

Tratamientos	Concentración
^a <i>Burkholderia cepacia</i> CCIBP556W	4.9 x 10 ⁹ UFC/mL
^a <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	5.0 x 10 ⁹ UFC/mL
^a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 7NSK2	7.1 x 10 ⁹ UFC/mL
^a <i>Pseudomonas fluorescens</i> CMR12	8.0 x 10 ⁹ UFC/mL
^b Control estándar (TMTD 80% PH)	0.3%
Control absoluto (semillas sin tratar)	

^a Método de aplicación. Recubrimiento de la semilla

^b Thiram (tetrametil tiuran disulfuro). Método de aplicación: inmersión de las semillas por 10 minutos

Las evaluaciones se realizaron semanalmente, hasta los 21 días, y consistieron en la determinación del porcentaje de plantas afectadas, por tratamiento. Se evaluaron además, indicadores morfológicos de las plantas del frijol común como:

- Altura de la planta (cm). Se midió desde del cuello del tallo a la yema apical, con una regla milimetrada.
- Peso fresco de la raíz (g). Se cortaron a partir del cuello del tallo, se lavaron con agua para eliminar restos del suelo y después se pesaron en una balanza analítica.
- Peso fresco del follaje (g). Se utilizó toda la planta menos la raíz, y se pesó en una balanza analítica
- Peso seco de la raíz (g). Se cortaron las raíces ya lavadas, se secaron al sol, después se colocaron en la estufa a 60⁰C durante 48 horas, y se pesaron en una balanza analítica.
- Peso seco del follaje (g). Se colocó en una estufa a 60⁰C durante 48 horas, y el peso se determinó con una balanza analítica.

3.4 Procesamiento estadístico de los datos

Los resultados experimentales fueron sujetos a análisis de varianza (ANOVA) a través del paquete estadístico SPSS versión 16.0 .Para los tratamientos no homogéneos se utilizo la

prueba de Kruskal-Wallis en la comparación de medias de rango obtenidas por Kruskal-Wallis se aplicó el programa Statistix versión 1.0.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación del efecto de la composición química de testas y raíces de frijol común en la incidencia de hongos fitopatógenos del suelo.

4.1.1 Tamizaje fitoquímico de extractos de testas de semillas y raíces de variedades de frijol común

Mediante las técnicas empleadas fue posible determinar la presencia de compuestos químicos en la testa de las semillas de las tres variedades de frijol común en estudio (Figura 1).



Figura 1. Tamizaje fitoquímico de extractos acuosos de testa de semillas de tres variedades de *P. vulgaris*. A. Ensayo de espuma (saponinas) B. Ensayo de Shinoda (flavonoides) C. Ensayo de cloruro férrico (Fenoles y/o taninos)

Las variedades de frijol común estudiadas, Tomeguín 93, Delicias-364 y BAT-482, presentaron diferencias cualitativas en cuanto a la composición química de sus extractos acuosos. En BAT-482 (Testa blanca) no se detectó la presencia de Fenoles (Tabla 5).

Tabla 5. Tamizaje fitoquímico de extractos acuosos de la testa de tres variedades de *P. vulgaris*.

Metabolitos	<i>Tomeguín 93</i> (Testa negra)	<i>Delicias 364</i> (Testa roja)	<i>Bat 482</i> (Testa blanca)
Flavonoides	++	++	-
Fenoles y/o Taninos	+++	++	-
Alcaloides	+	+	-
Carbohidratos	+	+	-
Saponinas	-	+	-

Leyenda de los compuestos químicos: + presente, - ausente abundante:+++

Días y Caldas, (2010) refieren que los colores de la testa del frijol están determinados por la presencia o ausencia de fenoles, los que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y son elaborados principalmente por las plantas (Mandal *et al.*, 2010), así como flavonoides, antocianinas, taninos y flavanoles glicosídicos, destacando que los fenoles cumplen importantes funciones en las plantas, entre las que se encuentran formar parte de los mecanismos de defensa contra organismos patógenos, mediante la síntesis de fitoalexinas.

En la caracterización fitoquímica de los extractos de raíces de variedades de frijol común, se encontraron saponinas y alcaloides. No se detectó la presencia de compuestos fenólicos. Los extractos de raíces en las variedades de *P. vulgaris* estudiados (Tomeguín 93, Delicias-364 y BAT-482) presentaron diferencias cualitativas en cuanto a su composición química. En BAT-482 (Testa blanca) se encontraron altas concentraciones de saponina, no ocurriendo de igual forma para las variedades de testa negra y roja, donde existió una alta concentración de alcaloides (Tabla 6).

Tabla 6. Tamizaje fitoquímico de extractos acuosos de raíces de variedades de frijol común.

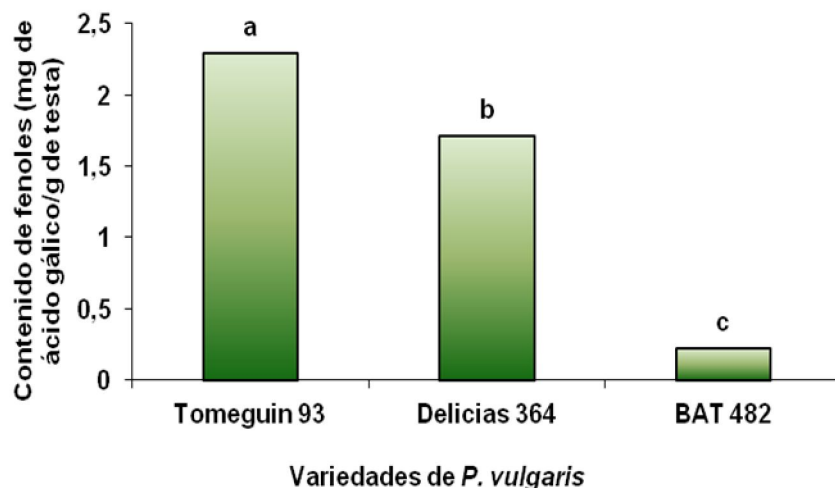
Metabolitos secundarios	Tomeguín 93 (Testa negra)	Delicias 364 (Testa roja)	Bat 482 (Testa blanca)
Flavonoides	-	-	-
Fenoles y/o Taninos	-	-	-
Alcaloides	++	++	-
Carbohidratos reductores	-	-	-
Saponinas	+	-	+++

Leyenda de los compuestos químicos: + presente, - ausente

Aguirre; y Piraneque, Nelson (2010). Demostraron que los exudados radicales contienen gran variedad de compuestos y moléculas orgánicas de alto y bajo peso, entre los que se encuentran las saponinas y los alcaloides, que proveen en forma directa fuentes de carbono y nitrógeno rápidamente asequibles para el crecimiento de los hongos del suelo, y que luego de mineralizados, sirven como nutrientes para aprovechamiento de los mismos vegetales

4.1.2 Cuantificación de compuestos fenólicos en extractos acuosos obtenidos de testas de variedades de frijol común

La cuantificación de compuestos fenólicos mostró diferencias estadísticas significativas entre las variedades en estudio. Los mayores contenidos de fenoles se encontraron en Tomeguin-93, de testa negra, seguida por Delicias 364, con diferencias significativas entre las mismas, y en menor cuantía BAT 482, de testa blanca (Figura 2).



Letras desiguales difieren según la prueba Tukey para $p < 0,05$

Figura 2. Cuantificación de fenoles en extractos acuosos de testas de tres variedades de frijol común, expresados en mgGAE/g testa.

Al respecto, Telek y Freytag (1985) aislaron e identificaron compuestos fenólicos de testas de frijol negro, rojo y blanco; sin embargo no encontraron cantidades apreciables de fenoles en la testa del frijol blanco. En Cuba, Pupo (2010) trabajó con extractos de plantas, e identificó varios flavonoides como: cirsimarina, pectolinarigenina, salvigenina, xanthomicrol, santoflavona, apigenina y genkuanina) que mostraron actividad contra *A. solani* y *A. porri*. Posteriormente, Hernández (2011) reportó la presencia de alcaloides, fenoles, taninos, flavonoides y saponinas en tejidos foliares de plantas de frijol común. Los tres primeros fueron encontrados en las variedades Ica Pijao (negra) y Bat 482 (blanca), mientras que la última sólo fue encontrada en la variedad Ica Pijao, la cual fue menos atacada por plagas insectiles.

Comportamiento de la curva de calibración para fenoles totales en variedades de *P. vulgaris* de testa negra y rojo.

Para la curva de calibración desarrollada el contenido de fenoles totales de cada extracto se expresó en mg de ácido gálico/g de testa a diferentes concentraciones con un coeficiente de correlación por encima de 0.99 lo que demuestra que existe una buena

relación entre las absorbancias obtenidas y la concentración del patrón en el intervalo de 5.5 – 7.5 mg/L (Figura 3).

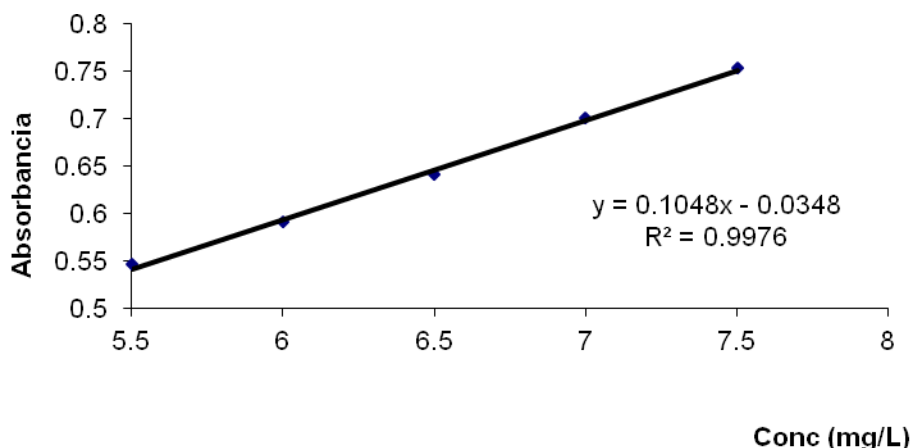


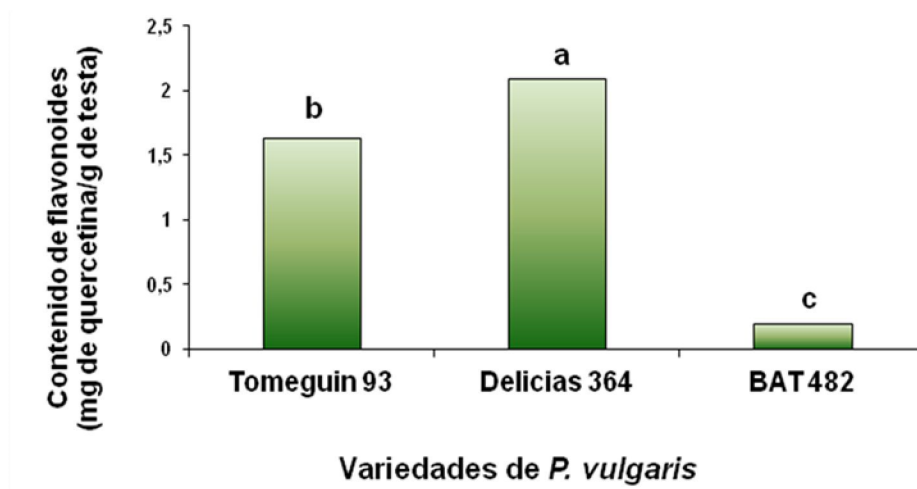
Figura 3. Curva de calibración para la cuantificación de fenoles totales

Estos resultados demuestran que los mayores contenidos de fenoles y a su vez de flavonoides en la testa, se encuentran en las variedades de frijol negro y rojo, por lo que sería adecuado seguir analizando con más detalle estos extractos en otras concentraciones, por las funciones importantes que tienen para las plantas y sus propiedades antioxidantes. Cabe señalar que la actividad antioxidante no está simplemente relacionada con los compuestos fenólicos totales determinados en los extractos, si no que pueden presentarse en otras partes de la planta. Se ha demostrado la existencia de estos compuestos en hojas de *T. catappa* (Espinosa, 2012), por lo que se debe de tener en cuenta la existencia de agliconas libres y su incorporación a la determinación, además el hecho de que pueden ocurrir interacciones entre los componentes del extracto. Por otra parte, ha sido demostrado el sinergismo de los flavonoides con tocoferoles, palmitato ascorbil y ácido cítrico (Rizner Ras, 2000).

La actividad antimicrobiana no está relacionada directamente con los compuestos fenólicos totales en los extractos porque existen también en los compuestos la interacción de agliconas libres, sinergismo de flavonoides con tocoferoles, palmitato ascorbil y ácido (Rizner *et al.* 2000).

4.1.3 Cuantificación de flavonoides totales de la testa de semillas de variedades de frijol común

La cuantificación de flavonoides mostró diferencias significativas entre las tres variedades de frijol común. Los mayores contenidos de flavonoides se encontraron en la variedad de testa roja, seguido por la de testa negra, con diferencias significativas entre ellas, y en menor cuantía, la variedad de testa blanca (Figura 4).



Letras desiguales difieren según la prueba Tukey para $p < 0,05$

Figura 4. Cuantificación de flavonoides en extractos acuosos de testas de semillas de variedades de frijol común expresados en mg de Quercetina/g testa.

Resultados similares fueron obtenidos por Gutiérrez (2012), en un análisis en tres variedades de frijol común (BAT-482, BAT-304, Delicias-364) donde el contenido de flavonoides totales en la testa de las semillas, fue significativamente superior en Delicias-364 (testa roja), mientras que en la testa de las semillas de BAT-482 (testa blanca) no se detectó la presencia de estos compuestos.

Comportamiento de la curva de calibración para flavonoides totales en concentraciones de testa de tres variedades de *P. vulgaris* L.

El contenido de flavonoides totales de cada extracto se expresó en mg/litros de Quercetina de testa a diferentes concentraciones con un coeficiente de correlación por

encima de 0.99 lo que demuestra que existe una buena relación entre las absorbancias obtenidas y la concentración del patrón en el intervalo de 10 – 80 mg/L (Figura 5). Se demuestra que la curva es lineal y cumple de modo apropiado con la Ley de Bouguer-Lambert-Beer, lo cual indica que se puede usar la absorbancia como magnitud adecuada para determinar, a partir de ella, la concentración de metabolitos presentes en las muestras.

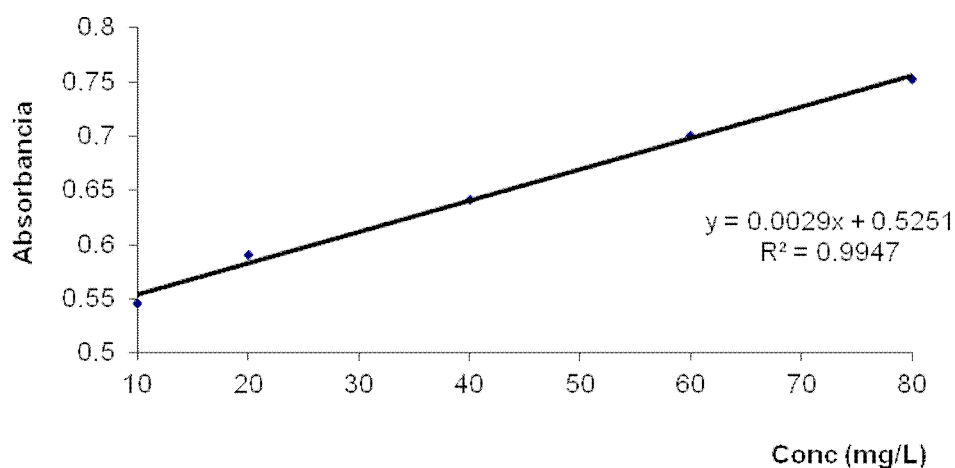


Figura 5. Curva de calibración para la cuantificación de flavonoides totales

Estos resultados corroboran lo expresado en la Figura 4, donde el contenido de Flavonoides se comportó en concentraciones medias, con diferencia cualitativas en cuanto a su composición química, demostrando valores menores que los obtenidos para el análisis de fenoles totales. Este comportamiento se encuentra dentro de lo esperado, ya que los flavonoides son un subgrupo de los compuestos fenólicos, muy relacionados con la resistencia a hongos patógenos del suelo.

4.1.4 Determinación del efecto *in vitro* de extractos acuosos de testas y raíces de variedades de frijol común, sobre el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos

Al analizar el efecto *in vitro* de los extractos acuosos de la testa de las semillas de las variedades en Tomeguín 93 se observó inhibición del crecimiento micelial en el orden del 51,75% en *R. solani* y del 51,41% en *M. phaseolina*. El extracto de testa de Delicia 364 mostró una inhibición del crecimiento micelial de un 50.07% para *R. solani* y de un 51,38%

para *M. phaseolina*, no comportándose de igual forma en *S. rolfsii*. Para los extractos de Tomeguín 93, Delicias 364 y BAT 482 no se observó inhibición del crecimiento micelial en *Sclerotium rolfsii*. Para los extractos de la testa blanca de la variedad variedad BAT 482 no inhibieron el crecimiento micelial de los hongos en estudio. (Tabla 7).

Tabla 7. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) por extractos acuosos de testas de semillas del frijol común.

Extracto	PICR (%)		
	<i>R.solani</i>	<i>M.phaseolina</i>	<i>S.rolfsii</i>
T-93	51.75a	51.41 a	0
D-364	50.07a	51.38 a	0
BAT-482	0.00 b	0.00 b	0
EE (±)	3.93	4.25	

Medias con letras desiguales en el sentido de las columnas difieren para $P < 0.05$ por la Prueba de Duncan

Estos resultados manifiestan la ausencia de sustancias bioactivas en la testa de las semillas, con efecto inhibitorio frente a estos hongos fitopatógenos. También se han realizado estudios que demuestran que esta incapacidad de inhibir el crecimiento de ésta cepas de hongos, se debe probablemente a la constitución de la pared celular del hongo, la cual es rígida, y cuya estructura macromolecular es la quitina (N-acetil-glucosamina unidas entre sí por enlaces β -1,4-glucosídicos) (Davis *et al.*, 1984).

Sánchez *et al.* (1992), Herrera (2004) y López (2005) reportaron que la susceptibilidad del frijol a *R. solani* estuvo asociada a la pigmentación de las semillas. En sus trabajos, las variedades rojas y blancas fueron las que mostraron un mayor grado de susceptibilidad.

Por su parte, Vidal (2002) y Mishra *et al.* (2010) destacaron que los fenoles cumplen importantes funciones en las plantas entre las que se encuentran, formar parte de los mecanismos de defensa contra organismos patógenos mediante la síntesis de fitoalexinas. Estas son mayoritariamente polifenoles, principalmente isoflavonoides, que constituyen

compuestos tóxicos para los microorganismos. Las fitoalexinas son responsables de la prevención de las infecciones, de la inhibición de enzimas producidas por los microorganismos patógenos que degradan las paredes celulares de las plantas, de la producción de lignina por las enzimas peroxidases, polímero que se localiza en las paredes celulares de las plantas dando resistencia al ataque de hongos y contribuyendo a la impermeabilización de la célula, de la inhibición de la formación de cutinasas, enzimas producidas por los organismos patógenos, además de la formación de sustratos de compuestos antifúngicos y la inducción de resistencia.

Por otro lado, Mayek-Pérez *et al.* (2002, 2004) y Beas *et al.* (2004) refirieron que los genotipos de frijol de testa negra mostraron mayor resistencia a *M. phaseolina* que los de testa roja, crema o jaspeada.

Según González (1988) la resistencia del frijol al ataque de hongos del suelo está asociada a la presencia de antocianinas en los hipocotilos. De acuerdo con sus estudios las variedades de testa negra tienen mayor contenido de antocianinas que las de testa roja y blanca.

Es de destacar el comportamiento de *S. rolfsii* frente a los tres extractos estudiados, los cuales no inhibieron el crecimiento micelial, lo que pudo estar dado además, por las condiciones de las altas temperaturas que influyeron de forma positiva en su desarrollo micelial, coincidiendo además con los parámetros de infección, los que están en el rango de 28-34 grados Celsius, el cual es fácil de diagnosticar por la presencia de abundantes esclerocios de color crema a pardo oscuro. Por su parte Herrera (2005) demostró que el micelio de *S. rolfsii* en condiciones de alta humedad y baja temperatura reduce su viabilidad, lo cual está dado por su composición de hifas tabicadas y finas, que se integran en cordones que puede variar de acuerdo con las condiciones de temperatura, humedad, pH y sustrato. De igual forma Lucas (1965) y Beute y Rodríguez-Kabana (1981) observaron que los micelios de este hongo desaparecieron rápidamente bajo estas condiciones.

Efecto *in vitro* de extractos acuosos de raíces de variedades de frijol común sobre el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos.

Al analizar el efecto *in vitro* de los extractos de raíces en las variedades BAT-482, Tomeguín 93 y Delicias 364, frente a los hongos fitopatógenos del suelo no se observó inhibición del crecimiento micelial (Fig 6).

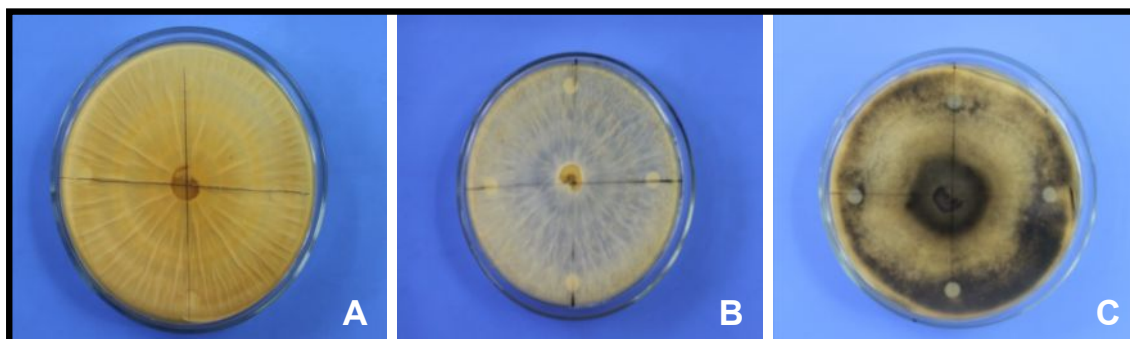


Fig 6. Efecto de extractos acuosos de raíces en variedades de frijol común sobre el crecimiento micelial *in vitro* de hongos fitopatógenos del suelo: A) *R. solani*, B) *S. rolfsii*, C) *M. phaseolina*.

Esto presupone la ausencia de sustancias bioactivas con efecto inhibitorio frente a estos hongos patógenos, pero pueden existir sustancias estimuladoras. Las raíces pueden producir metabólicos secundarios que son directamente exudados al ambiente, sin que los mismos puedan ser detectados en las partes aéreas. Es tal esta especificidad de síntesis, que muchos compuestos con actividades biológicas relevantes han sido localizados, casi de manera exclusiva, en este órgano.

Estudios realizados en los compuestos isoflavonoides que actúan como fitoalexinas en la rizósfera en las raíces de las leguminosas, demostraron que existen compuestos como los alcaloides y las saponinas, entre otros, que funcionan como transmisores de señales muy sensitivas y específicas, cuya acción, en los exudados de la semillas y de la raíces de las leguminosas, se encuentran flavonoides, ácido aldónico y betaínas, los cuales pueden ser

de inhibición de germinación de esporas, formación de nódulos o crecimientos de hongos (Dakora, 2004).

Oliveros-Bastidas *et al.* (2009) han reportado que la rizosecreción del isofalvonoide genistein por exudados de raíces de *Lupinus luteus* L., resultaron en un aumento en la atracción hacia hongos patogénicos. Por otra parte, se ha demostrado que los exudados de la raíz de ciertas plantas pueden promover de manera significativa el crecimiento de hongos patógenos. Tal es el caso de la secreción de ginsenosida, aislado tanto de la rizósfera, como de los exudados de la raíz por *American ginsens*, promueve el crecimiento de dos hongos, *Phytophthora cactorum* y *Phythium irregulare*, donde se ha postulado que ese efecto atractor y estimulante del crecimiento, puede afectar la susceptibilidad de esta especie a la presencia de estos hongos patogénicos, representando un fenómeno de pobre adaptación.

Diferentes estudios han sido conducidos para entender esta diferencia en la exudación entre plantas jóvenes y adultas, donde se ha podido demostrar que ciertos rasgos o características fisiológicas, como la capacidad de distribución de carbono asimilado por la raíz hacia el tallo, es un factor fundamental para describir el comportamiento de los compuestos liberados por la raíz y su importancia para las funciones adaptativa que éstos puedan tener en la planta, debe de incluir el comportamiento durante el desarrollo de la planta (Palta y Gregory, 1998).

Se ha demostrado además, que el sistema radicular de las leguminosas en su conjunto, posee de manera diferencial, una gran habilidad para secretar sustancias bioactivas de una gran diversidad de propiedades físicas y químicas a la rizósfera, como una respuesta al estrés o fluctuaciones de tipo tanto bióticas como abióticas. Por otra parte actuando tanto como agentes antibacteriales, así como antifúngicos, los cuales actúan regularmente de manera sinérgicas para alcanzar un resultado antimicrobial (Bais *et al.*, 2004).

4.1.4.1 Determinación del efecto *in vitro* de fracciones de extractos acuosos de testas de frijol común, sobre el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos

En el fraccionamiento de los extractos fueron colectadas, para la separación de las mezclas, 71 fracciones de 5 mL cada una para los extractos de la variedad T-93 y se

unificaron en un rango de 8 mezclas, procediendo de igual forma para los demás extractos de la variedad Delicias-364, así como el comportamiento de la elución para las tres variedades (Figura 7).

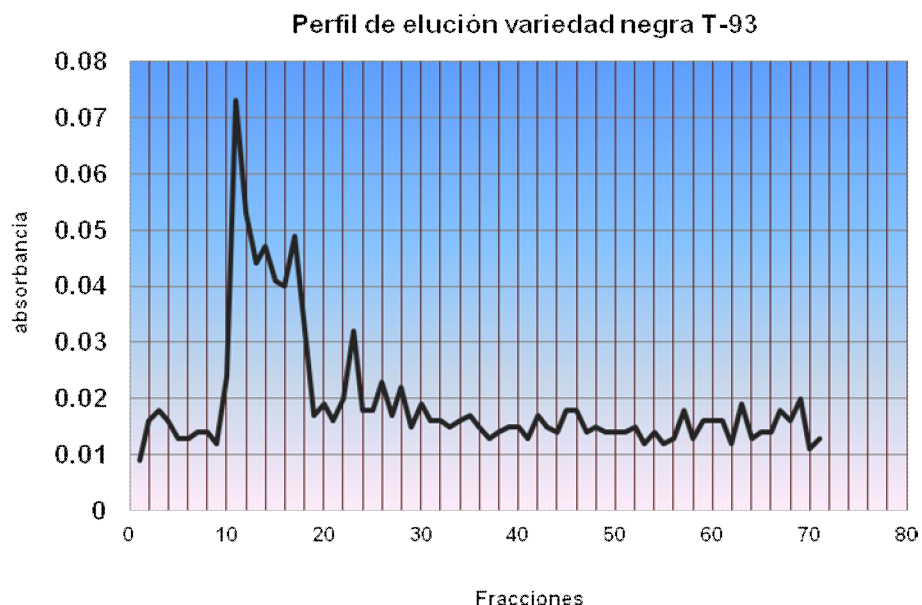


Figura 7. Registro de la elución de la variedad T-93.

Se muestra el registro de la elución de la variedad T-93 la cual describe varios picos, correspondientes al contenido de sustancias (fenoles y flavonoides) los que aumenta en su contenido para esta variedad; dentro de algunos picos se pueden apreciar desviaciones (hombros), que indican que algunos flavonoides eluyeron simultáneamente de la columna, quedando en una misma fracción. La causa de esta formación de mezclas se puede deber a varios factores como por ejemplo: una columna de poca altura y diámetro interior elevado no permite una separación eficaz pues las bandas formadas por las sustancias en función de las interacciones que se establecen entre estas y las fases (sólida y móvil) son muy cercanas. De este modo existe una tendencia a la formación de mezclas debido al solapamiento de las bandas. Por el contrario al aumentar el tamaño de la columna o hacer más lento el flujo (dentro de ciertos límites) las interacciones entre la fase sólida y el analito aumentan y por tanto la resolución puede ser mayor. Por otro lado existen casos

donde las estructuras de las sustancias son muy similares y de esta forma tienden a eluir de forma conjunta, propiciándose la formación de mezclas.

Al analizar el registro de la elución en el variedad Delicia- 384, se observa el comportamiento de las muestras obtenidas a partir del extracto acuoso del variedad donde existió un menor contenido de sustancias (fenoles y flavonoides) según su perfil de elución cromatográfico, lo cual se expresa por la disminución del número de picos formados, los cuales se corresponden con las diferentes sustancias que lo componen, donde la separación de los compuestos que forman la mezcla no fue completa formándose desviaciones (hombros) (Figura 8).

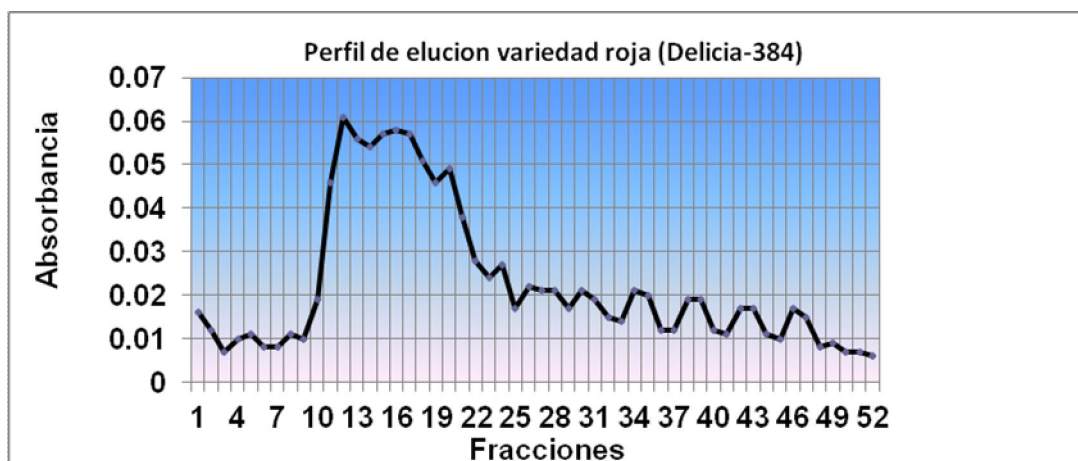


Figura 8. Registro de la elución de la variedad D-384.

La comparación de la elución de las tres variedades en estudios arrojó que el comportamiento cromatográfico es diferente en los tres casos (Figura 9).

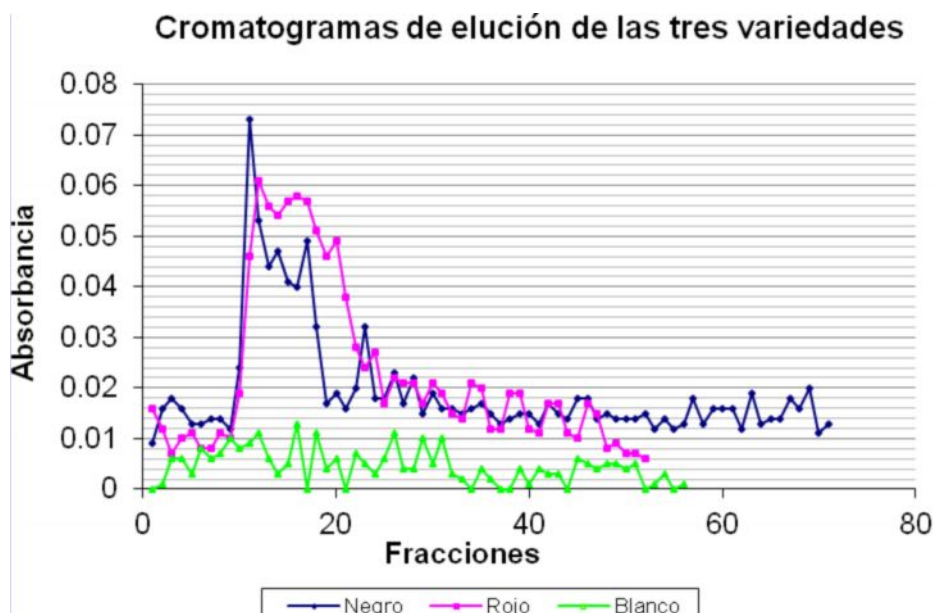


Figura 9. Registro de la elución de las tres variedades (T-93, D-384 y BAT-484).

La variedad de mayor contenido de sustancias biológicamente activas como fenoles y flavonoides lo presentó la variedad de testa negra, seguida por la variedad Delicia- 384. En el caso de la variedad blanca, se muestra un bajo contenido de estas sustancias biológicamente activas. En la actualidad no se reportan bibliografía sobre el comportamiento cromatográfico de extractos acuosos de testa en *Phaseolus vulgaris* frente a estos hongos.

4.1.4.2 Actividad antifúngica de la mezcla de fracciones de extractos acuosos de testa de variedades de frijol común, sobre el crecimiento micelial *in vitro* de hongos fitopatógenos del suelo

Los resultados del ensayo biológico con las ocho mezclas de sustancias biológicamente activas (fenoles y flavonoide) con las 71 fracciones obtenidas de la cromatografía para los tres extractos no mostraron inhibición en el crecimiento micelial de las especies estudiadas (Figura 10).

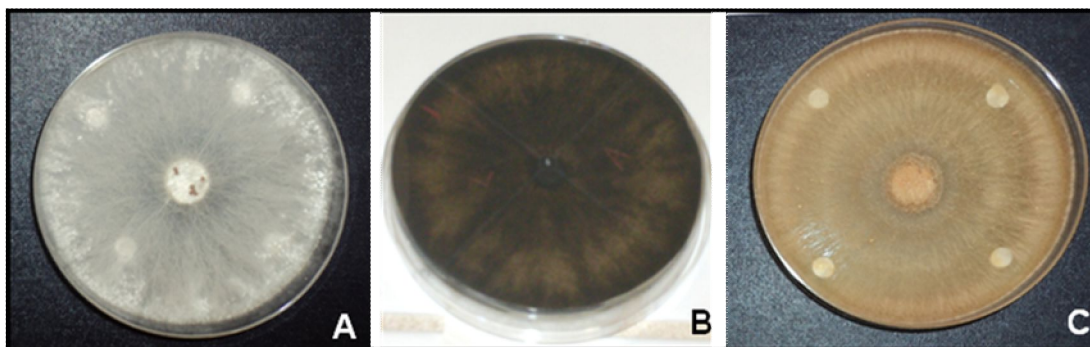


Figura 10. Efecto de la mezcla de fracciones de extractos acuosos de testas en variedades de frijol común sobre el crecimiento micelial *in vitro* de hongos fitopatógenos del suelo: A) *S. rolfsii* B) *M. phaseolina* C) *R. solani*.

Estos resultados demuestran la existencia de relaciones sinérgicas entre los componentes de los extractos pues al separar las sustancias que componen los mismos disminuyen las inhibiciones y por tanto el desarrollo del hongo se acerca más al crecimiento normal. Navickiene *et al.* (2007) y Harasstani *et al.* (2010) al realizar estudios sobre la eficiencia del efecto biológico producido por extractos de plantas demostraron el efecto sinérgico o aditivo de los metabólicos que lo conforman. Resultados similares fueron obtenidos por Espinosa (2012) en extractos de *Terminalia catappa* L. al evaluar el efecto inhibitorio de las fracciones de extractos acuosos, sobre el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos del suelo.

Durante el fraccionamiento la separación de las sustancias está condicionada por varios factores, entre ellos, la estructura de los analitos posee un papel fundamental. De esta forma en las mezclas colectadas existen compuestos con disímiles propiedades y características químicas, razón por la cual actúan de forma diferente sobre cada hongo. Se han obtenido resultados similares en cuanto al efecto que pueden producir varias sustancias en función de su estructura química (Cruz, 2009; Hidalgo, 2009). Estos autores señalaron que las diferencias estructurales de las sustancias pueden provocar diferentes efectos biológicos en concordancia con la disposición espacial de las moléculas. En el caso de los flavonoides, el estudio de la relación estructura-actividad es muy interesante, debido a la relativa complejidad de las moléculas. Se ha demostrado que la presencia del grupo hidroxilo en el anillo B (grupo catecol) le confiere a la molécula una elevada

actividad, debido a una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones; actuando además como sitio de fijación para trazas de metales (Van *et al.*, 1997; Bohm *et al.*, 1998).

La actividad antioxidante de los flavonoides permite disminuir las especies reactivas del oxígeno en la planta, pero tal capacidad también se adjudica a la inhibición en el desarrollo de diferentes microorganismos debido a la inactivación de procesos a nivel de membrana (Tharayil, 2009).

En diversos estudios se evidencia como al aumentar o disminuir en pocas unidades las concentraciones, el grado de afectación varía en función del cambio (Quintana *et al.*, 2009). Para un mismo microorganismo la disminución de la cantidad de sustancia por unidad de volumen induce diferentes respuestas. Tal es el caso del extracto del puerro (*Allium porrum* L.), al evaluarse su actividad sobre *Sclerotium cepivorum*, las concentraciones máximas inhibieron su desarrollo, por el contrario las concentraciones más bajas no provocaron efectos sobre este proceso (Argüello *et al.*, 2009).

Las inhibiciones fueron más significativas en *R. solani* y *M. phaseolina*, en comparación con *S. rolfsii*; para el extracto puro, no comportándose así para las fracciones obtenidas en la cromatografía. De acuerdo a las experiencias descritas por varios autores, se pudo concluir que los hongos en función de su especie y características, pueden desarrollar diversos mecanismos para permanecer en un determinado hábitat, por esta razón se pudo observar resistencia o no en unos y otros, frente a diversos productos (Beltrán *et al.*, 2006; Serrano *et al.*, 2010).

4.2 Determinación del efecto *in vitro* de *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *B. cepacia* y *P. fluorescens*, sobre el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos del suelo.

Los enfrentamientos *in vitro* de cada una de las bacterias antagónicas a partir de la inhibición del crecimiento micelial todas manifestaron en el experimento la capacidad antagónica frente a los hongos fitopatógenos del suelo. Este antagonismo se manifestó en los porcentajes de inhibición que presentaron cada uno de los hongos estudiados

Los menores valores de inhibición se encontraron en *M. phaseolina*, los cuales oscilaron entre 55,82 y 78,30 %. Los mayores valores de inhibición se encontraron en *S. rolfsii* para

P. aeruginosa, *B. subtilis* y *B. cepacia* con 100, 100 y 80.72 % respectivamente y en *R. solani* para *P. fluorescens* y *P. aeruginosa* con 100 %. (Tabla 8).

Tabla 8. Crecimiento micelial *in vitro* de *R. solani*, *S. rolfsii* y *M. phaseolina* en presencia de bacterias antagonistas, a las 72 horas.

Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial*			
Tratamiento	<i>S. rolfsii</i>	<i>R. solani</i>	<i>M. phaseolina</i>
<i>B. cepacia</i>	80.72 a	67.04 b	70.27 ab
<i>B. subtilis</i>	100.00 a	66.26 b	78.30 a
<i>P. aeruginosa</i>	100.00 a	100.00 a	55.82 b
<i>P. fluorescens</i>	40.97 b	100.00 a	61.42 ab
EE (±)	7.76	5.75	3.62
CV (%)	13.30	23.20	18.20

Valores con letras desiguales en una misma columna difieren para $P < 0.05$ por la Prueba de Duncan.

Mavrodi *et al.* (2006) y Picard y Bosco (2008) señalaron que especies de *Pseudomonas* y otros géneros bacterianos sintetizan fenazinas, que incluyen alrededor de 50 metabólicos secundarios pigmentados, los cuales ejercen efecto antifúngico. Basurto-Cadena, *et al.* (2010) reportó para *B. subtilis* la presencia de sustancias de origen enzimático o de toxinas que son producidas por la cepa bacteriana, que lograron lisa el micelio *R. solani*. La desintegración de las paredes miceliales dio como resultado la destrucción total de las estructuras celulares del hongo.

Puopolo *et al.* (2004) y Dhingra *et al.* (2006) para *Pseudomonas fluorescens* contra *R. solani* y *Fusarium oxysporum*, y Sosa *et al.* (2006) realizaron trabajos sobre la actividad antagónica *in vitro* de bacterias frente al crecimiento micelial de hongos fitopatógenos del suelo para dos tipos de inhibición (mutua y/o antagónica) para *Bacillus* contra *Sclerotium rolfsii* y *R. solani*. Del mismo modo, Chen *et al.* (2004) demostraron que *B. subtilis* inhibió el crecimiento de hongos fitopatógenos del suelo como *F. oxysporum*, *R. solani*, *S. rolfsii*, *F. moniliforme* y *F. solani*.

4.3 Evaluación *in vivo*, del efecto del tratamiento a la semilla con bacterias antagonistas, sobre la incidencia de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos del suelo.

En el experimento desarrollado en condiciones semicontroladas, el tratamiento de semillas con bacterias antagonistas redujo las afectaciones para *S. rolfsii* en más de un 45%, *R. solani* en un 70% y *M. phaseolina* en un 90% en BAT-482, comparado con las plantas provenientes de semillas sin tratar, con diferencias estadísticas significativas. Aunque esta reducción fue significativa para cada uno de los hongos estudiados, los porcentajes de plantas enfermas, alcanzados con cada una de las bacterias empleadas, así como el control TMTD no mostraron diferencias significativas entre sí para ninguno de los hongos en estudio (Tabla 9).

Tabla 9. Influencia del tratamiento a la semilla con bacterias antagonistas sobre la incidencia de enfermedades causadas por hongos del suelo patógenos al frijol, variedad BAT 482.

Tratamientos	% de plantas afectadas					
	<i>S. rolfsii</i>		<i>R. solani</i>		<i>M. phaseolina</i>	
	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios
Semillas sin tratar	98.20	38,30 a	97,99	38,05 a	98,15	38,30 a
TMTD	27.32	16.16 b	14,23	16,00 b	11,10	10,50 b
<i>B. cepacia</i>	23.17	13,56 b	18,85	13,37 b	11,11	10,51 b
<i>B. subtilis</i>	34.21	18,65 b	18,87	14,50 b	19,95	17,75 b
<i>P. aeruginosa</i>	45.23	24,24 b	18,87	15,02 b	15,52	17,75 b
<i>P. fluorescens</i>	28.70	15,10 b	23.50	13,27 b	15,52	14,12 b

Medias con letras no comunes en el sentido de las columnas difieren para $P < 0.05$ por la prueba de comparación de rangos múltiples.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Díaz (2012) al evaluar el efecto *in vivo* de tratamientos de semillas de BAT 482 con bacterias antagonistas y quitosana, sobre la incidencia de enfermedades causadas por hongos del suelo.

En el caso de las PGPB, se han realizado estudios no sólo en relación con el impacto que tiene la presencia de éstas sobre la especie vegetal, sino también con respecto a los mecanismos que estos organismos emplean para promover el crecimiento e interactuar con la planta (Sgroy *et al.*, 2009). Así, se han pautado ciertos criterios sobre la caracterización de este grupo de microorganismos para definir tanto su estrategia de promoción del desarrollo, como para pre-seleccionar aquellos con mayor potencial para ser empleados en sistemas agropecuarios sostenibles.

Algunos de los criterios que hoy permiten seleccionar una bacteria con potencial PGPB son: fijación biológica de nitrógeno atmosférico, solubilización de fósforo inorgánico, mineralización de fósforo orgánico, producción de inductores de crecimiento vegetal como auxinas, producción de sideróforos, ácido salicílico, ácido cianhídrico, y actividad desaminasa, entre otras (Glick *et al.*, 2007; Onofre-Lemus *et al.*, 2009; Sgroy *et al.*, 2009).

Los microorganismos, a la vez, participan en numerosos beneficios, como: influencia en el crecimiento radical, regulación de la actividad metabólica de la raíz e influencia en las propiedades físicas y químicas del suelo, así como de los contaminantes (González-Chávez, 2005).

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, 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.* (2008) 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.

La aplicación de organismos antagonistas tales como las bacterias: *P. fluorescens*, *B. cepacia*, *B. subtilis*, *P. aureginosa* y sustancias naturales, así como con el empleo de enmiendas orgánicas y la introducción de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal a través de diferentes mecanismos entre los que se destaca la fijación biológica de nitrógeno. La síntesis de fitohormonas como las auxinas, particularmente el ácido indol acético, promueven el crecimiento de las raíces y la proliferación de pelos radicales, mejorando la absorción de agua y minerales del suelo y con ello el mejor y mayor desarrollo de la planta (Caballero-Mellado, 2006). Además pueden suprimir enfermedades producidas por microorganismos fitopatógenos a través de la producción de sideróforos, síntesis de antibióticos, enzimas y/o compuestos fungicidas (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

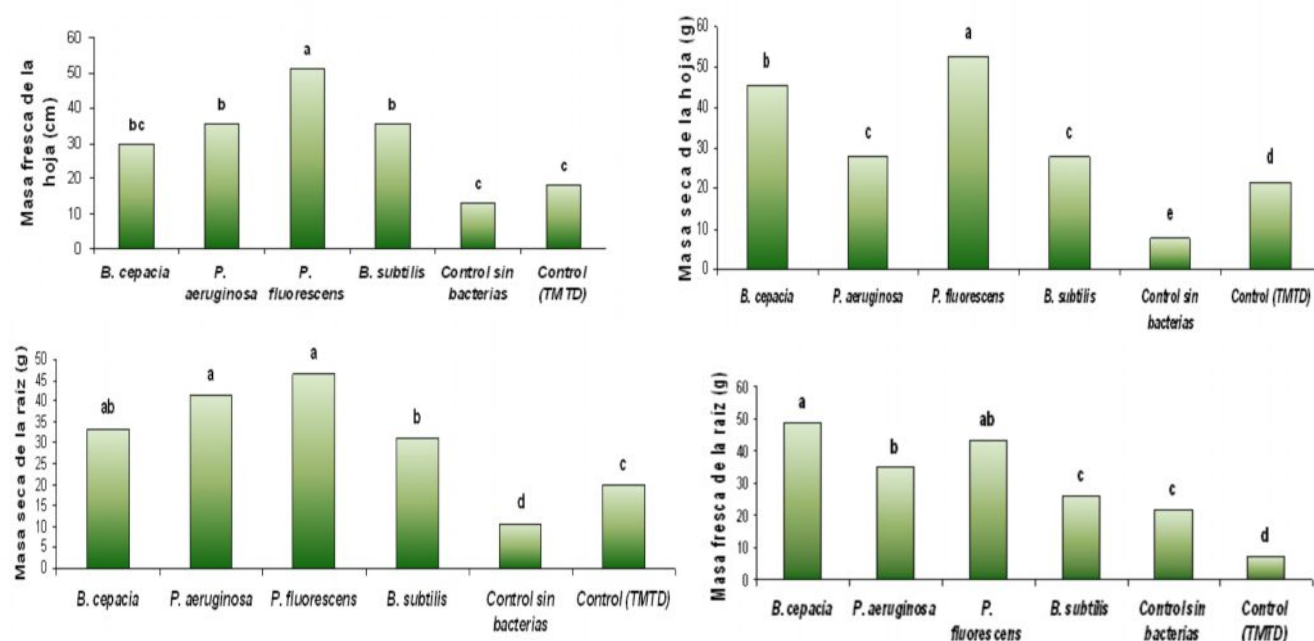
Según Leifert *et al.* (1994) algunas cepas de *Pseudomonas* producen hormonas reguladoras de crecimiento vegetal como etileno, auxina y citoquinina, las que ejercen su efecto a muy bajas concentraciones y potencian el desarrollo de la planta. Por su parte Trujillo *et al.* (2004) cuantificaron ácido 3-indol acético en cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia*, aisladas de la rizosfera del maíz, en un rango de 8,1 a 20,5 miligramos/ mL de AIA, el cual es suficiente para lograr efectos benéficos en la planta.

Después de analizados los experimentos, relacionados con el efecto del tratamiento a las semillas con bacterias antagonistas sobre la incidencia y agresividad de hongos del suelo patógenos al frijol, concluimos que las cepas utilizadas tienen potencial para ser usadas como agentes biocontroladores de *R. solani*, *S. rolfsii* y *M. phaseolina*, en condiciones de campo.

Efecto del tratamiento a la semilla con bacterias antagónicas sobre indicadores morfosiológicos en plantas de *P.vulgaris*

Todas las bacterias antagonistas estimularon el crecimiento foliar y de las raíces en todas las variedades frente a *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* y *Sclerotium rolfsii* sobre indicadores morfosiológicos, no existiendo diferencias significativas en la longitud de la raíz, así como en las plantas afectadas por los tres hongos en estudio.

En cuanto a la influencia de la aplicación de bacterias antagónicas frente a *Rhizoctonia solani* sobre indicadores morfofisiológicos en plantas de *P. vulgaris*, todas las bacterias estimularon el crecimiento de las plantas, con diferencias significativas con respecto a los controles. En este caso *P. fluorescens* fue la bacteria que mas estimuló el crecimiento foliar, así como el de la raíz en todas las plantas evaluadas (Figura 11).



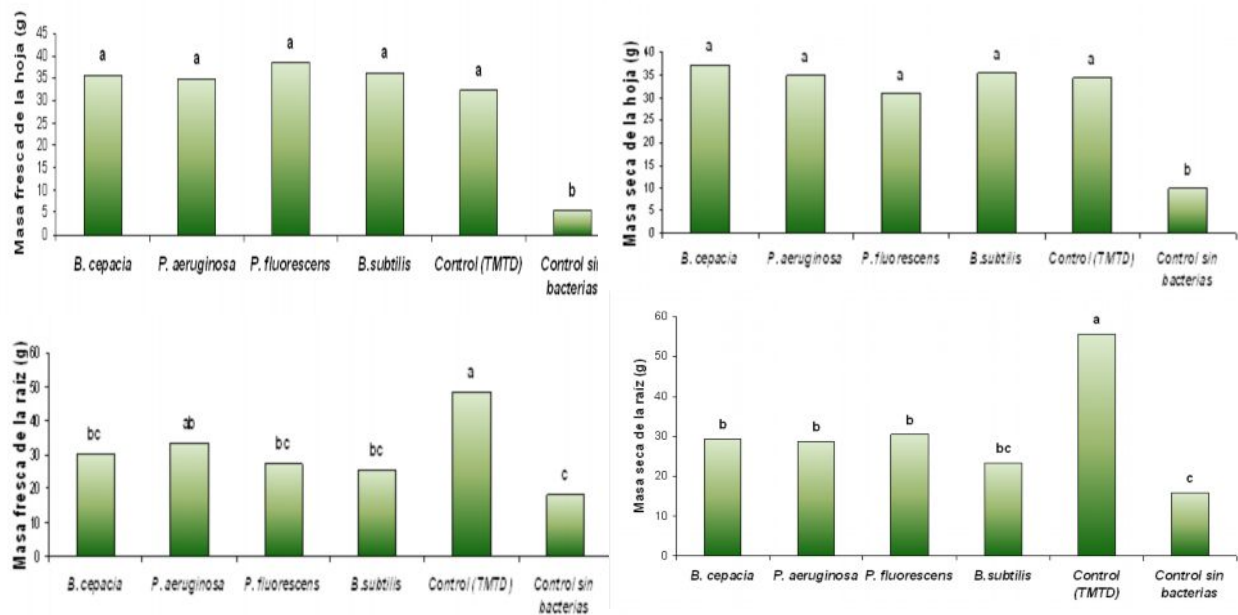
Barras con letras diferentes indican diferencias entre las medias según las pruebas de Kruskal Wallis/Mann Whitney ($p \leq 0.05$).

Figura 11. Influencia de la aplicación de bacterias antagónicas frente a *Rhizoctonia solani* sobre indicadores morfofisiológicos en plantas de *P. vulgaris*.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, los resultados logrados en la presente investigación, pudieran estar relacionados con los mecanismos de biocontrol utilizados por este género, que involucran tanto la producción de sideróforos, antibióticos así como enzimas extracelulares con actividad biológica inhibitoria (Ahmad *et al.*, 2008).

Al respecto Rezzonico *et al.* (2007) demostraron que varias especies de *Pseudomonas* producen antibióticos como pirrolnitrina, 2,4-diacetilfloroglucinol, piocianina y el ácido fenacín-1-carboxílico, además de los sideróforos y bacteriocinas, así como metabolitos antifúngicos. La síntesis de estos metabolitos secundarios participa en el biocontrol de diversos fitopatógenos. Particularmente, a la síntesis de sideróforos por *Pseudomonas fluorescentes* se les ha atribuido un enorme interés por participar en la promoción del crecimiento vegetal y suprimir el crecimiento de patógenos de raíz (Loper y Schroth, 1986). Se ha propuesto que tales compuestos pueden secuestrar el hierro del ambiente rizosférico, impidiendo que sea disponible para los patógenos. Además de la competencia por nutrientes y hábitat (Martínez-Granero *et al.*, 2006) y el establecimiento o inhibición de sistemas de moléculas señales en el patógeno (Bertani *et al.*, 2004).

En cuanto a la influencia de la aplicación de bacterias antagónicas frente a *Macrophomina phaseolina* sobre indicadores morfofisiológicos en plantas de *P. vulgaris*, todas las bacterias estimularon el crecimiento de las plantas, con diferencias significativas con respecto a los controles, en este caso el estímulo del crecimiento foliar fue mayor con respecto al de la raíz por parte de todas las bacterias en estudio (Figura 12).



Barras con letras diferentes indican diferencias entre las medias según las pruebas de Kruskal Wallis/Mann Whitney ($p \leq 0,05$).

Figura 12. Influencia de la aplicación de bacterias antagónicas frente a *Macrophomina phaseolina* sobre indicadores morfofisiológicos en plantas de *P. vulgaris*

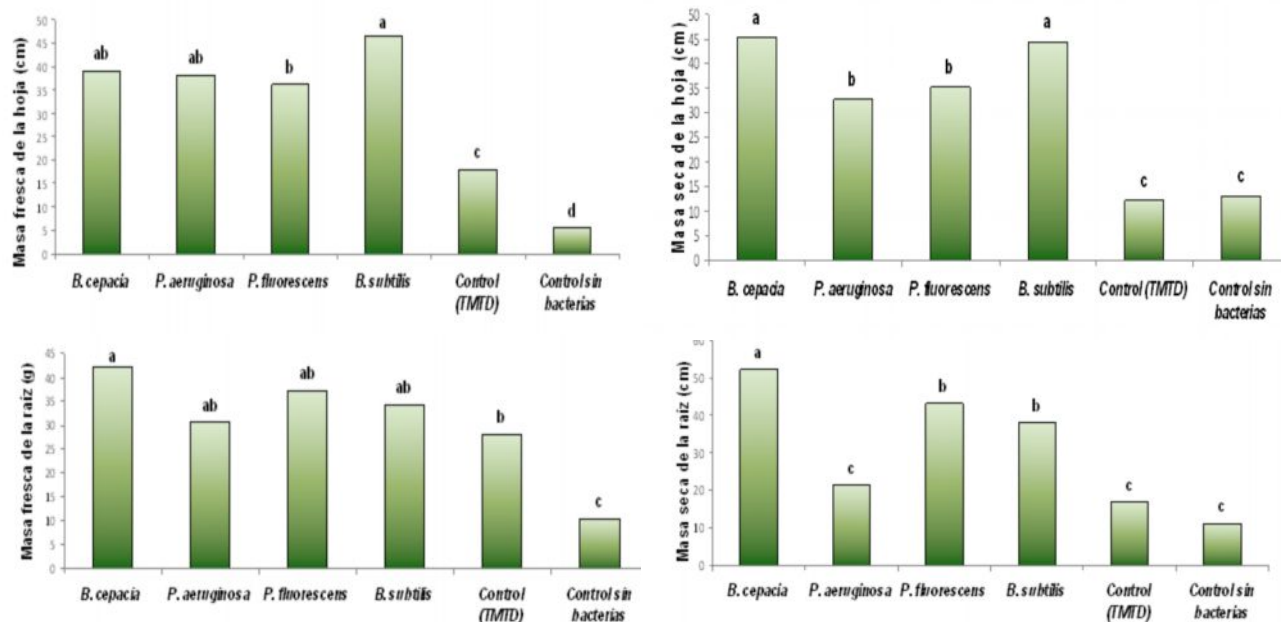
Los resultados del presente trabajo coinciden con lo informado por Lagunas *et al.* (2001) quienes informaron que el tratamiento a las semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) y semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) con diferentes bacterias antagónicas estimuló en mayor medida el peso seco del follaje con respecto al de la raíz en comparación con el testigo.

Con respecto a esto Cuesta *et al.* (2010) evidenciaron que la mayor absorción del fósforo solubilizado ocurre en las semillas inoculadas con estas bacterias, las que pertenecen a géneros fosfolubilizadores, y potencian la síntesis de auxinas que son consideradas hormonas estimuladoras del crecimiento vegetativo.

Además con respecto al efecto biocontrolador, se ha informado que algunas bacterias como: *B. subtilis*, ha demostrado la capacidad de inhibir la germinación y el crecimiento de las hifas de varios patógenos foliares en tomate, frijol común, así como algunas bacterias

del género *Pseudomonas* (como la *P. fluorescens* y *P. aeruginosa*) tienen propiedades de excretar metabolitos con acción antibiótica, compuestos volátiles como el cianuro de hidrógeno y sideróforos que le permiten ejercer una competencia activa con el patógeno, estas son las características más importantes por las que las bacterias y los hongos son considerados como controladores de enfermedades en plantas (Hernández et al., 2004).

En cuanto a la influencia de la aplicación de bacterias antagónicas frente a *Sclerotium rolfsii* sobre indicadores morfofisiológicos en plantas de *P. vulgaris*, todas las bacterias estimularon el crecimiento de las plantas, con diferencias significativas con respecto a los controles. En este caso *B. subtilis* fue la bacteria que más estimuló el crecimiento foliar, siendo *B. cepacia* la que más estimuló el crecimiento de la raíz en todas las plantas evaluadas (Figura 13).



Barras con letras diferentes indican diferencias entre las medias según las pruebas de Kruskal Wallis/Mann Whitney ($p \leq 0,05$).

Figura 13. Influencia de la aplicación de bacterias antagonicas frente a *Sclerotium rolfsii* sobre indicadores morfofisiológicos en plantas de *P. vulgaris*.

El estímulo del crecimiento foliar de las plantas por parte de *B. subtilis* pudo estar dado a que uno de los usos de esta bacteria como agente de control biológico es mediante el tratamiento de semillas. Su efecto benéfico cuando se aplica junto a las semillas o en forma individual no se debe exclusivamente al antagonismo con los patógenos sino que influye positivamente en la germinación, desarrollo y rendimiento del cultivo debido a la producción de sustancias promotoras del crecimiento y al mejoramiento de la nutrición de las plantas (Sosa-Pech *et al.*, 2012).

Por su parte Yang, (1992) señaló que ciertas bacterias del género *Bacillus* incrementan el volumen radical, el peso fresco del follaje y promueven a reducción de la severidad de la enfermedad en las plantas.

Por otro lado el género *Bacillus* es el grupo bacteriano más utilizado para el control de patógenos del suelo y de raíces (Killani *et al.*, 2011). Especies como *B. subtilis*, *B.*

cereus, *B. megaterium*, *B. thuringiensis* y otros han sido formuladas adecuadamente y utilizados en el tratamiento de semilleros, en el sistema radicular, y directamente como bio-fungicida foliar, mediante aerosoles, en cultivos de importancia económica como frijol, tomate, mango, fresa, arroz y flores ornamentales (Elzein y cols., 2006).

Al respecto Bernal *et al.* (2006), plantearon que el modo de acción de esta bacteria es: la producción de sideróforos, la competencia por el sustrato en la rizosfera y filosfera de los patógenos de las plantas, además producen anti-biosis que son altamente fungo-tóxicos; algunos investigadores afirman que estas bacterias son promotoras del crecimiento vegetal e inducen a la planta a producir fitoalexinas que le proveen de resistencia contra los hongos patógenos.

Por otra parte el estímulo del crecimiento de la raíz de las plantas por parte de *B. cepacia* pudo estar relacionado a que algunos miembros del complejo *B. cepacia*, pueden actuar directamente estimulando el crecimiento de la planta. Por ejemplo, la inoculación de cultivos como el maíz o el sorgo han incrementado la biomasa de raíces (Bevivino *et al.*, 2000). La promoción del crecimiento de *B. cepacia* probablemente se deba a la combinación de mecanismos que envuelven tanto a la planta como a la bacteria. Las rizobacterias facilitan el crecimiento de la planta previniendo la proliferación del organismo patógeno o estimulando directamente el crecimiento mediante la adquisición de fuentes nutricionales como nitrógeno, fósforo y hierro, u hormonas como auxinas o citoquininas; también pueden disminuir los niveles de etileno a través de la acción de la enzima ACC desaminasa (Vessey, 2003). Además se describe como una bacteria muy atractiva y de considerable atención por su gran diversidad genética, apareciendo como patógeno de plantas, saprofítico biorremediador, estimulador del crecimiento vegetal y agente de biocontrol en diferentes cultivos de interés agrícola (Govan *et al.*, 2000). Entre sus mecanismos de acción se destacan el aumento de la toma de agua y nutrientes por la planta, la producción de fitohormonas y el biocontrol de patógenos. En ese sentido, trabajar con cepas autóctonas y obtener productos en ausencia de la célula aumenta su factibilidad desde el punto de vista ecológico.

Por otra parte Burkholderia es uno de los géneros bacterianos utilizados para biorremediación de herbicidas y pesticidas recalcitrantes, como agentes de control

biológico de hongos fitopatógenos así como por su habilidad de promover el crecimiento de cultivos (Saiman y Siegel, 2004).

Asimismo, se ha demostrado que cepas de *B. cepacia* producían diferentes tipos de sideróforos (Hernández et al., 2004), los que podrían estar involucrados en el antagonismo microbiano y en la resistencia sistémica inducida (RSI) en diferentes sistemas planta-patógeno, así como la producción de compuestos extracelulares que incluyen proteasas, hemolisinas, lecitinasas y lipopolisacáridos, además de compuestos con actividad antibiótica, algunos de los cuales poseen actividad antifúngica.

En resumen los resultados obtenidos en la presente investigación presentan gran importancia, ya que no solo muestra el impacto de estas bacterias sobre la especie vegetal, sino también los mecanismos que estos organismos emplean para promover el crecimiento e interactuar con las plantas desarrollando una mayor calidad fisiológica, capaces de contrarrestar el efecto producido por los hongos fitopatógenos del suelo. Además de permitir la caracterización de este grupo de microorganismos para definir tanto su estrategia de promoción del desarrollo, como para pre-seleccionar aquellos con mayor potencial para ser empleados en sistemas agropecuarios sostenibles.

CONCLUSIONES

- 1- La composición de la testa de semillas de frijol estuvo determinada por la presencia de flavonoides, alcaloides y compuestos fenólicos, mientras que los extractos acuosos de raíces solamente alcaloides y saponinas y esta varió en dependencia del color de la testa.
- 2- Los extractos acuosos puros obtenidos de la testa de semillas de las tres variedades de frijol común inhibieron el crecimiento micelial *in vitro* de *Rhizoctonia solani* y *Macrophomina phaseolina* no así para *Sclerotium rolfsii*, mientras que los extractos de la variedad BAT 482 no inhibió ninguno de los hongos en estudio. Los extractos acuosos de raíces tampoco inhibieron el crecimiento micelial de los hongos.
- 3- En condiciones *in vitro* las bacterias antagonistas inhibieron el crecimiento micelial de los tres hongos fitopatógenos del suelo.
- 4- Bajo condiciones semicontroladas, el tratamiento de semillas con bacterias antagonistas estimularon el crecimiento foliar y de la raíz de las plantas frente a los hongos fitopatógenos.
- 5-El tratamiento de la semilla con bacterias antagónicas redujo el porcentaje de plantas afectadas por las especies fitopatógenas sin diferencias con el control estándar (TMTD).

RECOMENDACIONES

- 1- Realizar caracterizaciones químicas de los extractos con técnicas de mayor resolución como son la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y la Espectrofotometría de Masa.
- 2- Evaluar, en condiciones de producción, el efecto del tratamiento a la semilla por inmersión así como su combinación con la aplicación del extracto al suelo.
- 3- Poner los resultados obtenidos a disposición de productores, investigadores y docentes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. -Alstrom, S. 1991. Induction of disease resistance in common bean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterisation with rhizosphere pseudomonads. *Journal of Genetic and Applied Microbiology* 37, 495–501
2. -Aguirre, S; Menjivar, J.; Piraneque, N.. 2006. Relación entre la nutrición mineral y la severidad del daño ocasionado por pudrición blanca en cebolla de bulbo. *Acta Agronómica* 55 (4): 21-28.
3. -Ahmad F, Ahmad I, Khan MS 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol Res.* 163(2):173-181.
4. -Antoun, H., y D. Prevost. 2006. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. En: Z.A. Siddiqui (Ed.). *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, Springer, Dordrecht, pp. 1–38.
5. -An Annotated Bibliography of *M. phaseolina*. 1975-1987. Singh, S.K.; Nene, Y.L.; Reddy, M.W. and Sheila, V.K. India. Pág. 32.
6. -Acimovic, M., Straser, N. and Brazia, S. 1985. Possibilities of controlling *Phomopsis* sp. and other pathogens of disease of sunflower. Búsquedas Bibliográficas No. 181. *M. phaseolina*. 1971-1984. CIAT. Colombia, pág. 4.
7. Argüello, E. V.; Yossen, E.; Conles, M. (2009). Efecto del extracto de puerro (*Allium porrum*L.) sobre la supervivencia de esclerocios de *Sclerotium cepivorum*. *Agriscientia*. vol. 26 (1).
8. -Bauer A.W. Kirby V.M., Sherris J.C. y Turck M. 1966. *Clinic Pathol.* 45:493-496.

9. -Bertani I, Venturi V. 2004. Regulation of the N-Acyl Homoserine Lactone-Dependent Quorum-Sensing System in Rhizosphere *Pseudomonas putida* WCS358 and Cross-Talk with the Stationary-Phase RpoS Sigma Factor and the Global Regulator GacA. *Appl Environ Microbiol.* 70 (9):5493- 5502.
- 10.-Bernal-Alcocer -Zamora-Natera, J.F. A., Ruiz-López, M., Soto-Hernández, M., Escalante-Estrada, A., y Vibrans-Lindemann, H. 2005. Perfil de alcaloides de semillas de *Lupinus exaltatus* Zucc. (Fabaceae) y la evaluación antifúngica del extracto alcaloideo y lupanina contra fitopatógenos.
- 11.-Bernal, A.; Gato, I.; Díaz M.; Herrera-Isla, L.; Martínez, B. 2006. Empleo de cepas de bacterias antagonistas en el control de *Stemphylium solani* Webber en tomate bajo cultivo protegido. Santa Clara, Cuba. *Centro Agrícola.* 33(3): 37-40 pp., julio-septiembre.
- 12.-Brada, I.E.; Quintana, E.; Pelaya, E.; Araujo, T. 1995 Efecto de *Bacillus* sp. sobre la germinación y desarrollo de semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* M.) infestadas con *Fusarium oxysporum* Schl.var.cubensis Smith. Resúmenes Bioplag 95 (Ciudad Habana, Cuba). INIFAT p. 11.
- 13.-Beas R., Reyes M., Medina M., Hernández S., Pérez M. 2004. *Macrophomina phaseolina* en frijol de Aguascalientes: relación patogénica y genética con aislamientos de otras regiones de México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, Año/vol 22 (2): 172-177.
- 14.Beute, M.K. and Rodríguez-Kabana, R. 1981. Effects of soil moisture, temperature and field environment on survival of *S. rolfsii* in Alabama and North Carolina. *Phytopathology* 71:1293-1296.

- 15.-Beltrán, M. J.; Ogurai, T.; Manzo, G.; Arias, C. 2006. Catalasas de hongos fitopatógenos: ¿Factores de virulencia y resistencia a los fungicidas? *Revista Mexicana de Fitopatología*. vol. 24(1): 50-58.

- 16.-Bevivino, M.S 2000. Efficacy of *Burkholderia cepacia* MCI 7 in disease suppression and growth promotion of maize. *Biology and Fertility of Soils*, , vol. 31, (4): 225-231.

- 17.-Bohm, H.; Boeing, H.; Hempel, T.; Krok, A.(1998). Flavonoids, flavones and anthocyanis as natural antioxidants of foods and their possibles role in the prevention of ehronic diseases. *Ernahrungswiss*. vol. 2: 147-163.

- 18.-Castellanos,JJ; Oliva,P; Izquierdo,E; Morales,N. 1995.Evaluación de *Bacillus subtilis* como biocontrol del patógeno *Alternaria porri*(Ell).Cif en cebolla.En: Bioplag 95. Ciudad Habana,Cuba).INIFAT.p. 21.

- 19.-Caballero-Mellano J. 2006. Microbiología Agrícola e Interacciones Microbianas con plantas. *Rev. Latinoamericana de Microbiología*, 48 (2): 154-161.

- 20.-Castellanos, M 2011. Incidencia de *Rhizoctoniaspp.*, *Sclerotium rolfsiiy* *Macrophomina phaseolina* en frijol común en Villa Clara. Bases para el manejo integrado. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en CienciasAgrícolas. 136 p

- 21.-Calatayud, P , 2010. Compuestos fenólicos y flavonoides como marcadores bioquímicos de la respuesta a estrés abiótico en plantas tolerantes”.Universidad Politécnica de Valencia, Gandia.

- 22.-CIAT. 1988. Pudriciones radicales del frijol y su control. Unidad Auditorial. Guía de estudio. 52 p. Resúmenes Analíticos sobre Frijol, Vol. 13 (1): 50.

- 23.-Cortes, Sara, 1999. Tecnología sustentable para la producción de flores de corte y plantas ornamentales. Informe final de proyecto AU-010.PNCT Biotecnología Agrícola. La Habana. Cuba.
- 24.Cruz, M. 2009. Métodos de Correlación Estructura-Actividad Multiobjetivos Aplicados al Desarrollo Racional de Fármacos. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Farmacéuticas Departamento de Farmacia. Facultad de Química-Farmacia. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara. Villa Clara.
- 25.-Cuesta, G., R. García, M. Abad y F. Fornes. 2010. Isolation and identification of actinomycetes from a compost-amended soil with potential as biocontrol agents. Article in press. Journal of Environmental Management 1-5 p.
- 26.-Cupull R., Andreu C., Perez C., Delgado I., M. Cupull. 2003. Efecto de *Trichoderma viride* como estimulante de la germinación, en el desarrollo de posturas de cafetos y el control de *Rhizoctonia solani* Kuhn. Centro Agrícola 30(1):21-25.
- 27.-Chen, H., M. Ward, B. Graubard, E. Heineman, R. Markin, N. Potischman, R. Russell, D. Weisenburger y L. Tucker 2002. Dietary patterns and adenocarcinoma of the esophagus and distal stomach. Am. J. Clin. Nutr. 75: 137–144.
- 28.-Davis B., Dulbecco R., Eisen H., Ginsber H. 1984. Tratado de microbiología. 3era Ed. Salvat editors, S.A. Barcelona.1097 pp.
- 29.-Dewanto W., Wu X. *et al.* 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. Journal Agric. Food Chem. 50: 3010-3014.

- 30.-Díaz, AM y Caldas GV. 2010. Concentrations of condensed tannins and anthocyanins in common bean seed coats. Food Research International 43 (2): 595–601.
- 31.Díaz, A. 1990. *Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid. causal agent of black rot of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the North of Tamaulipas. Agric. Técnica de México 10(2): 87-89.
- 32.-Dhingra, O. D. 1985. Saprophytic survival of *Macrophomina phaseolina* in soil. Búsquedas Bibliográficas No. 181. *M. phaseolina*. 1976-1984. CIAT. pág. 12.
- 33.-Díaz, F. A y R. Castro. 2005. Estudio sobre el control biológico de *Sclerotium rolfsii*. Disponible en: <http://www.redpavpolar.ifo.ve/agrotrop/v275/v275a006.html>
Consultado Enero 2009.
- 34.-Díaz, A. 1990. *Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid. causal agent of black rot of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the North of Tamaulipas. Agric. Técnica de México 10(2): 87-89. An Annotated Bibliography of *M. phaseolina*. 1975-1987. Singh, S.K.; Nene, Y.L.; Reddy, M.W. and Sheila, V.K. India. Pág. 32.
- 35.-De Meyer G, Hofte M, 1997. Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. *Phytopathology* 87, 588–593.
- 36.Díaz, AM y Caldas GV. 2010. Concentrations of condensed tannins and anthocyanins in common bean seed coats. Food Research International 43 (2): 595–601.

37. Díaz M. 2011. Incidencia de *Rhizoctonia* spp., *Sclerotium rolfsii* y *Macrophomina phaseolina* en frijol común en Villa Clara. Bases para el manejo integrado. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. 136 p
- 38.-Dhingra, O. D. 1985. Saprophytic survival of *Macrophomina phaseolina* in soil. Búsquedas Bibliográficas No. 181. *M. phaseolina*. 1976-1984. CIAT. Pág. 12.
- 39.-Domsch, Z. K., Gaws, W. and Anderson, T.H.1980. Compendium of soil fungi. V.I. London. Academic. Press. 859 p.
- 40.-Elzein A, Kroschel J, Leth V. 2006. Seed treatment technology: an attractive delivery system for controlling root parasitic weed *Striga* with mycoherbicide. Biocontrol Science and Technology 16, 3--26. doi: 10.1080/09583150500187926.
- 41.-Espinosa-Alonso LG, Lygin A, Widholm J M, Valverde ME, Paredes-Lopez O. 2006. Polyphenols in wild and weedy Mexican common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) J. Agric. Food Chem. 54: 4436-4444.
- 42.Espinosa Ray 2012. Efecto alelopático de *Terminalia catappa* L. sobre los hongos fitopatógenos del suelo *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas.
- 43.-Echávez, R.; Gómez, J. E. 1997. Rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (RDCP) controlan *R. solani* y *M. phaseolina* en Puerto Rico. IX Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Libro de Resúmenes. Uruguay. Montevideo, p. 290.

- 44.-Esqueda-Valle, M. y Zenteno-Zevada, M. 1991. Efecto del acolchado con polietileno sobre la micoflora asociada al cultivo del frijol. Anales del Inst. de Biología. Univ. Autónoma de México. Serie Bot. 61(1): 11-20
- 45.-FAO, 2013. <http://faostat.fao.org/site/408/default.aspx>; verified March 20, 2013.
- 46.-Finar, H.; Jergo, T. 2006. Constitución Química de Diferentes Plantas Perteneciente al Género Solanaceae en Zonas Características de Mexico. Interciencia. vol. 30(2).
- 47.-Finch, H. and Finch, A.N. 1987. Los hongos comunes que atacan los cultivos en América Latina. México. Trillas. 188 p.
- 48.-Folch, C., Viñas, E. y Barraibar, A.J. 1997. Control de *S. rolfsii* con *Trichoderma* y Flutolanil en el cultivo del ajo. IX Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Libro de Resúmenes. Uruguay. p. 184.
- 49.-Folgueras Maryluz. 2010. Las pudriciones radicales de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) en Cuba. Etiología. Epifitiología y manejo. Tesis para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. UCLV. Santa Clara. Cuba. 98 págs.
- 50.-Fundación para la Innovación Agraria 2011. Resultados y Lecciones en Controladores Biológicos: *Bacillus subtilis* y *B. thuringiensis*. Proyectos de Innovación en Región del Maule. Ministerio de Agricultura.
- 51.- García de Salamone, Inés E. 2012. Microorganismos promotores del crecimiento vegetal. Cátedra de Microbiología Agrícola, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

- 52.-García G., alimentel¹, Jesús Mena¹ 2009. Actividad antagónica *in vitro* de *Tsukamurella paurometabola* C-924 frente a fitopatógenos.
- 53.-Galli, E., Barbieri, P. Bestetti, G. 1992. Potential of Pseudomonads in the degradation of methylbenzenes. In *seudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*, pp. 268-276. Edited by E. Galli, S. Silver & B. Witholt. Washington, DC : American Society for Microbiology. Galli, E., Silver, S.
- 54.-García, M. 2008. Cuantificación de fenoles y de flavonoles totales en extractos naturales. Universidad Autónoma de Querétaro.
- 55.-Glick BR, Cheng Z, Czarny J, Duan J. 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.*, 119: 329-39.
56. González M. 1988. Enfermedades fungosas del frijol en Cuba. Editorial Científico Técnica. Ciudad de La Habana. Cuba. 152 págs
- 57.-Govan, J. 2000. *Burkholderia cepacia*-Friend and Foe. *ASM News*. 66 (3):124-125.
- 58.-González Rabellino P., Herrera Isla L.; Suárez Norma; Díaz M.; Pérez C. y Saucedo O. 2002. La solarización como medida fitosanitaria. I: Efecto sobre la micoflora del suelo. *Rev. Centro Agrícola*. Año 4. 28 (4): 87-90.
- 59.-González ME., Chávez. 2005. Efecto antagónico de *Burkholderia cepacia* Palleroni y Holmes contra *Capnodium* spp. en plantas de café variedad Robusta (*Coffea canephora* P.) crecidas *in vitro*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25:000-000.

- 60.-González M. 2008. Aspectos de sistemática y biología del complejo *Rhizoctonia*. Fitosanidad. 12(3):147-159.79.
- 61.-González M. 2008b. Caracterización de aislamientos del complejo *Rhizoctonia* obtenidos en semilleros de tabaco. Resumen de Tesis. Fitosanidad, 12 (4): 235-240.
- 62.-Gutiérrez Sánchez. Y. 2012. Efecto de la testa de semillas de *Phaseolus vulgaris* L. sobre bacterias y hongos del suelo asociados al cultivo. TESIS DE DIPLOMA.
- 63.-Gutiérrez. Y. 2012. Pentatómidos asociados al frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Fluctuación poblacional, preferencia varietal y afectaciones al cultivo Tesis en Opción al Grado Académico de Máster en Agricultura Sostenible, Mención “Sanidad Vegetal”.
- 64.-Gurkins, R.S. and Jenkins, S.F. 1985. Influence of cultural practices, fungicides and inoculum placement of Southern blight and *Rhizoctonia* crown rot of carrot. Plant Disease 69(6): 477-481.
- 65.-Harasstani, O.; Moin, S.; Tham, C. L.; Liew, C. Y.; Ismail, N.; Rajajendram, R.; Harith, H. H.; Zakaria, Z. A.; Mohamad, A. S.; Sulaiman, M. R.; Israf, D. A. 2010. Flavonoid combinations cause synergistic inhibition of proinflammatory mediator secretion from lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 cells. Inflamm Res. vol. 59(9): 711-721.
- 66.-Hall, R. 1994. Compendium of Bean Diseases. 2nd. Ed. The American Phytopathological Society. St. Paul, Mn. USA. 73 p.

- 67.-Hamdi Y. A. 1985. La fijación del Nitrógeno en la explotación de los suelos. Boletín de suelos de la FAO. 49. ONUFAO. 188 págs.
- 68.-Hayat, RA, Ummain A, Rabia K y Iftikhar A 2012 Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. ANN Microbial 60: 579-598.
- 69.-Hernández, C.A. 1996. Caracterización cultural, morfológica y patogénica de *S. rolfsii* Sacc. y algunos estudios básicos para su control. Tesis en opción al grado de Máster in Science en Agric. Sostenible. CIAP. Universidad Central de las Villas. Cuba. 74 p.
- 70.-Herrera, L. y Cervera, H. 1988. Bioecología y Metodología de la lucha con hongos fitopatógenos suelo en Cuba. Universidad Central de las Villas. p.2
- 71.-Hernández, A. N. 1996. Selección de Rizobacterias para la biofertilización en el cultivo del Maíz. Tesis de Maestría. La Habana. 4-18..
- 72.-Hernández-Castillo FD, Lira-Saldivar RH, Cruz-Chávez L, Gallegos-Morales G, Galindo-Cepeda ME y E Padrón-Corral. 2008. Potencial antifúngico de cepas de *Bacillus* spp. y extracto de *Larrea tridentata* contra *Rhizoctonia solani* en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). PHYTON 77 (2008):241-252.
- 73.-Hebbar, K.P., Martel, M.H., and Heulin, T. (1998): Suppression of pre-and post-emergence damping off in corn by Burkholderiaceae. European Journal of Plant Pathology. Vol. 104(1):29-36.
- 74.-Hebbar, K.; Martel, M. and T. Heulin. 1994. *Burkholderia cepacia*, a plant growth promoting rhizobacteria associate of maize. Proceedings of the Third International Workshop on PGPR. pag. 201-203.

- 75.-Herrera L. 2004. Los hongos fitopatógenos el suelo en Cuba. Tesis presentada para la obtención del título científico de Doctor en Ciencias. Santa Clara. Vila Clara. Cuba. 287 págs.
- 76.-Hernández H. A. 2011. *Empoasca kraemeri* Ross y Moore en *Phaseolus vulgaris* L. en Villa Clara, Cuba. Tesis presentada en opción al Título Académico de Máster en Agricultura Sostenible. Universidad Central de Las Villas.
- 77.-Hernández, A., J.M. Pérez; D. Bosch; L. Rivero. 1999. Nueva Versión de la Clasificación Genética de los Suelos de Cuba. Inst. Suelos, AGRINFOR, Ciudad Habana: 64.
- 78.-Hernández-Castillo FD, Lira-Saldivar RH, Cruz-Chávez L, Gallegos-Morales G, Galindo-Cepeda ME y E Padrón-Corral. 2008. Potencial antifúngico de cepas de *Bacillus* spp. y extracto de *Larrea tridentata* contra *Rhizoctonia solani* en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). *PHYTON* 77. 241-252.
- 79.Hernández, Annia; Rives, N.; Caballero, A.; Hernández, A.N. y Heydrich, M. 2004. Caracterización de rizobacterias asociados al cultivo del maíz en la producción de metabolitos del tipo AIA, sideroforos y ácido salicílico. *Rev. Col. Biotec.* 6(1): 6-13.
- 80.-Helen A. Stafford 1995. Roles of Flavonoids in Symbiotic and Defense Functions in Legume Roots.
- 81.-Hirsch, A. M. 1992. Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* 122:211-237.
- 82.-Hidalgo, W. F. 2009. Exploración de las relaciones estructura-actividad de compuestos tipo perinaftenona en el sistema biológico *Mycosphaerella fijiensis*

Tesis en opción al título de Magíster Ciencias en Biotecnología. Facultad de Ciencias. Universidad de Antioquia – Universidad Nacional de Colombia. Medellín. Colombia.

- 83.-INCA. 2001. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. 2008. Dosis del Producto EcoMic[®]. Resultado de la campaña de validación. La Habana: INCA. 45p.
- 84.-Indexfungorum .2008. Disponible en <http://www.indexfungorum.org/Index.htm>
Consulta 8 septiembre de 2011.
- 85.-Jayaraj J, Yi H, Liang GH, Muthukrishnan S, Velazhahan R, 2004. Foliar application of *Bacillus subtilis* AUBS1 reduces sheath blight and triggers defense mechanisms in rice. *Journal of Plant Diseases and Protection* 111, 115–125
- 86.-John, J.; Joy, M.; Abhilash, E. 2004. Inhibitory Effects of Tamarindus (*Tamarindus indica* L.) on Polipathogenic Fungi Allelopathy Journal. vol. 14(1): 43 - 50.
- 87.-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.
- 88.-Killani, A. S., Abaidoo, R. C., Akintokun, A. K., and Abiala, M. A. 2011. Antagonistic effect of indigenous *Bacillus subtilis* on root-/soil-borne fungal pathogens of cowpea. *Sciencepub*, 3(3), 11-18.
- 89.Korsten, L; De Villiers, EE; Wehner, RC; Kotzet, JM. 1997. Field spray of *Bacillus subtilis* and fungicides for control of preharvet fruit disease of avocado in South África. *Plant Disease* 81:455-459.

- 90.-Lampkin N. 1999. Organic farming. Farming Press. Ipswich p.p. 214-271
- 91.- Lazzarete,E;Menten,JOM;Bettiol, W. 1994.Bacillus subtilis antagónicos a los principales patógenos asociados a se-mentes de feijao e trigo.Fitopatología Venezolana 7:42-46.
- 92.-Lagunas-Lagunas, J., E. Zavaleta-Mejía, S. Osada-Kawasoe y S. Aranda-Ocampo 2001. *Bacillus firmus* como agente de control biológico de *Phytophthora capsici* Leo. en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Rev Mex Fitopatología 19: 57-61.
- 93.-Leifert, C; Morris, C. E. y Waites, W. M. 1994. Ecology of microbial saprophytes and pathogen in tissue culture and field-growth plants: reason for contamination problems in vitro. Critical review in Plant Sciences, 13(2): 139-183.
- 94.-Llacer, G., López, M.M., Trapero, A. y Bello. A. 1996. Patología Vegetal. Tomo II. Sociedad Española de Fitopatología. p. 703-1164. Edit. Phytoma.
- 95.- Li., S.; Zhizhen, Z.; Cain, A.; Wang, B.; Lon, M.; Taylor, J. 2005. Antifungal activity of campothecin, trifolin and hyperoside isolate from *Campotheca acuminata*. Journal of Agriculture and Food Chemistry 53(1), 32-37..
- 96.-Liu, B y Zhu Y 2007. Extraction of flavonoids from flavonoid-rich parts in tartary buckwheat and identification of the main flavonoids. J. Food Eng. 78: 584-587.
- 97.-Li., S.; Zhizhen, Z.; Cain, A.; Wang, B.; Lon, M.; Taylor, J. 2005. Antifungal activity of campothecin, trifolin and hyperoside isolate from *Campotheca acuminata*. Journal of Agriculture and Food Chemistry 53(1): 32-37.

- 98.-Loper J.E., Schroth M.N., 1986. Influence of bacterial sources of indole-2-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopathology* 76: 386-389.
- 99.-López V.. 2005. Hongos asociados al cultivo del frijol Caupì (*Vigna unguiculata* L. Walp) y comportamiento de *Rhizoctonia solani* Kühn en agroecosistemas de la Provincia Holguín. Tesis para optar por el grado académico de Máster en Ciencias Agrícolas.
100. Lugtenberg B, Kamilova F. 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 63: 541-556
101. Mandal, S, Chakraborty D y Dey S 2010. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. Department of Biotechnology; Indian Institute of Technology.
102. -Martínez-Granero F, Rivilla R, Martín M. 2006. Rhizosphere Selection of Highly Motile Phenotypic Variants of *Pseudomonas fluorescens* with Enhanced Competitive Colonization Ability. *Appl Environ Microbiol.* 72(5):3429-3434.
103. -Martín T. E. 2001. Estrategia de lucha para el control de *Sclerotium rolfsii* en una agricultura sostenible. Tesis para optar por el título de Master en Agricultura sostenible. UCLV. Santa Clara. 64 p.
104. Mayek, N., López, C., López, E., Cumpián, J y Acosta, J. A. 2001b. Resistencia a *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en frijol común en condiciones de campo en México. *Agrociencia* 35: 649-6

105. -Mandal, S, Chakraborty D y Dey S 2010. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. Department of Biotechnology; Indian Institute of Technology.
106. Mayek N., López E., Cumpián J. y Acosta, J. A. 2004. Reacción de germoplasma de frijol común a *Macrophomina phaseolina* en condiciones de riego-secano en Veracruz, México. *Agronomía Mesoamericana* 15(1): 45-51.
107. -Mayek, N.; García, R.; López, C.; Acosta, J. A.; Simpson, J. 2002. Water relations, histopathology and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during pathogenesis of *Macrophomina phaseolina* under drought stress. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 60: 185-195.
108. -Mayea, S. y Padrón, J. Bacterias y hongos fitopatógenos, 1983. Edit. Pueblo y Educación. Ciudad de la Habana. 233 p.
109. -. Mayea, S., Herrera I. L. y Andreu, C. M. 1983. Enfermedades de las plantas cultivadas en Cuba Edit. Pueblo y Educación. 425 p.
110. -Mavrodi D., Blankenfeldt W. y Thomashow, L. 2006. Phenazine. Compounds in Fluorescent *Pseudomonas* spp. Biosynthesis and Regulation *Annual Review of Phytopathology*. 44: 417-445.
111. -Mihail, J. D. and Alcorn, S. M. 1984. Effects of soil solarization on *M. phaseolina* and *S. rolfsii*. *Plant Disease*, 18:156-159.
112. Mishra J., Sing. R.D., Jadon V., Gausain M. 2010. Assessment of phenolic components and antioxidative activities of *Phaseolus vulgaris* L. *International Journey of Integrative Biology. IJIB*. 2010. Vol. 9. No. 1:26-30.

113. -MINAGRI. 2009. Listado oficial de variedades comerciales.
114. -Mora, NA 1996. Origen e importancia del cultivo de la caraota (*Phaseolus vulgaris* L.). Revista Facultad Agronomía (Maracay) 23: 225–234.
115. -Morales, R.G.F., Santos, I. & Danner, M.A. 2007. Efeito do chorume líquido de suínos na podridão do colo e tombamento de plântulas de feijoeiro causadas por *Sclerotium rolfsii*. Fitopatologia Brasileira 32:429-433. 2007. Brasil.
116. -Narwal, S. S. 1996. Suggested methodology for allelopathy laboratory bioassay. In Narwal, S.Qasem, J., Allelopathy: Field Observation and Methodology. Scientific Publisher. Joudpur. India, 255-265 p.
117. -Nerey, Y.; Van Beneden, S.; Franca Soraya; Jiménez A., Cupull. R. Herrera, L. & Höfte, M. 2010. Influence of soil type and indigenous pathogenic fungi on bean hypocotyls rot caused by *Rhizoctonia solani* AG4 HGI in Cuba. Soil Biology & Biochemistry 42: 797-803.
118. --Nelson, E. 2010. "Biology, Ecology and Allelopathy." Ecology Journal. Revisado: 30 de mayo, de 2004. Dirección electrónica: http://www.bioworks.net/biocontro/contro_325.htm.
119. -Nerey, Y., Herrera, L. & Höfte, M. 2009. Effect of temperature on growth and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* and on the interaction of both fungi in causing hypocotyl rot of bean. En: Nerey Orozco Y. PhD Thesis. Pp. 69-78. Ghent University. Belgium, ISBN:978-90-5989-345-0.

120. -Niknejad, K. M. 2004. Biological control of *Rhizoctonia solani*, the causal agent of Rice Sheath Blight by Antagonistic Bacteria in Greenhouse and Field Conditions. *Plant Pathology Journal* 2:88-96.
121. -Navickiene, H. M. D.; Miranda, J. E.; Bortoli, S. A.; Kato, M. J.; Bolzani, V. d. S.; Furlan, M. 2007. Toxicity of extracts and isobutyl amides from *Piper tuberculatum*: potent compounds with potential for the control of the *Velvetbean caterpillar*, *Anticarsia gemmatilis*. *Pest Management Science*. vol. 63: 399-403.
122. -Norma Ramal de Salud Pública 311/98. Cuba. Medicamentos de origen vegetal: Extracto fluidos y tinturas. Procesos tecnológicos. La Habana. Cuba.
123. -Ongena M, Duby F, Rossignol F, Fauconnier ML, Dommes J, Thonart P, 2004. Stimulation of the lipoxygenase pathway is associated with systemic resistance induced in bean by a non-pathogenic *Pseudomonas* strain. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17, 1009-1018
124. -Ongena M, Jourdan E, Schafer M, Kech C, Budzikiewicz H, Luxen A, Thonart P, 2005. Isolation of an n-alkylated benzylamine derivative from *Pseudomonas putida* BTP1 as elicitor of induced systemic resistance in bean. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18, 562-569
125. -Oliveros-Bastidas A., Macías F., Carrera C Marín., David y J. Molinillo. 2009. Exudados de la raíz y su relevancia actual en las interacciones alelopáticas. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 1, 198-213. España
126. -Olaya G, and Abawi G.S. 1993. Effect of water potential on germination, growth and sclerotial production of *M. phaseolina*. *Phytopathology* 83:1394.

127. 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
128. Olaya, G., Abawi, G., and Barnard, J. 1996. Influence of water potential on survival of sclerotia in soil on colonization of bean segments by *Macrophomina phaseolina*. Plant Disease. 80:1351-1354.
129. -(ONE), 2011. Oficina Nacional de Estadísticas Panorama Territorial. Cuba 2010.
130. -Opio, A. F. y Senguoba, T. 1992. Progress on bean pathology research in Uganda. Res. Anal. sobre Frijol. Vol. 17(1).
131. Pandey, M.; Pandey R.; Singh, V.; Pandey V.; Singh, U. 2002. Antifungal activity of 4'-dymethoxyisoplavone against some fungi. Mycobiology 30(1), 55-56.
132. -Papavizas, G. C. and Lewis, J. 1989. Effect of *Gliocladiun* and *Trichoderma* on damping-off and blight of snapbean caused by *S. rolfsii* in the greenhouse. Plant Pathology 38:277-286.
133. -Partridge D. 2007. *Macrophomina phaseolina*. A class project for PP 728. <http://www.cals.ncsu.edu/plantpath/> (consultado el 10 de mayo de 2008)
134. Pazos, Mabel y Annia Hernandez. 2000. Aislamiento e identificación de cepas nativas pertenecientes al género *Azospirillum* mediante técnicas moleculares. En programas y resúmenes XII seminario científico. Instituto nacional de Ciencia Agrícola. La Habana. Cuba.

135. Prasad K and Weigle J. L. 1975. Relation of phenil alanine ammonia lyase activity and phaseolin content with resistance to *Rhizoctonia solani* in *Phaseolus vulgaris* L. Proceedings, American Phytopathology Society, 2:49.
136. -Pichardo, S. 1990. Evaluación del PCNB en el control de la pudrición radicular causada por *R. solani* en el frijol común. Revista de la Escuela de Sanidad Vegetal. Vol. 1(3): 43-48. ISCA, Managua, Nicaragua.
137. -Pirajno G., Scarito G., Salamone A. 2004. Fungistatic activity of Essentials oils of *Laurus nobilis*, *Menthe x Piperita* , and *Ruta graveolens* against *Rhizoctonia solani* Kunn and *Sclerotinia sclerotium* (L.) de Bary. Journal of Plant Pathology 86 (4):295-340.
138. -Pupo, Elsie; Heredia, I. 1998. Lista de hongos asociados a la semilla. Boletín Técnico No. 1. IISV. Cuba. 47 p.
139. -Puente I. Mayra. 2007. Efectos de diversos extractos de plantas sobre los hongos fitopatógenos del suelo *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. UCLV.
140. -Pupo Y. 2010. Selección de extractos vegetales para el control de la alternariosis en *Solanum lycopersicum* L. y *Allium cepa* L. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad de Granma. Cuba. 92 p.
141. -Punja, Z.K. 1985. The biology, ecology and control of *S. rolfsii*. Ann. Rev. Phytopathology 23:97-127.

142. -Quintana, N.; Kassis, E. G.; Stermitz, F. R.; Vivanco, J. M. 2009. Phytotoxic compounds from roots of *Centaurea diffusa* Lam. *Plant Signaling and Behaviour* vol. 4(9-14).
143. Reed, M.L.E., y B.R. Glick. 2004. Applications of free living plant growth promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86:1-25.
144. - R., Andreu C., Perez C., Delgado I., M. Cupull. 2003. Efecto de *Trichoderma viride* como estimulante de la germinación, en el desarrollo de posturas de cafetos y el control de *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Centro Agrícola* 30(1):21-25.
145. -Rahman M A., Kadir, J., Mahmud, T. M., Abdul, R. y Begum, M. M. 2007. Screening of Antagonistic Bacteria for Biocontrol Activities on *Colletotrichum gloeosporioides* in Papaya. 6(1): 12-20.
146. -Raaijmakers, J. M., Paulitz, T. C., Steinberg, C., Alabouvette, C. Moënné-Loccoz, Y. 2008. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil*.
147. -Romero, A., M. Doval, A. Sturla y A. Judis 2013. Propiedades antioxidantes de compuestos polifenólicos presentes en extractos hidroalcohólicos de soja fermentada. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*, Universidad Nacional del Nordeste, Argentina.
148. -Robaina M., Puente M., Torres S. y L. Herrera. 2008. Determinación del efecto de *Stachytarpheta jamaicensis* (Gard) sobre el crecimiento *in vitro* de *Sclerotium rolfsii*. *Sc. P2. Fitosanidad*. Vol. 12(3). Septiembre.

149. Rezzonico F, Zala M, Keel C, Duffy B, Moënne- Loccoz Y, Défago G. 2007. Is the ability of biocontrol fluorescent pseudomonas to produce the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol really synonymous with higher plant protection? New Phytologist. 173:861-872.
150. -Rizner Hras, A., M. Hadolin., Z. Knez. y D. Baumann. 2000. Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extraction with α -tocopherol, ascorbylpalmitate and citric acid in sunflower oil. Food Chemistry. 229-333p.
151. -Romero, A, Doval M, Sturla A y Judis A 2003. Propiedades antioxidantes de compuestos polifenólicos presentes en extractos hidroalcohólicos de soja fermentada. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad Nacional del Nordeste, Argentina.
152. -Ruhua, W.; Zhou, B.; Zhang, F. 2005. Allelopathyc Effects of Roots Extracts of Eggs Plants on *Verticillium wilt* (*Verticillium dahliae*). Allelopathy Journal. vol. 15(1): 74 - 84.
153. Shaw, M, Liz J y Hooker J. 2006. Perception and modification of plant Àavonoid signals by rhizosphere microorganisms Environmental Microbiology 8(11): 1867–1880.
154. Samaniego, G.; S. Ulloa y S. Herrera. 1989. Hongos del suelo antagonistas de *Phymatotrichum omnivorum*. Rev. Mex. Fitopatología. 8:86-95.
155. -Saiman, L. y Siegel, J. 2004. Infection control in cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev., 17: 57–71.

156. -Sharma, S.C. y Sohi, H.S. 1981. Effects of different fungicides against *R. solani* root rot on french bean . Indian. Journ. of Micology and Plant Pathology 82:216-220. Res. Anal. sobre Frijol. 10(1):60
157. -Sosa A., Alvarez V., y M. González. 2006. Nuevos aislados de *Bacillus* spp. antagonistas a *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* y *Pythium aphanidermatum*. Fitosanidad. Vol. 10(1) 73-74.
158. Souza, B.F., Andrade, M.J.B. de, Fernández, G.M.B. 1980. Incidencia de podridao cinzenta do caule em feijao no norte cluminense. A. Lavoura 83(2): 34-40.
159. -Serrano, I.; Ragagnin de Menezes, C.; Franciscon, E.; da Costa dos Santos, E.; Durrant, L. R. 2010. Degradation of lignosulfonic and tannic acids by ligninolytic soil fungi cultivated under icroaerobic conditions. Brazilian Archives of Biology and Technology. vol. 53(3).
160. -Sosa-Pech M, Ruiz-Sánchez E, Mejía-Bautista M, Reyes-Ramírez A, Cristóbal-Alejo J, Valencia-Botín A, Gutiérrez-Alonzo O 2012. Acyividad antagonista in Vitro de aislados de la Clase Bacilli de la Península de Yucatán contra cuatro hongos fitopatógenos. Universidad y Ciencia. Trópico Húmedo. 8(3):279-284.
161. -Suganuma, N. H., K. Yamauchi, K. Yamamoto. 1995. Enhanced production of ethylene by soybean roots after inoculation with *Bradyrhizobiumjaponicum*. P1. Sci. 111: 163-168.
162. -Stefanova M. 2007. Introducción y eficacia técnica del biocontrol de fitopatógenos con *Trichoderma* spp. en Cuba. Págs. 75-79. IISV. Cuba. Fitosanidad. Vol. 11(3).

163. -Tharayil, N. 2009. To survive or to slay. *Plant Signaling and Behavior*. vol. 4(7): 580-583.
164. -Tanaka, K., Mizokami, H., Motomura, T. and Inada, M. 1993. Effect of soil submerging on the sclerotial survival of *S. rolf sii*. *Bull. of The Fac. of Agric Saga University*. 76:87-93.
165. -Tarakanta J, Tilak S y Nagendra S. 2005. SSR-based detection of genetic variability in the charcoal root rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. *Mycol. Res.* 109 (1):81–86.
166. Telek, L.; Freytag, G.F. 1985. Componentes fenólicos de las testas del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). In: Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de Cultivos Alimenticios PCCMCA. Reunión Anual (27, 1981, Santo Domingo, República Dominicana). Memorias
167. - Torres, LA; Wong, W; Miguel, A; Fernández, A; Amat, Z. 2001. Actividad antagónica de especies de *Bacillus* spp contra *Rizhooctonia solani* y *Sclerotium rolf sii*. *Revista Fitosanidad* Aceptado para publicación.
168. -Trujillo, I., D., Hernández, Ania y Heydrich, Mayra. 2004. Detección y cuantificación de ácido 3-indol acético en cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Bukholderia cepacia* aisladas de la rizosfera del maíz. VII Taller de biofertilización en los trópicos. XIV Congreso Científico: 211-212.
169. -Urquijo, P., Sardiñas, J. R. y Santaolalla, S. A. 1971. *Patología Vegetal Agrícola*. 2^{da} Edición. Madrid. Ediciones Mundi-Prensa. 755 p.

170. -Ulloa, JA, Rosas-Ulloa P, Ramírez JC y Ulloa BE 2011. El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. Revista Fuente. 3(8): 5-9.
171. -Van, A.; Van, B. D. J.; Tromp, M. N.; Griffioen, D. F. I.; Van, B. W. P.; Van, V. W. J. 1997. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. Free Radical Biology and Medicine. 20: 341-342.
172. -Vaillant D., Romero C., Ramos E., González M., Ramírez R. y González J. 2008. Efecto Inhibitorio de cinco monoterpenos sobre un aislado de *Rhizoctonia solani* en papa (*Solanum tuberosum* L.). Fitosanidad Vol 12. No 3. Pags.197-200. INISAV. Cuba.
173. -Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant Soil. 255: 571- 586.
174. Vidal L. 2002. Aislamiento y cuantificación de catequinas involucradas con la compatibilidad en injertos de guanábano (*Annona muricata*). Tesis de Doctorado. Universidad de Colima, México
175. -Wang, Z.; Christie, P.; Chen, Q.; Liu, X.; Xie, L.; Bai, C.; Li, X. 2006. Allelopathic Potential and Chemical Constituents of Volatile Oil From *Praxelis clematidea*. Allelopathy Journal. vol. 18(2): 225 -236.
176. -Whipps JM. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany, 52: 487-511.
177. -Winkel-Shirley, B 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. Curr. Opin. Plant Biol. 5: 218-223.

178. -Yang, Z.Z. 1992. Screening of *Bacillus subtilis* strain PR55 and test of its antifungal activities to *Rhizoctonia solani*. 53: 3409.
179. -Zhang, M.; Ling, B.; Kong, C.; Liang, G.; Rong, Y. 2005. Allelopathic Effects of Lantana (*Lantana camara* L.) on water Hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart) Solms). *Allelopathy Journal*. 15(1): 125 - 130.
180. -Zamora-Natera J. F, Bernal-Alcocer A., Ruiz-López M., Soto-Hernández M. Escalante-Estrada A. y H. Vibrans-Lindemann. 2005. Perfil de Alcaloides de Semillas de *Lupinus exaltatus* Zucc. (Fabaceae) y la Evaluación Antifúngica del Extracto Alcaloideo y Lupanina contra Fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 4(23):124-129.
181. -Zeidan, O., Elad, Y, Hadar, I. and Chet, I. 1986. Integrating onion in crop rotation to control *S. rolfii*. *Plant Disease* 70(5): 426-428.