

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

ANTAGONISMO MICROBIANO A *Phytophthora infestans* (Mont.)

De Bary, EN PAPA EN TOLUCA, MÉXICO.

T E S I S

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN
PROTECCIÓN VEGETAL**

PRESENTA

MANUEL HERMILO COYOTE PALMA

CHAPINGO, MÉXICO ENERO 2003.

CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO.



DIRECCIÓN ACADÉMICA
SECRETARÍA DE SERVICIOS ESCOLARES
SECRETARÍA DE ASUNTOS ADMINISTRATIVOS



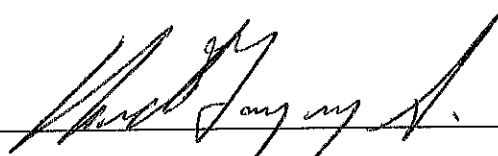
ANTAGONISMO MICROBIANO A *Phytophthora infestans* (Mont.)

De Bary, EN PAPA EN TOLUCA, MÉXICO.

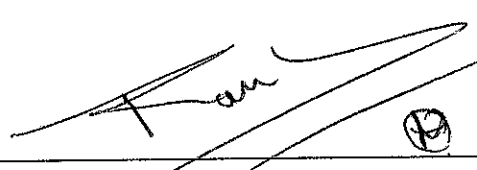
Tesis realizada por Manuel Hermilo Coyote Palma bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

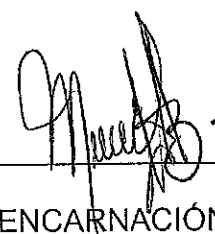
DIRECTOR:


DR. HECTOR LOZOYA SALDAÑA

ASESOR:


DR. RONALD FERRERA CERRATO

ASESOR:


M.C. MARIA ENCARNACIÓN LARA HERNÁNDEZ

AGRADECIMIENTOS

*A Dios y a la Virgen de Guadalupe

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por darme la oportunidad de crearme un proyecto de vida y superarme

*A la Universidad Autónoma Chapingo y al Departamento de Parasitología Agrícola, por ser una gran familia

*Al Programa Internacional Cooperativo del Tizón Tardío de la Papa, A. C. (PICTIPAPA), por el apoyo económico y de infraestructura brindado.

*Al Dr. Héctor Lozoya Saldaña por su amistad, enseñanza y apoyo que motivaron la realización de este trabajo.

*Al Dr. Ronald Ferrera Cerrato por su amistad y por las facilidades prestadas en el laboratorio de Microbiología del Colegio de Posgraduados

*Al M.C. Maria Encarnación Lara Hernández por su amistad y enseñanza

*A mis Maestros, por ser un ejemplo de superación a seguir

*A todos mis compañeros y amigos que de una u otra manera siempre estuvieron cuando los necesite

DEDICATORIA

A mi querida esposa ♡ **Eleazar Tenango Méndez**, por brindarme todo su cariño, comprensión y apoyo incondicional.

A mis Padres **Modesto Coyote Castañeda y Floriana Palma Flores**, gran ejemplo a seguir en mi vida, por quererme y comprenderme en todo momento.

A mis hermanos **Rosario Coyote Palma y Maximino Coyote Palma**, por ser como son y brindarme su apoyo incondicional

DATOS BIOGRÁFICOS

Manuel Hermilo Coyote Palma nacido el 9 de Febrero de 1976 y originario de Tepalcingo, Morelos. Cumplió con su educación básica en el Municipio anteriormente mencionado y desarrollo sus estudios medios superiores y superiores en la Universidad Autónoma Chapingo en la Especialidad de Parasitología Agrícola.

La experiencia laboral la inició en el ámbito de los fertilizantes sin dejar de lado el manejo fitosanitario de diversos cultivos, en la empresa Finagro Centro Sur S. A. grupo Fertinal en la parte Nororiente del Estado de Morelos

Posteriormente se desempeño laboralmente ejerciendo labores administrativas en PC y relacionadas a la agricultura en el Municipio de Tepalcingo, Morelos.

En el tiempo actual a la redacción de estas líneas se encuentra culminando con los estudios de Maestría en Protección Vegetal en la Universidad Autónoma Chapingo en el Departamento de parasitología Agrícola.

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA.....	ii
DATOS BIOGRÁFICOS.....	iii
LISTA DE CUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	xiii
SUMMARY.....	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivos.....	2
1.2. Hipótesis.....	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. La papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	4
2.2. Tizón tardío de la papa (<i>Phytophthora infestans</i> (Mont.) De Bary.).....	4
2.2.1. Historia y distribución.....	4
2.2.2. Importancia.....	5
2.2.3. Origen.....	6
2.2.4. Taxonomía.....	7
2.2.5. Características.....	7
2.2.6. Dispersión.....	8

2.2.7. Supervivencia e infectividad de <i>P. infestans</i> en el suelo	8
2.2.8. Síntomas.....	9
2.2.9. Infección de tubérculos hijos	11
2.3. Control de <i>P. infestans</i>	11
2.3.1. Control cultural	13
2.3.2. Control genético	14
2.3.3. Control físico	14
2.3.4. Control biológico con bacterias y hongos antagónicos a <i>Phytophthora infestans</i> en México.....	15
2.3.5. Control químico.....	17
2.4. Control biológico	19
2.4.1. Generalidades.....	21
2.4.2. Suelos supresivos y Fungistasis.....	24
2.4.3. Parasitismo.....	25
2.4.4. Mecanismo de control individual y múltiple de agentes biocontroladores	26
2.4.5. Supresión de enfermedades con agentes de biocontrol.....	26
2.4.6. Análisis de riesgo en la liberación de agentes de biocontrol..	28
2.5. Uso de bacterias antagónicas en el control biológico.....	28
2.6. Uso de <i>Trichoderma spp.</i> en el control biológico.....	30
2.7. Micorrizas en el control biológico.....	32
2.7.1. Ectomicorrizas.....	33
2.8. Perspectivas del control biológico	33
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35

3.1. Localización.....	35
3.2. Obtención de aislamientos de <i>P. infestans</i>	35
3.3. Obtención de los microorganismos antagonicos	36
3.4. Activación y preservación de microorganismos antagonicos	37
3.4.1. Incremento de inóculo bacteriano	37
3.4.1.1. Método de incubación – agitación.....	38
3.4.1.2. Método de fermentación.....	38
3.4.2. Conformación de las mezclas bacterianas antagonicas	40
3.4.3. Incremento de inóculo fúngico (<i>Trichoderma spp.</i>)	40
3.4.3.1. Conformación de la mezcla fúngica.....	41
3.5. Instalación de experimentos.....	41
3.5.1. Evaluación en laboratorio con el método de hojas desprendidas de papa	41
3.5.2. Evaluación de antagonistas en invernadero.....	43
3.5.3. Evaluación de antagonistas en campo	46
3.5.3.1. Experimento en campo 2001	47
3.5.3.2. Experimento en campo 2002.....	47
3.5.4. Evaluación de antagonistas en maceta-campo 2002.....	48
3.6. Evaluación de la población microbiana (UFC) en tubérculos de papa, en hojas de papa tratados y en mezclas diluidas.....	50
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
4.1. Evaluación en laboratorio con el método de hojas desprendidas de papa	52
4.2. Evaluación de antagonistas en invernadero 2001.....	56

4.3. Evaluación de antagonistas en campo.....	64
4.3.1. Experimento en campo 2001.....	64
4.3.2. Experimento en campo 2002.....	66
4.4. Evaluación de antagonistas en maceta-campo 2002.....	71
5. DISCUSIÓN GENERAL.....	81
6. CONCLUSIONES.....	83
7. LITERATURA CITADA.....	84
8. ANEXOS.....	94
Anexo 1. Medios de cultivo.....	94
Anexo 2. Fermentador.....	97
Anexo 3. Datos obtenidos en las diferentes evaluaciones realizadas.....	100
Anexo 4. Programas estadísticos utilizados.....	103
Anexo 5. Análisis de varianza de los diferentes experimentos realizados.....	104
Anexo 6. Graficas de condiciones ambientales de Toluca, México 2001 - 2002.....	107

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Cepas de bacterias seleccionadas y consideradas como antagónicas a <i>P. infestans</i>	36
Cuadro 2. Unidades Formadoras de Colonias (UFC) obtenidas en las diferentes pruebas realizadas en invernadero y campo.....	51
Cuadro 3. Experimento en invernadero 2001. Análisis de la producción de esporangios en los tratamientos aplicados para el control de <i>P. infestans</i>	58
Cuadro 4. Experimento en maceta-campo 2002. Análisis de la producción de esporangios en los tratamientos aplicados para el control de <i>P. infestans</i>	76

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Efecto de cepas bacterianas aisladas de filosfera y caulosfera sobre la infección de *Phytophthora infestans* en hojas de papa desprendidas inoculadas con esporangios. Las barras con la misma letra son estadísticamente iguales en base a la prueba de comparación de medias Tukey ($\alpha \leq 0.05$).....53
- Figura 2. Efecto de cepas bacterianas aisladas de filosfera y caulosfera de papa sobre la infección de *P. infestans* en hojas de papa desprendidas inoculadas con zoosporas. Las barras con la misma letra son estadísticamente iguales en base a la prueba de comparación de medias Tukey ($\alpha \leq 0.05$).....53
- Figura 3. Efecto antagónico de cepas bacterianas aisladas de rizoplaneo de papa sobre la infección de *P. infestans* en hojas de papa desprendidas inoculadas con esporangios. Las barras con la misma letra son estadísticamente iguales en base a la prueba de comparación de medias Tukey ($\alpha \leq 0.05$).....55
- Figura 4. Efecto antagónico de cepas bacterianas aisladas de rizoplaneo de papa sobre la infección de *P. infestans* en hojas de papa desprendidas inoculadas con zoosporas. Las barras con la misma letra son estadísticamente iguales en base a la prueba de comparación de medias Tukey ($\alpha \leq 0.05$).....55
- Figura 5. Efecto de los tratamientos sobre la severidad de *P. infestans* en invernadero durante el ciclo 2001.....56
- *- Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad
- ** - Cifras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha \leq 0.05$).
- Figura 6. Producción de esporangios de *P. infestans* por tratamiento las plantas de papa mantenidas en invernadero durante el ciclo 2001.....59

Figura 7. Efecto de los tratamientos aplicados durante el ciclo 2001 sobre el rendimiento y sanidad de tubérculos de papa producidos en condiciones de invernadero.....61

Figura 8. Efecto de los tratamientos aplicados en invernadero contra *Phytophthora infestans*, en follaje de plantas de papa. a) Mezcla A, plantas con daño moderado; b) Mezcla P, plantas con mínimos daños; c) Mezcla TR, follaje parcialmente sano; d) Biopak-F, follaje fuertemente dañado por el patógeno; e) Testigo Absoluto, plantas con ataque severo; f) Dimetomorf, plantas con el follaje totalmente sano.....62

Figura 9. Acercamiento del efecto de los diferentes tratamientos aplicados en invernadero contra *P. infestans*, en follaje de plantas de papa. a') Mezcla A, folíolos y tallos afectados; b') Mezcla P, puntas y bordes de hojas con daños; c') Mezcla TR, presencia de esporulación en hojas; d') Biopak-F, hojas, tallos secundarios y principales fuertemente dañados por el patógeno; e') Testigo Absoluto, plantas prácticamente destruidas por el patógeno; f') Dimetomorf, plantas con el follaje totalmente sano.....63

Figura 10. Efecto de los diferentes tratamientos sobre la severidad de *P. infestans* en las plantas de papa cultivadas en campo durante el ciclo 2001.....65

*- Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad

** - Cifras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha \leq 0.05$).

Figura 11. Efecto de los diferentes tratamientos sobre la severidad de *P. infestans* en las plantas de papa cultivadas en campo durante el ciclo 2002.....68

*- Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad

** - Cifras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha \leq 0.05$).

Figura 12. Efecto de los diferentes tratamientos en la fitosanidad inicial del follaje de las plantas de papa establecidas en campo durante el ciclo 2002. a) Mezcla RG1, b) Mezcla RG2, c) Mezcla TR, d) Biopak-F, e) Testigo Absoluto, f) Dimetomorf, g) Metalaxil; ninguno de los tratamientos mostró síntomas de *Phytophthora infestans*.....69

Figura 13. Efecto de los diferentes tratamientos en la fitosanidad terminal del follaje de las plantas de papa establecidas en campo durante el ciclo 2002. a) Mezcla RG1, planta con una mínima parte de follaje verde; b) Mezcla RG2, c) Mezcla TR, d) Biopak-F, e) Testigo Absoluto, en los cuatro incisos anteriores el follaje de la planta se encuentra totalmente dañado por el tizón tardío; f) Dimetomorf y g) Metalaxil, en ambos tratamientos se muestra la eficiencia de los fungicidas químicos de uso común en la protección de las plantas contra *P. infestans*.....70

Figura 14. Efecto de los diferentes tratamientos sobre la severidad de *P. infestans* en las plantas de papa cultivadas en maceta-campo durante el ciclo 2002.....71

*- Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad

** - Cifras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha \leq 0.05$).

Figura 15. Efecto de los tratamientos en la fitosanidad inicial del follaje de las plantas de papa llevadas del invernadero a campo durante el ciclo 2002. a) Mezcla RG1, b) Mezcla RG2, c) Mezcla TR, d) Biopak-F, e) Testigo Absoluto, f) Dimetomorf, g) Metalaxil; Ninguno de los tratamientos muestra ataque de *Phytophthora infestans*.....74

Figura 16. Efecto de los tratamientos en la fitosanidad final del follaje de las plantas de papa llevadas del invernadero a campo durante el ciclo 2002. a) Mezcla RG1, b) Mezcla RG2, c) Mezcla TR, d) Biopak-F, e) Testigo absoluto, en estos cinco tratamientos, *P. infestans* presentó prácticamente el mismo nivel de severidad en el follaje de las plantas de papa en contraste con el control ofrecido por los tratamientos químicos f) Dimetomorf y g) Metalaxil que muestran a las plantas libres del ataque del Tizón tardío.....75

Figura 17. Producción de esporangios de *P. infestans* por tratamiento en las plantas de papa establecidas en maceta-campo durante el ciclo 2002.....77

Figura 18. Efecto de los tratamientos aplicados en el experimento maceta-campo 2002 sobre el rendimiento y sanidad de tubérculos de papa producidos en condiciones de campo.....79

RESUMEN

ANTAGONISMO MICROBIANO A *Phytophthora infestans* (Mont.)

De Bary, EN PAPA EN TOLUCA, MÉXICO.

Se determinó la efectividad antagonica de 24 cepas bacterianas y tres de *Trichoderma* sobre *Phytophthora infestans* en follaje y tubérculo de papa de la variedad Alpha en Metepec, Toluca, México. En hojas desprendidas, inoculadas con esporangios o con zoosporas e incubadas en el laboratorio, todas las bacterias, individualmente y mezcladas, tuvieron efecto inhibitorio sobre el desarrollo de *P. infestans*, destacándose las cepas A38, A23, A44, R16 y R5, entre otras. Durante el ciclo del 2001, tanto en invernadero como en el campo, la mezcla de las cepas "P" fue la más efectiva en la supresión del patógeno y de producción de esporangios cuando la solución microbiana se usó tanto como tratamiento a la semilla como en aspersión foliar, aunque sin alcanzar el grado de control ejercido por los funguicidas químicos comerciales. En la siembra directa en el campo en el 2002 la mezcla RG1 indujo la mayor inhibición del área bajo la curva de progreso de la enfermedad, mientras que en maceta el mismo efecto fue ejercido por la RG2 y la menor cantidad de esporangios se produjo en la presencia de la mezcla TR y la mezcla RG1 indujo la mayor tuberización. Los antagonistas ejercieron mejor su efecto bajo invernadero que en el campo, aunque no alcanzaron el nivel de control de *P. infestans* de los funguicidas químicos. Con esto se abre la posibilidad de su uso en condiciones de invernadero y en otras áreas agrícolas con menor presión de la enfermedad que las del presente estudio.

Palabras clave: Control biológico, tizón tardío.

SUMMARY

MICROBIAL ANTAGONISM TO *Phytophthora infestans* (Mont.)

De Bary, IN POTATO IN TOLUCA, MEXICO.

The antagonistic effect of 24 bacterial isolates and three of *Trichoderma* over *Phytophthora infestans* in foliage and in potato tuber, cv. Alpha, in Metepec, México, was assessed. In detached leaves, inoculated either with sporangia or zoospores and incubated under laboratory conditions, all bacteria, individually or mixed, induced inhibition over *P. infestans* development, specially the isolates A38, A23, A44, R16, and R5, among other. During the 2001 growing cycle in both, greenhouse and field conditions, the mixture of isolates "P" was the most effective in the suppression of the pathogen and over sporangia production when the microbial solution was used both as seed-tuber treatment and foliage spray. However, this effect did not reach the level of control of the commercial chemical fungicides. In the direct-planted plot in the field in 2002, the mixture RG1 induced the best inhibition of the area under the disease progress curve, while in transplanted pots the same effect was observed by RG2, but the least sporangia was produced in the presence of the TR mixture and the treatment RG1 induced the highest tuberization. The antagonists behaved better in the greenhouse than in the field, but without reaching the control levels of the chemical fungicides. These results open the possibility to use the microbial mixtures under greenhouse conditions as well as in other agricultural areas with less disease pressure than the one of this study.

Key words: Biological control, late blight.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad conocida como tizón tardío de la papa, provocada por *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary, causa serios problemas en la producción de papa en todas las áreas productoras de este cultivo, especialmente durante la estación de lluvias. Es por tal razón que en la mayoría de las regiones que producen extensivamente papa, se considera que el control de este patógeno debe realizarse oportuna y correctamente para lograr un rendimiento altamente redituable (Niederhauser, 1956).

El control químico del tizón tardío se ha utilizado de manera excesiva, con muy buenos resultados, pero también ha provocado la contaminación del ambiente y sobre todo del suelo así como el incremento de los costos de producción.

Empíricamente, por décadas se ha observado en cultivos de papa del valle de Toluca que cuando los cultivos susceptibles al tizón tardío son deficientemente protegidos químicamente, la infección de tubérculo por el oomiceto no corresponde en severidad a la del follaje (Reddick, 1932; Lozoya y Hernández, 2001). Esto ha inducido a la conclusión de que el suelo es supresivo para dicho patógeno. En algunos estudios se han identificado a varios microorganismos como los posibles causantes de dicha supresión (Abato, 1998; Ferrera-Cerrato *et al.* 1998-1999; Torres, 1991).

Existen alternativas de carácter biológico para el control de muchos patógenos, entre estas se puede citar el uso de microorganismos tales como bacterias, actinomicetos y hongos. Muchos de estos agentes de control biológico pueden aislarse de suelos supresivos comprobando su efecto antagónico *in vitro* e

in vivo en invernadero, pudiendo utilizarse posteriormente para inducir supresividad al ser adicionados a ciertos sustratos (Malajczuk, 1983).

Debido a todo lo expuesto anteriormente y en seguimiento a investigaciones previas (Ferrera-Cerrato *et al.*, 1998-1999) se planteó la presente investigación con la finalidad de encontrar una alternativa biológica para el control del tizón tardío de la papa (*P. infestans*) en el follaje y tubérculo de plantas de papa, mediante la utilización de algunos microorganismos antagónicos (bacterias y hongos) a este patógeno previamente identificados para cubrir los siguientes objetivos y probar las hipótesis planteadas:

1.1. Objetivos:

- 1) Evaluar la efectividad antagónica de aislamientos bacterianos y fúngicos sobre *Phytophthora infestans* (Mont) De Bary. en follaje de papa, en diferentes ambientes (cámara húmeda, invernadero y campo).
- 2) Observar el efecto antagónico de las cepas bacterianas y fúngicas sobre el número de esporangios producidos por *P. infestans*.
- 3) Evaluar el efecto de los antagonistas en la producción de tubérculo.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. La papa (*Solanum tuberosum* L.)

En nuestro país, el cultivo de papa se inicio en la región ecológica de las Sierras o áreas montañosas de los estados de Tlaxcala, Puebla, Veracruz y México, donde la altura va de 2500 a 3400 msnm. En estos lugares se cultiva bajo un sistema rustico y de temporal a las variedades pertenecientes al grupo *Andigenum*, criollas, de ciclo largo y susceptibles al tizón tardío. El sistema de cultivo tecnificado y de riego se encuentra en los Valles, donde se cultiva principalmente la variedad holandesa Alpha (grupo *Tuberosum*). En promedio nacional se producen 15 ton ha⁻¹ pero en algunas regiones se obtienen hasta 40 o más ton ha⁻¹ (Anónimo, 1996). Este cultivo es atacado por un gran número de hongos, que en muchas ocasiones producen daños mínimos, pero que en otras causan daños muy graves ya que los patógenos causantes poseen una gran agresividad y un alto poder de dispersión (Calderoni, 1978).

2.2. Tizón tardío de la papa (*Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary.)

2.2.1. Historia y distribución

Antón De Bary, fue el primero en darle el nombre de *Phytophthora* ("Destructor de plantas") en 1876, cuando describió al tizón tardío de la papa, *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary, como la especie tipo para el nuevo género.

En escasamente un siglo desde la descripción de Antón de Bary, el interés y la investigación del género han sido extensos (Zentmyer, 1983).

Romero (1993) menciona que *Phytophthora infestans* apareció casi simultáneamente en Europa y Estados Unidos en la década de los 1830's, causando severos daños a la papa, particularmente en Irlanda. Fue introducido a Europa a través de tubérculos infectados procedentes de México y de aquí al resto del mundo (Niederhauser y Cervantes, 1953). Relacionado a esto Fry *et al.* (1993) proponen dos vías de migración hacia Europa: 1) el hongo pudo ser transportado desde México a los Estados Unidos y después a Europa o este pudo haber sido transportado directamente desde México a Europa. Desde entonces, continua siendo un problema serio en las zonas productoras de papa con clima fresco y húmedo en países tales como Rusia, China, Suecia, Holanda, Alemania, Inglaterra, Irlanda, Canadá, Estados Unidos, México, Colombia, Perú, Argentina y Chile (Romero, 1993).

2.2.2. Importancia

De las más de 30 enfermedades fungosas reportadas en la papa, el Tizón tardío es probablemente la de mayor importancia en el mundo. Es una enfermedad devastadora de follaje y tubérculos, reduciendo la cantidad y calidad del cultivo (Glass *et al.* 2001), (Aylor *et al.*, 2001; Glass *et al.*, 2001; Hooker, 1980). Esta enfermedad causa anualmente pérdidas que llegan a cientos de millones de dólares,

ya sea por los daños que le causa directamente al cultivo y por el costo de las medidas de control (Niederhauser, 1956).

2.2.3. Origen

Niederhauser (1991) señala al Sur de América y a México como los dos probables centros de origen de *Phytophthora infestans*. Por consiguiente en el trabajo realizado por Abad y Abad (1997) se cuestiona a México central como el centro de origen del tizón tardío, presentando una serie de evidencias que indican a los Andes del Sur de América como el probable centro de origen del tizón tardío de la papa, sin embargo, Goodwin *et al.* (1992) creen que México es el centro de origen del patosistema *P. infestans* – solanáceas. Esto lo sustentan debido a que únicamente en este país se encontraron los dos tipos de compatibilidad de *P. infestans*, además de que la diversidad genética por aloenzimas y los loci de virulencia son más frecuentes en México que en otro lugar. De igual manera Grünwald *et al.* (2000) consideran a las tierras altas de México central como el centro de origen del tizón tardío. Esta hipótesis la basan en una serie de pruebas como es el RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism – Amplitud de Polimorfismo por Fragmentos de Restricción), análisis de isoenzimas, frecuencia de grupos de compatibilidad y resistencia al metalaxyl, entre otras.

2.2.4. Taxonomía

Reino: Stramenopiles

División: Oomycota

Clase: Oomycetes

Orden: Peronosporales

Familia: Pythiaceae

Género: *Phytophthora*

Especie: *P. infestans*

(Wiley y Bons, 1996).

2.2.5. Características

P. infestans es heterotalico, con dos grupos compatibles de apareamiento (A1 y A2); presenta anteridio anfígino y un oogonio que son estructuras sexuales, las cuales al fusionarse producen oosporas apleróticas que funcionan como estructuras de supervivencia. Como estructura asexual presenta un esporangio el cual puede ser de forma ovoide, elipsoide o limoniforme, operculado en la base y produce zoosporas biflajeladas, y son los responsables de causar la infección en follaje y tubérculo. Cuenta con esporangióforos ramificados en simpodio compuesto de crecimiento indeterminado con unos característicos hinchamientos justo donde se une con el esporangio. La temperatura mínima y máxima para su crecimiento es de 4 y 20°C respectivamente, siendo la optima 20°C, con alta humedad relativa (valor cercano al 100%) para su desarrollo (Agrios, 1996; Fry *et al.* 1993;).

2.2.6. Dispersión

La dispersión aérea es importante en la epidemiología de muchas enfermedades de los vegetales y en el caso de *P. infestans*, la dispersión aérea de esporangios es el principal medio para el establecimiento de epidemias de tizón tardío en papa y jitomate. La supervivencia de esporangios durante la dispersión es crucial para el incremento espacial de la enfermedad. La esporulación y dispersión son generalmente favorecidas por condiciones limpias o despejadas y la supervivencia es favorecida por los nublados (Mizubuti *et al.*, 2000).

Aylor *et al.* (2001) demostraron que velocidades de viento de uno a dos m/s^{-1} son suficientes para remover una proporción considerable de esporangios de *P. infestans* desde el dosel o copa de las plantas de papa. Estas mismas velocidades del viento pueden transportar esporangios por 10 a 20 km en menos de tres horas. La transmisión exitosa de la enfermedad sobre estas distancias depende fuertemente de la viabilidad de los esporangios.

2.2.7. Supervivencia e infectividad de *P. infestans* en el suelo

Los órganos asexuales (esporangios, zoosporas y micelio) y órganos sexuales (oosporas) libres o asociados con tubérculos de papa o desechos, pueden encontrarse en el suelo en varios estados del ciclo de vida de *P. infestans*. Existen tres posibles fuentes de inóculo asexual originadas en el suelo; esporas producidas en el follaje que luego caen al suelo, micelio que sobrevive saprofiticamente en

desechos vegetales y micelio y esporangios que sobreviven en tubérculos voluntarios o de semilla de papa infectados (Andrison, 1995).

2.2.8. Síntomas

El oomyceto *P. infestans* ataca hojas, tallos y tubérculos llegando a destruir a la planta totalmente.

En hojas. Las lesiones en las hojas son muy variadas dependiendo de la temperatura, humedad, intensidad de la luz y variedad del hospedante (Hooker, 1980). En el campo, los primeros síntomas por lo general se presentan en las puntas o bordes de las hojas inferiores y consisten en pequeñas manchas de apariencia húmeda que van de un color verde claro u oscuro a un color pardo o negro. Dependiendo de la humedad existente, una aureola verde clara o amarilla de algunos milímetros de ancho suele separar al tejido muerto del sano. En tiempo húmedo estas se extienden formando zonas cafés y atizonadas que presentan bordes irregulares y en condiciones de alta humedad y temperaturas frías las lesiones se expanden rápidamente. La esporulación puede verse en el envés de las hojas como un moho blanco que corresponde a las hifas del micelio que rodea las lesiones. Cuando el clima se vuelve seco las lesiones dejan de extenderse y cuando el tiempo húmedo regresa el patógeno se reactiva y la enfermedad se desarrolla una vez más con gran rapidez (Agrios, 1996; Henfling, 1987).

En tallos. En los tallos se observan manchas alargadas, del mismo color que las de las hojas, pudiendo aparecer antes que en éstas (Calderoni, 1978). Las lesiones pueden desarrollarse por infección directa o por extensión a partir de las hojas, en los pecíolos y los tallos, donde se expanden longitudinalmente. Los tallos infectados se debilitan, pudiendo colapsarse y morir de la lesión hacia arriba (Henfling, 1987).

En tubérculos. Los tubérculos infectados presentan una decoloración superficial e irregular. Las lesiones necróticas, secas y de color marrón penetran desde la superficie en el tubérculo. Los patógenos secundarios (principalmente bacterias), pueden convertir a la pudrición seca típica de *P. infestans* que es casi inodora (sólo tiene un tenue olor a vinagre) en una pudrición blanda y mal oliente. El tizón tardío normalmente no se propaga durante el almacenamiento sin embargo, las infecciones secundarias pueden contaminar los demás tubérculos (Henfling, 1987).

Aunque Cox y Large (1960) reportan que la infección de los tubérculos de papa por *P. infestans* depende de las condiciones del suelo, textura, susceptibilidad del tubérculo, época de siembra en relación al ataque del tizón tardío y de las condiciones del clima en la época del cultivo, en todas las zonas productoras de papa el daño por tizón tardío en follaje se ve incrementado durante la estación de lluvias (Niederhauser, 1956).

Tubérculos-semillas infectados. En áreas donde se cultiva la papa sólo en determinadas temporadas, los tubérculos-semilla enfermos constituyen generalmente la fuente más importante de infección. Los tubérculos se infectan a través de sus

lenticelas y lesiones cuando, por acción de la lluvia, las esporas caen de las hojas infectadas y penetran en el suelo, especialmente cuando los tubérculos se forman en la superficie y no están suficientemente cubiertos por el aporque. En la cosecha, los tubérculos también pueden ser contaminados por contacto con el follaje infectado (Henfling, 1987).

2.2.9. Infección de tubérculos hijos

La esporulación de *P. infestans* en tubérculos infectados en el suelo puede proveer una fuente de inóculo para la infección de tubérculos hijos. La posible causa de la contaminación del cultivo de papa es el contacto directo que se pudiera dar entre tubérculos sanos y enfermos, provocando no solo infecciones en campo sino también pudriciones futuras durante el almacenamiento de los tubérculos, sin embargo, el inóculo producido en el follaje usualmente es considerado como la mayor fuente de infección para el tubérculo. No hay evidencia que indique que las oosporas puedan servir como inóculo secundario e infectar a tubérculos hijos (Andrivon, 1995).

2.3. Control de *P. infestans*

Craig (1991) reporta el uso de distintos métodos para controlar enfermedades en cultivos, tales como la resistencia genética, uso de agentes biológicos, prácticas culturales o la combinación de estos.

Resistencia genética: Reporta un control considerable de enfermedades mediante el uso de ciertos cultivares, híbridos, líneas mejoradas, plantas introducidas y otras selecciones.

Agentes biológicos: El biocontrol se basa principalmente en bacterias y hongos. Estos microorganismos pueden suprimir la enfermedad, incrementar la producción o ambos; en algunos casos en particular el propósito es la producción comercial de estos agentes biológicos.

Prácticas culturales: Algunas de estas prácticas evaluadas para el desarrollo de enfermedades son; efecto de la fuente de nitrógeno, uso de fertilizantes orgánicos, uso de compostas, mejoradores del suelo, rotación de cultivos y tratamientos de solarización, entre otros.

Stanghellini y Miller (1997) citan estrategias que han sido desarrolladas para el control de dos de los más notorios patógenos zoosporicos, *Phytophthora infestans* y *Plasmopara viticola*, causante del mildiu veloso de la uva, dichas estrategias incluyen el uso de cultivares resistentes y varios métodos culturales, físicos, biológicos y químicos. Sin embargo el uso de plaguicidas químicos ha sido y continua siendo el método de control más empleado (Grünwald *et al.*, 2002). Se puede controlar satisfactoriamente mediante la combinación de varias medidas sanitarias, variedades resistentes y aspersiones oportunas con compuestos químicos (Agrios, 1996).

2.3.1. Control cultural

Semilla sana y saneamiento. Debe utilizarse únicamente papas sanas para semilla. Todas las papas descompuestas o de desperdicio deben quemarse antes de la temporada de cultivo en la primavera, o bien deben matarse todos los brotes o tejidos verdes de esos tubérculos con herbicidas potentes. Las plantas procedentes de semillas de cultivos anteriores de la zona de cultivo deben ser destruidas ya que constituyen una fuente de infección por el tizón tardío de la papa (Agrios, 1996).

Rotación de cultivos y uso de barreras vivas. Se recomienda rotar al cultivo de papa con otros cultivos, preferentemente que no pertenezcan a la familia de las Solanaceas. El establecimiento de plantas altas no susceptibles al tizón tardío como el maíz funcionan como filtros o trampas para las esporas y pueden disminuir la cantidad del inóculo transportado por el aire. Se deben ubicar en los bordes de las parcelas y entre los surcos de papa (<http://arneson.Cornell.edu/Olplpath/Enfermed/Tizontrd/Pa610t5.htm>)

Uso de barreras físicas. Según Glass *et al.*, (2001), con el uso de una película de polietileno plástico negro y cubiertas textiles se reduce, la infección de *P. infestans* a los tubérculos de papa. Los tratamientos con cubiertas, sin embargo, proveen únicamente una protección parcial de tubérculos y en general deducen que es muy difícil el controlar el ataque del tizón en el tubérculo por medio del uso de barreras físicas.

2.3.2. Control genético

Barea et al. (1996) sostienen que aunque el uso de plantas resistentes es el método más prometedor para combatir plagas y enfermedades, en muchos casos estas variedades resistentes a un patógeno en particular son altamente susceptibles a otros, por esto el uso de plaguicidas no ha podido reemplazarse con un enfoque genético para el control de la enfermedad.

Uso de cultivares resistentes. Grünwald *et al.*, (2002) recomiendan a los cultivares Rosita y Norteña mismos que además de tener un alto nivel de resistencia al patógeno pueden producir de 20 a 30 ton ha⁻¹. Ambas variedades tuvieron menos del 20% de severidad de la enfermedad al final de la temporada sin una simple aplicación de fungicidas.

2.3.3. Control físico

Uso de radiación solar. Mizubuti *et al.* (2000) encontraron que la radiación solar reduce drásticamente la viabilidad de esporangios de *P. infestans* en días soleados pero no en días nublados. Sus resultados muestran que la supervivencia de esporangios de *P. infestans* durante días nublados fue más larga y más medible después de 2 horas y más estable a 3 horas de exposición. A diferencia de las condiciones soleadas, las condiciones de días nublados permiten una supervivencia más larga de esporangios. Sin embargo la esporulación puede ser limitada durante condiciones nubladas, porque la formación de rocío es menor durante días

nublados comparado con condiciones de días despejados. Aunque la humedad relativa y la temperatura del aire afectan la supervivencia, la radiación solar es con mucho la más importante determinante de supervivencia (Aylor *et al.*, 2001).

Mizubuti *et al.* (2000) indican que exposiciones de esporangios durante un periodo de 3 horas en días soleados (radiación solar $> 600 \text{ W/m}^2$) reduce drásticamente su germinación. Después de una hora de exposición solar, la viabilidad de esporangios decreció en un 95% aproximadamente, el tiempo exacto de exposición para lograr esto fue de 66 minutos.

El efecto de la radiación solar total en la supervivencia de esporangios bajo condiciones de campo probablemente interactúa con otros factores de exposición, tales como la temperatura y la humedad relativa, y los resultados obtenidos bajo condiciones de laboratorio pueden no estar representados correctamente en situaciones de campo. Algunos autores sugieren que la luz del sol reduce la separación de esporangios (Mizubuti *et al.*, 2000).

2.3.4. Control biológico con bacterias y hongos antagónicos a *Phytophthora infestans* en México.

Algunas investigaciones han demostrado la existencia de microorganismos antagónicos (bacterias y hongos en su mayor parte) en el suelo del Valle de Toluca, ejerciendo antagonismo en diferentes niveles sobre *P. infestans* durante la producción de tubérculos de papa. Esto respalda la conclusión de que existe

supresividad biológica a *P. infestans* en los suelos mencionados (Abato,1998; Ferrera-Cerrato *et al.*,1998-1999; Torres,1991).

Ferrera-Cerrato *et al.* (1998-1999) mencionan que el número de microorganismos con capacidad antagónica varía en función a la variedad, etapa fenológica de la planta y zona de muestreo (rizosfera, filosfera, caulosfera, rizoplaneo y tuberosfera), en tubérculos de papa de la variedad Maria obtuvieron únicamente un tipo de bacteria que presento antagonismo contra *P. infestans*. Doce cepas con capacidad antibiótica contra el oomiceto fueron aislados de plantas en desarrollo vegetativo. En tubérculos en etapa de iniciación, fueron aisladas 22 colonias de bacterias antibióticas, nueve de ellas provenientes de la variedad Norteña y 13 colonias fueron de Rosita. Las bacterias con el más alto nivel de antagonismo (valor - 3) fueron encontradas en la variedad Norteña. En la etapa de cosecha el más alto numero de bacterias antibióticas aisladas fue de la superficie de tubérculos de las variedades Norteña y Rosita, 50 aislamientos de hongos seleccionados y purificados de la endorizosfera fueron identificados principalmente como *Trichoderma*, *Fusarium*, *Rhizopus* y *Penicillium*. Alrededor de 34% de estos microorganismos inhibieron el desarrollo del patógeno *in vitro* a través de antibiosis y el resto por micoparasitismo.

Se ha observado que tanto en la rizosfera, rizoplaneo y tuberosfera de algunas variedades de papa se encontraron cepas bacterianas con capacidad antibiótica hacia *P. infestans*. Aunque algunas de ellas presentaron un alto nivel de antagonismo al patógeno, también indujeron fitotoxicidad en las hojas desprendidas empleadas. Cabe señalar que solo un porcentaje mínimo de estas cepas han sido

evaluadas con buenos resultados para la implementación del control biológico (Alarcón *et al.*, 1999; Ferrera-Cerrato *et al.*, 1999).

Espinosa-Ramos *et al.* (1999) aislaron 39 cepas de hongos de la endorrizosfera de *Solanum sp.* y algunas de ellas presentaron efecto de antibiosis a *P. infestans* y otras tuvieron capacidad micoparasítica. Los autores concluyen que la presencia de hongos antagonistas a *P. infestans* esta en función del hospedante y grado de susceptibilidad al patógeno.

2.3.5. Control químico

Los funguicidas, si se aplican adecuadamente, pueden mantener bajo control al tizón tardío de la papa. Se recomienda iniciar las aplicaciones químicas cuando las plantas tengan una altura de 15 a 30 cm. Se señala que las aspersiones deben realizarse cada 5 –10 días cuando el tiempo sea húmedo, brumoso o lluvioso y cuando las noches sean moderadamente frías (Agrios, 1996).

Sin embargo, debido a lo dudoso que resulta la variación meteorológica y biológica en la agricultura, la producción de algunos cultivos involucra tener una alta confianza en la aplicación de fungicidas para controlar a ciertas enfermedades (Shtienberg *et al.*, 1994).

Recientemente nuevos productos para el control de enfermedades causadas por *Phytophthora* han sido lanzados al mercado. Estos grupos de fungicidas con sus respectivos representantes son:

Carbamatos, incluye a prothiocarb HCl y propamocarb; Cianoacetamidas-Oxime, incluye al cymoxanil; Etil fosfitos, incluye al fosetil-Al aunque algunas especies de *Phytophthora* son relativamente insensibles; Acilalaninas y compuestos relacionados, estos son fuertes protectantes y tienen actividad curativa, su más efectiva molécula es el metalaxil. Estos nuevos fungicidas para controlar a *P. infestans* ofrecen gran flexibilidad de uso por su alta actividad fungitóxica, rápido movimiento por hojas y tallos verdes después de la aplicación foliar o por las raíces después de ser aplicados al suelo, su transporte es apoplástico y/o algunas veces es simplástico y tienen actividad curativa (Schwinn, 1983).

En el valle de Toluca bajo circunstancias normales, deben realizarse de 16 a 24 aplicaciones de fungicidas por ciclo de cultivo en cultivares Alpha o Atlantic, ya que ambos son susceptibles al patógeno, pero estos comprenden alrededor del 50% del hectareage de papa. Esta circunstancia se da por que este lugar presenta todas las condiciones propicias u optimas para el desarrollo de la enfermedad (Grünwald *et al.*, 2000).

Según Sujkowski *et al.* (1995) los fungicidas chlorothalonil, cymoxanil y metalaxyl son ampliamente usados en México para suprimir al tizón tardío. El primero se empezó a utilizar en la década de los 70's, es de amplio espectro de acción no sistémico e inhibe todos los estados de crecimiento del oomiceto por

contacto y ha sido usado por muchos años en el manejo de del tizón tardío sin generar problemas de resistencia-fungicida. El segundo fungicida es relativamente nuevo en México, iniciando sus ventas en 1991, y exhibe acción sistémica local en contra de Oomycetos, siendo el crecimiento micelial más sensible que la germinación de las zoosporas. El metalaxil ha sido usado desde los primeros años de los 80's y la resistencia a este es común. Este fungicida es específico para Oomycetes, es sistémico, afecta crecimiento micelial pero no la integridad de la zoospora y puede inhibir RNA polimerasa. En la practica el chlorothalonil es usado exclusivamente como un protectante, pero el cymoxanil y metalaxil tienen "actividad post infección".

Las mezclas o alternancias de productos con diferentes modos de acción han demostrado su eficiencia tanto en el control de la enfermedad como para evitar la resistencia del microorganismo a los fungicidas (Dossier *et al.*, 1990; Lozoya y Hernández, 2001b; Mayton *et al.*, 2001).

2.4. Control biológico

Se define al control biológico de enfermedades de las plantas como "La reducción de la densidad de inóculo o de las actividades inductoras de enfermedad de un patógeno o parásito en su estado activo o dormante por uno o más organismos, que se logra de manera natural o a través de la manipulación del ambiente, hospedante, antagonistas o por la introducción de uno o más antagonistas" (Baker y Cook, citados por Utkhede, 1996). Se han utilizado bacterias,

hongos (filamentosos y micorrízicos) y levaduras, necesitando cada microorganismo fuentes de abastecimiento de nutrientes. La implementación de este método de control natural ha sido para la obtención de productos agrícolas de calidad sin perjudicar al ambiente, aunque dichos agentes de biocontrol tienen sus ventajas y restricciones (Dunne *et al.*, 1996; Hoitink y Boehm, 1999; Punja, 1997). Por ejemplo se ha considerado a los sistemas de producción intensiva (invernaderos) como los únicos nichos para el control biológico eficiente. Esto se debe al control del ambiente, al alto valor de los cultivos y al limitado número de fungicidas registrados. Se han reportado varios microorganismos como ingredientes activos de formulaciones comerciales que se utilizan para controlar agentes fitopatógenos en el suelo y follaje (Paulitz y Bélanger, 2001; Lindow *et al.*, 1996).

Malajczuk (1983) afirma que los microorganismos interactúan como una consecuencia de su crecimiento y desarrollo en el medioambiente, estas interacciones pueden ser benéficas o perjudiciales, e indica que los procesos son:

Antibiosis. Es la producción de antibióticos ó metabolitos tóxicos que son volátiles o no volátiles, que causan lisis.

Parasitismo. Involucran actividad de contacto entre microorganismos resultando en la degradación hifal de células o la microfagia de todos los propágulos.

Competencia. Puede ser usada ampliamente para denotar factores que favorecen una especie sobre otra, pero en un sentido limitado dos o más microorganismos pueden demandar el mismo recurso en exceso y de inmediato abastecerse. Clark, citado por Malajczuk (1983) define a la competencia como "El efecto dañino de un

organismo sobre otro a causa de la utilización o removimiento de algunos recursos del ambiente”.

Agrios (1996), por otro lado, menciona cuatro posibles mecanismos:

1) parasitismo directo y muerte del patógeno, 2) competencia con el patógeno por el alimento, 3) efectos tóxicos directos sobre el patógeno por medio de sustancias antibióticas liberadas por el antagonista y 4) efectos tóxicos indirectos sobre el patógeno por sustancias volátiles, como el etileno, liberadas por las actividades metabólicas del organismo antagonista.

El control biológico de fitopatógenos ha sido observado como un fenómeno natural y mientras que ha sido efectivo y ampliamente aceptado contra insectos y malezas, en el caso de los fitopatógenos del suelo se ha encontrado con varios obstáculos (Steddom *et al.*, 2002b).

2.4.1. Generalidades

Stanghellini y Miller (1997) señalan que para el control de importantes plagas agrícolas como fitopatógenos, malezas e insectos es necesario utilizar estrategias diferentes a los plaguicidas para disminuir la contaminación y la amenaza que representan los residuos de plaguicidas en los alimentos. Una de las principales es el control biológico, que no es más que el uso de microorganismos antagónicos (bacterias y hongos) para controlar directa o indirectamente a las plagas blanco. Mencionan que la implementación y éxito del control biológico depende de tener un

conocimiento total de la ecología y biología tanto de la plaga objetivo como del agente de control; además el conocer el mecanismo específico de antagonismo microbial permite obtener el máximo de eficacia y citar a la competencia, hiperparasitismo, predación y la producción de metabolitos extracelulares tales como antibióticos, cianuro de hidrógeno (HCN) y sideróforos como mecanismos de control ya documentados para el control de fitopatógenos.

Guetsky *et al.* (2002) indican que en varias ocasiones el control biológico como medida no química se ha reportado tan efectivo como el control químico, aunque su eficacia de control es ocasionalmente inadecuada y la variabilidad en esta llega a ser alta y es por eso que el lograr entender los mecanismos involucrados en el control biológico puede aumentar la eficacia y reducir la inconsistencia y variabilidad, estos mecanismos son diversos tales como: resistencia inducida, competencia por nutrientes y secreción de compuestos inhibitorios. De igual manera sugiere algunas estrategias para reducir variabilidad en el control biológico y para incrementar su eficacia en condiciones de campo:

- i) Combinando los agentes biocontroladores con otras medidas que son menos afectadas por condiciones externas (p.e. funguicidas químicos) en alternancia o basados en un cierto esquema racional de acuerdo al pronóstico de las lluvias.
- ii) Desarrollo de agentes de biocontrol bastante efectivos aun bajo un amplio rango de condiciones bióticas y abióticas.

- iii) Aplicación de varios agentes biocontroladores simultáneamente, esto por poseer diferentes requerimientos ecológicos para sobrevivir, crecer y activarse.

Mathre *et al.* (1999) mencionan que los microorganismos juegan un papel enormemente importante en el control de enfermedades vegetales y como suele ocurrir, los antagonistas residentes pueden ser manejados o explotados hasta alcanzar los resultados deseados como se indica:

- a) Antagonistas semejantes al patógeno podrían ser adaptados al hospedero vegetal a ser protegido, en adición a su habilidad de inhibir o competir con el patógeno blanco.
- b) Antagonistas que pueden ser aplicados directamente y precisamente a la infección no necesitan ser tan hábiles para dispersarse o para persistir igual en el ambiente.

Steddom *et al.* (2002a) concluyen que uno de los problemas más grandes en el control biológico es mantener una población alta de un agente de biocontrol activo por todo el periodo de actividad de una enfermedad y deduce que debido a esto el tiempo de aplicaciones de agentes de biocontrol es muy importante, demostrando la utilidad de las aplicaciones repetitivas como estrategia para la liberación de agentes de biocontrol a grandes escalas comerciales en campo.

2.4.2. Suelos supresivos y Fungistasis

La ocurrencia de situaciones donde la vegetación no se enferma en presencia de patógenos, o donde la probabilidad de introducción de patógenos es alta, bajo condiciones climáticas que son normalmente optimas para su desarrollo, proveen la mejor evidencia del potencial que poseen las técnicas de control biológico y/o cultural. La inospitabilidad de ciertos suelos a algunos fitopatógenos es tal que estos pueden no establecerse algunas veces, o si lo hacen e inician la enfermedad esta disminuye en severidad conforme avanza el cultivo. Tales suelos son referidos como suelos "Supresivos", opuestos a "Conductivos" suelos donde, hay condiciones favorables y el hospedante es susceptible al patógeno desarrollándose la enfermedad. Los suelos supresivos han sido llamados también resistentes, inmunes, intolerantes y antagonisticos (Shea y Broadbent, 1983).

La microflora del suelo puede producir sustancias inhibitorias de la germinación de propágulos fungosos, llamándose a esta inhibición "fungistasis" la cual es el resultado de la actividad microbial que puede ser anulada por la esterilización del suelo o reestablecerse por la colonización de cualquier bacteria y por la adición de nutrientes especialmente carbón orgánico o exudados radicales. El mecanismo de fungistasis en el suelo tiene implicaciones para la microbiología del suelo generalmente y para el control específicamente de hongos fitopatógenos del suelo y se ha visto que esta actividad se da mayormente en suelos alcalinos que en suelos ácidos (Liebman y Epstein, 1992).

2.4.3. Parasitismo

Baker (1987) manifiesta que eventualmente el parasitismo puede culminar en la muerte de las células hospedantes. Por otra parte, el micoparasitismo ha sido explotado en el control biológico de hongos fitopatógenos para reducir substancialmente sus densidades de inóculo y además justo como en las relaciones de enfermedades de plantas superiores, ahí puede haber numerosos tipos de interacciones de hospedante-patógeno en micoparasitismo, desde patogenicidad sin parasitismo hasta parasitismo sin patogenicidad. La primera relación puede cumplirse por la producción de sustancias tóxicas. Hongo y plantas hospedantes pueden ser totalmente susceptibles al ataque de patógenos cuando son jóvenes pero son resistentes cuando maduran.

Cooke, citado por Baker (1987) dice que utiliza al termino de hiperparasitismo, para describir el estado de simbiosis antagonista entre hongos, describe únicamente estas situaciones: "Cuando un hongo es antagónico a otro el cual es por si mismo antagónico a un tercer organismo".

Cook *et al.* (1996) identificaron cuatro temas relacionados a los efectos adversos que pueden presentar los agentes microbiales de biocontrol: i) desplazamiento por competencia, ii) alergenicidad humana, iii) toxigenicidad de metabolitos, y iv) patogenicidad.

planta, el patógeno, el agente de biocontrol, la comunidad microbiana alrededor de la planta y el ambiente físico.

El grado de supresión de la enfermedad alcanzado por competencia es regido por numerosos factores tanto bióticos (especies hospederas y estado nutricional) y abióticos (temperatura y humedad relativa) y su eficacia no puede ser predecida correctamente. La supresión de enfermedades por el uso de agentes de biocontrol es la manifestación sustentada de las interacciones dadas entre la planta, patógeno, agente de biocontrol y ambiente. Pero a pesar del potencial en el uso de agentes de biocontrol en aplicaciones a la agricultura, el control biológico es una de las áreas más pobremente entendidas de las interacciones planta-microorganismo (Guetsky *et al.*, 2002; Bao y Lazarovits, 2001).

Lara y Ferrera-Cerrato (2002) comentan de acuerdo a varios autores que el fenómeno de antibiosis es uno de los principales mecanismos de acción que poseen algunos agentes de biocontrol como las bacterias y hongos. Este mecanismo tiene como base la producción de metabolitos de tipo antibióticos, afectando estos al patógeno en alguno de sus procesos fisiológicos como inhibición de la esporulación, reducción del crecimiento micelial, alteración en la actividad metabólica bacteriana, retardación en la germinación de esporas, inhibición de la melanización, germinación y supervivencia de esclerocios, y específicamente en los Oomycetes, detiene su crecimiento y deforma el tubo germinativo, lo que evita la proliferación de la enfermedad.

2.4.6. Análisis de riesgo en la liberación de agentes de biocontrol

La introducción de muchos agentes de biocontrol que han sido o no genéticamente modificados necesitan de evaluaciones costosas en su impacto ambiental, ya que después de ser introducidos, estos agentes en el suelo pueden comportarse genéticamente estables y podrían sobrevivir y mantenerse por sí mismos para tener una actividad de biocontrol adecuada y no intervenir de ninguna manera con la microflora residente. Se sabe que una población microbiana incrementada artificialmente posee un potencial de riesgo el cual debe ser evaluado para bacterias, hongos entomopatógenos y micoherbicidas. La estructura de una comunidad microbiana puede sufrir alteraciones tanto cualitativas como cuantitativas al introducir microorganismos antagonistas, esto se ha considerado como uno de los aspectos más difíciles de evaluar en los estudios de riesgo. Por tal razón las cepas de antagonistas deben ser inofensivas a las plantas donde se aplican al igual que a los insectos no plaga y a otros cultivos, ya que estos podrían ser expuestos intencionalmente (Lodovica *et al.*, 1995).

2.5. Uso de bacterias antagónicas en el control biológico

Weller (1998) señala que los agentes bacteriales de control mejoran el crecimiento vegetal por medio de la supresión de patógenos superiores e inferiores. Estos últimos son parásitos o saprofitos que dañan principalmente tejidos jóvenes, tales como pelos radicales, meristemos y células corticales y sus síntomas no son

visibles. Por otro lado se ha demostrado la intervención de rizobacterias induciendo resistencia sistémica contra hongos, bacterias y virus en varios cultivos (Van Loon *et al.*, 1998).

Maurhofer *et al.* (1992) manifiestan que varias pseudomonas fluorescentes suprimen a una variedad de enfermedades causadas por patógenos del suelo y uno de los mecanismos involucrados en la supresión de enfermedades es la producción de metabolitos antifúngicos por cepas de *Pseudomonas*, ya que identificaron dos metabolitos antibióticos como pyoluteorin (Plt) y 2,4-diacetil-floroglucinol producidos por *Pseudomonas fluorescens* cepa CHA0.

Como se mencionó anteriormente, los microorganismos producen compuestos volátiles y no volátiles que pueden intervenir en la supresión de muchos fitopatógenos, como la inhibición de *Botrytis cinerea* con *Pseudomonas florescens* y *Bacillus pumilus* en el cultivo de fresa, precisamente por la secreción de ciertos compuestos volátiles con efectos fungistáticos. Por otro lado la antibiosis no volátil ha sido descrita en varios sistemas, en los que se han aplicado aislamientos bacteriales como agentes de biocontrol, reportándose péptidos antifúngicos secretados por *Bacillus subtilis* como los responsables de controlar a ciertos fitopatógenos como *Monilia fruticola* causante de la petrificación de frutos (Guetsky *et al.*, 2002).

En algunos casos pueden utilizarse myxobacterias, pero aunque estas producen un amplio rango de antibióticos y enzimas líticas que ayudan a su

habilidad de atacar o suprimir a otros microorganismos, se le ha dado poca atención al papel que juegan o tienen en la agricultura (Bull *et al.*, 2002).

Bin *et al.* (1991) sostienen que algunas cepas de *Pseudomonas* fluorescentes inhiben muchos hongos del suelo, incluyendo a *Trichoderma* spp debido a la producción de sideróforos o compuestos antibióticos.

2.6. Uso de *Trichoderma* spp. en el control biológico

Aunque varias especies de *Trichoderma* han sido reportadas con exitosa inhibición del crecimiento y desarrollo de patógenos, *T. harzianum* Rifai es la que se menciona con mayor frecuencia, principalmente contra hongos del suelo (Benhamou y Chet, 1993; Bin *et al.*, 1991; Dandurand y Knudsen, 1993; Green y Jensen, 1995; Guetsky *et al.*, 2002; Knudsen y Bin, 1990; Roiger y Jeffers, 1991).

Harman (2000) afirma que los mecanismos por medio de los cuales actúan los aislamientos de *Trichoderma harzianum* son los siguientes:

- *Micoparasitismo
- *Antibiosis
- *Competencia por nutrientes y espacio
- *Tolerancia a estrés a través de incremento de raíz y desarrollo de la planta
- *Resistencia inducida
- *Solubilización y secuestro de nutrientes inorgánicos
- *Inactivación de enzimas de patógenos

De estos los tres primeros considerados siempre como los que utiliza el hongo como mecanismos de acción:

Micoparasitismo. Ha sido considerado como importante mecanismo de acción de biocontrol por *Trichoderma spp.* Este es un mecanismo complejo que involucra el crecimiento del agente de biocontrol alrededor del hongo blanco, es decir *Trichoderma* ataca la hifa del patógeno y finalmente ataca y disuelve la pared celular del hongo blanco por medio de actividad enzimática, la cual puede ser asociada con penetración física de la pared celular.

Antibióticos. Han sido ampliamente sugeridos en el biocontrol por *Trichoderma*. Sivasithamparam y Ghisalberti, citados por Harman (2000) listaron 43 sustancias producidas por *Trichoderma spp.* que tienen actividad antibiótica (enzimas no son incluidas).

Competencia. La competencia por espacio o nutrientes ha sido considerada uno de los "clásicos" mecanismos de biocontrol por *Trichoderma spp.*

El micoparasitismo es un proceso complejo que requiere de la producción de enzimas que digieren la pared celular fungosa y se concluye que las especies de *Trichoderma spp.* son las más estudiadas de los hongos para el control de enfermedades de los vegetales, indicando que las enzimas quitinolíticas tienen que estar implicadas en la habilidad de *Trichoderma spp.* para actuar como agente de biocontrol (Lorito *et al.*, 1993a,b).

La manipulación genética de cepas de *Trichoderma spp.* incrementa su capacidad de biocontrol y el micoparasitismo ha sido propuesto como el mejor mecanismo de acción; se conoce que *Trichoderma spp.* es un eficiente productor de polisacaridasas, proteasas y lipasas las que pueden ser usadas para la degradación de paredes celulares de los hongos blancos (Lorito *et al.*, 1994).

2.7. Micorrizas en el control biológico

Los hongos micorrizas arbusculares son biotrofos obligados que tienen un amplio rango de hospedantes y que promueven el crecimiento vegetal, mediante el incremento de la eficiencia de la asimilación de nutrientes. Tales efectos son, sin embargo, difíciles de generalizar, porque la efectividad micorrizal esta modulada por diferentes interacciones planta-hongo. Además las interacciones competitivas entre los hongos micorrizas arbusculares y algunos microorganismos del suelo pueden reducir considerablemente el inóculo micorrizal, induciendo marcados desordenes en las plantas dependientes de micorrizas. *Trichoderma spp.* puede causar efectos adversos en los hongos micorrizas arbusculares mediante i) reconocimiento y penetración local del antagonista dentro de las esporas micorrizales, ii) proliferación activa de células antagonistas en hifas micorrizales, iii) liberación de los antagonistas a través de células hifales moribundas (Rousseau *et al.*, 1996).

2.7.1. Ectomicorrizas

Los hongos ectomicorrízicos tienen el propósito de contribuir a la protección de las raíces de las plantas de patógenos por proveer una barrera física a la penetración del patógeno, por la secreción de anticuerpos inhibitorios a los patógenos, por la utilización de los carbohidratos en exceso, por favorecer microorganismos que protegen a la rizosfera y por inducir en el hospedante inhibidores de los patógenos. La efectividad de ectomicorrizas en prevenir infecciones puede depender de la condición de la raíz micorrizada en adición al tipo de hongo micorrízico (Shea y Broadbent, 1983).

Estos hongos ectomicorrízicos a causa de la morfología de su envoltura física pueden ocupar muy bien los sitios de infección normales del patógeno (Whipps, 2001).

2.8. Perspectivas del control biológico

Berger *et al.* (1996) sostienen que los métodos de biocontrol podrían proveer una alternativa o reducir el uso de fungicidas en invernaderos con alta humedad y comentan que varios antagonistas microbiales incluyendo cepas de *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Enterobacter* y cepas de hongos de los géneros *Gliocladium*, *Pythium* y *Trichoderma* han mostrado actividad de biocontrol contra enfermedades de ahogamiento, siendo alguno de estos desarrollados dentro de productos comerciales.

El control biológico ha sido propuesto para reemplazar el control químico de enfermedades de plantas o para el manejo de enfermedades que no son económicamente controladas con químicos. Aunque hay muchos avances en el conocimiento de los mecanismos de control biológico, los agentes de biocontrol para fitopatógenos han tenido éxito comercial limitado, y la falla en la introducción de agentes de biocontrol para establecerse en el suelo o en las raíces hospedantes se ha asociado con el deficiente control de la enfermedad (Steddom *et al.*, 2002a).

En este contexto se menciona también que el reemplazamiento de plaguicidas por el uso de microorganismos biocontroladores para proteger plantas contra patógenos (bacterias, hongos y nematodos) puede considerarse como un componente clave en el desarrollo de una agricultura sustentable, económicamente provechoso con una mínima contaminación medioambiental (Barea *et al.*, 1996; Hagedorn *et al.*, 1993).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización

La presente investigación fue desarrollada en los laboratorios de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo y de Microbiología del Colegio de Postgraduados, así como en el laboratorio, invernadero y campo del Programa Internacional Cooperativo del Tizón Tardío de la Papa, A. C. (PICTIPAPA, A.C.) en Metepec, Edo. de México.

3.2. Obtención de aislamientos de *P. infestans*

Los aislamientos 98a 22/1(A1), 98a 10/2 (A2) y 98b 1/1 (A1) de *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary de patogenicidad comprobada empleados en la fase de laboratorio e invernadero, fueron proporcionados por el Programa Internacional Cooperativo del Tizón Tardío de la Papa, A. C. (PICTIPAPA, A.C.) en Metepec, Edo. de México.

AISLAMIENTO	TIPO DE COMPATIBILIDAD	PERFIL IZOENZIMATICO	
		PEP	GPI
98a10	A2	100/100	100/100
98a22	A1	100/100	100/122
98b 1	A1	100/100	86/100

Población a (no asperjada con chlorothalonil)

Población b (asperjada con ¼ de chlorothalonil)

3.3. Obtención de los microorganismos antagónicos.

Los microorganismos (hongos y bacterias) considerados a nivel *in vitro* como antagónicos a *P. infestans* (24 bacterias y tres hongos) fueron proporcionados por el Área de Microbiología de suelos del Colegio de Postgraduados y forman parte de su Colección Microbiana (Ferrera-Cerrato *et al.* 1998-1999). Las cepas bacterianas fueron aisladas originalmente de suelos del Valle de Toluca a partir de la rizosfera, rizoplano, caulosfera y/o filosfera de plantas de papa de tres diferentes variedades de papa (Alfa, Norteña y Rosita) durante 1998 y 1999 como parte de un Proyecto de Cooperación entre el PICTIPAPA, A.C. y el área de Microbiología del C.P. Estas, aunque no han sido identificadas taxonómicamente, poseen una clave conformada por una letra (A, P y R) que corresponden a la serie (zona de aislamiento y año) y un número consecutivo (Cuadro 1). Las cepas fúngicas mientras tanto, correspondieron al género de *Trichoderma* de probado efecto antagónico: una de ellas (T30) fue aislada de suelos del Valle de Toluca y las otras dos (R41 y R44) de suelo de chinampas.

Cuadro 1. Cepas de bacterias seleccionadas y consideradas como antagónicas a *P. infestans*.

Cepa	Procedencia		Cepa	Procedencia	
	Variedad	Zona		Variedad	Zona
A1	Alpha	Tallo	R5	Alpha	Rizoplano
A18	Alpha	Tallo	R11	Alpha	Rizoplano
A23	Alpha	Tallo	R16	Alpha	Rizoplano
A38	Norteña	Tallo	R17	Alpha	Rizoplano
A44	Norteña	Hoja	R19	Alpha	Rizoplano
A46	Norteña	Hoja	R29	Alpha	Rizoplano
P14	Norteña	Rizoplano	R33	Alpha	Rizoplano
P15	Norteña	Rizoplano	R34	Alpha	Rizoplano
P21	Norteña	Rizoplano	R35	Alpha	Rizoplano
P54	Alpha	Tuberosfera	R38	Alpha	Rizoplano
P61	Alpha	Rizosfera	R44	Norteña	Rizoplano
P98	Rosita	Tuberosfera	R51	Norteña	Rizoplano

3.4. Activación y preservación de microorganismos antagónicos

Las cepas bacterianas seleccionadas fueron primeramente activadas en placas de agar nutritivo (AN) y las de los hongos en papa dextrosa agar (PDA) (Anexo 1). La siembra (estriado) de las bacterias, se realizó en condiciones estériles (cámara de flujo laminar) con ayuda de un asa bacteriológica esterilizada con fuego; la activación de las cepas de hongos se hizo colocando un disco con medio de cultivo conteniendo al organismo en el centro de la caja con PDA. Una vez que todos los microorganismos fueron activados se procedió a sembrar seis repeticiones de cada cepa en tubos inclinados con el medio de cultivo correspondiente. Cuando las cepas crecieron los tubos fueron guardados en condiciones asépticas y a temperatura ambiente.

3.4.1. Incremento de inóculo bacteriano

Para la aplicación de los microorganismos antagónicos seleccionados se requirió de cierto volumen de inóculo, mismo que fue obtenido mediante diversos métodos usando agar en placa y caldo nutritivo (Anexo 1). Para este último se utilizó un agitador-incubador, así como en un fermentador rústico instalado para tal fin (Anexo 2).

3.4.1.1 Método de incubación – agitación

Para el incremento de inóculo empleando la incubadora- agitadora, se usaron dos tubos preservados por cada bacteria; a cada de ellos se le agregó 1 mL de agua destilada y con un asa bacteriológica se procedió a desprender su crecimiento. La suspensión bacteriana obtenida fue utilizada para inocular un matraz erlenmeyer que contenía 75 mL de caldo nutritivo (Anexo 1) previamente esterilizado. Este proceso se realizó en condiciones asépticas (cámara de flujo laminar). Después de la inoculación, los matraces se colocaron en el incubador-agitador horizontal (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC-EDISON) a 160 revoluciones por minuto (rpm) a 28°C durante 72 horas. Transcurrido el tiempo de agitación, la suspensión obtenida fue centrifugada a 4500 rpm durante 15 minutos, con la finalidad de eliminar residuos del medio de cultivo (caldo nutritivo). El sobrenadante fue eliminado y la pastilla bacteriana de cada tubo fue sometida a dos lavados consecutivos con agua destilada estéril durante cinco minutos a 4500 revoluciones por minuto (rpm), posteriormente a la pastilla bacteriana de cada tubo se le adicionaron 25 mL de agua destilada estéril y después de homogenizarla en un vortex (mezclador eléctrico), la suspensión de cada bacteria (50 mL) fue preservada en botellas de color ámbar de 50 mL de capacidad a 4°C.

3.4.1.2. Método de fermentación

Una vez activadas las cepas con colonias de 72 horas se procedió a preparar 5 mL de una suspensión a una concentración de 10^9 Unidades Formadoras de

Colonias (UFC) de la siguiente manera: en un tubo con 5 mL de agua destilada estéril se adicionó paulatinamente el crecimiento bacteriano con un asa bacteriológica. Después de cada asada el tubo fue agitado con un vortex hasta lograr la concentración deseada. El contenido del tubo de ensaye fue adicionado en 500 mL de caldo nutritivo (Anexo 1) contenido en un matraz de 1000 mL al que se le colocaron los demás aditamentos que conforman el fermentador, así como su fuente abastecedora de aire (bomba de aire tipo pecera) siguiendo los pasos expuestos en el anexo 2. Posteriormente, los matraces fueron dispuestos en una mesa de metal previamente desinfectada con alcohol a 96° instalándose las baterías de fermentación conformadas por seis cepas bacterianas. El periodo óptimo de fermentación en el caldo nutritivo fue de cinco días. La población bacteriana obtenida por este método fue aproximadamente de 81.3×10^6 UFC mL⁻¹ (en el medio líquido sin procesar).

Con la finalidad de obtener el inóculo puro se eliminó el caldo nutritivo por medio de la centrifugación. Tanto la obtención de la pastilla como su lavado y preservación fueron realizados tal como se describió en el apartado 3.4.1.1. Las únicas variantes fueron la velocidad de centrifugación (7500 rpm), el tiempo de centrifugación (30 minutos y 15 minutos en un solo enjuague), así como el control de temperatura (de 15 a 18 °C).

3.4.2. Conformación de las mezclas bacterianas antagónicas

Se combinaron seis cepas bacterianas seleccionadas por serie y fueron realizadas un día antes de su utilización en el ensayo respectivo. Para ello, el inóculo mantenido en refrigeración fue mezclado de la siguiente manera: 1) en el caso del inóculo obtenido mediante el uso del agitador-incubador; los 25 mL de inóculo de cada cepa bacteriana fueron vaciados en un recipiente esterilizado, terminando con 150 mL de suspensión bacteriana. Esta fue mantenida en refrigeración a 4°C hasta su aplicación. 2) Para el inóculo obtenido por la técnica de fermentación, el procedimiento consistió en colocar en una probeta estéril 10 mL de inóculo de cada bacteria contenido en las botellas ámbar refrigeradas; la mezcla de las seis cepas bacterianas (60 mL de suspensión) fue realizada y mantenida a 4°C en una botella de dilución estéril hasta su aplicación. La concentración de estas mezclas sin diluir fue de 273.3×10^8 UFC mL⁻¹.

3.4.3. Incremento de inóculo fúngico (*Trichoderma spp.*)

Los hongos seleccionados (R41, R44 y T30) una vez activados (apartado 3.4.) fueron incrementados en cajas petri con medio PDA (Anexo 1). Para ello, los discos con medio de cultivo conteniendo al antagonista fueron colocados en el centro de la caja de Petri (3 por cepa). Después de cinco días de incubación a 28°C, se procedió a recoger la esporulación de tres cajas de Petri de cada cepa. Para ello se adicionaron de 15 a 20 ml de agua destilada estéril por cada caja de petri, y la esporulación fue desprendida del medio con la ayuda de un tubo de vidrio.

3.4.3.1. Conformación de la mezcla fúngica

La suspensión de esporas resultante de cada cepa se depositó en una misma botella de dilución esterilizada previamente, formándose aquí mismo la mezcla de las tres cepas la cual fue guardada a 4°C hasta su utilización. Esto fue realizado bajo condiciones estériles y dos días antes de su utilización con la finalidad de conservar el efecto antagónico de las cepas fúngicas.

3.5. Instalación de experimentos

En la presente investigación se instalaron cuatro experimentos (uno en laboratorio, uno en invernadero y dos en campo) para probar el efecto de los antagonistas seleccionados sobre la incidencia y severidad de *P. infestans*.

3.5.1. Evaluación en laboratorio con el método de hojas desprendidas de papa

En cada experimento se establecieron dos ensayos; 1) hojas inoculadas con esporangios, 2) hojas inoculadas con zoosporas. Se usaron hojas de la variedad alpha, libres del patógeno de plantas cultivadas en invernadero.

En el primer experimento se utilizaron las cepas de la serie A: A1, A18, A23, A38, A44, A46 así como la mezcla de estas (MA). En el segundo, las cepas empleadas fueron: R5, R11, R16, R17, R19, R29, R33, R34, R35, R38, R44, R51 y dos mezclas, una formada con las seis primeras bacterias (RG1) y la otra por las seis

ultimas (RG2). Cada mezcla se realizó añadiendo a un vaso de precipitados 10 mL de inóculo refrigerado de cada cepa, se considero a cada bacteria y a sus respectivas mezclas como los tratamientos en los dos experimentos, de manera que el diseño experimental (completamente al azar) en el primer caso consistió de siete tratamientos y un testigo, inoculado con *P. infestans* pero sin antagonistas, mientras que en el segundo fue de 14 tratamientos y un testigo. En ambos casos hubo seis repeticiones.

El inóculo del patógeno fue una mezcla de los grupos A1 y A2 de *P. infestans*. Para la obtención de los esporangios se agregó agua destilada estéril a las cajas con micelio patogénico que fue desprendido con el dedo índice previamente desinfectado; La suspensión resultante se colocó en un vaso de precipitados de 50 mL y fue ajustada a una concentración de 20,000 esporangios mL⁻¹. El conteo fue realizado en un hematocítometro tal y como lo describen French y Hebert (1982). Para la obtención de zoosporas la suspensión de esporangios se dejó reposar durante 2 horas a 4°C antes de realizar la inoculación.

El inóculo bacteriano empleado se obtuvo directamente de cajas de Petri con medio agar nutritivo (Anexo 1) el volumen que se utilizo para cada cepa bacteriana fue de 40 mL a una concentración de 10⁹ células mL⁻¹.

En ambos casos el inóculo bacteriano se asperjó con un atomizador en el envés de las hojas de papa colocadas sobre papel absorbente antes de aplicar al patógeno. Cuando las hojas estuvieron secas, se aplicaron 100 µL de inóculo de *P.*

infestans a cada hoja (50 µL en cada extremo del envés de la hoja) de esporangios o zoosporas según el ensayo correspondiente. Una vez tratadas, las hojas fueron transferidas a cajas de Petri con medio agar agua (Anexo 1), mismas que funcionaron como cámaras húmedas. Las variables evaluadas fueron: porcentaje de infección y de inhibición.

La evaluación se realizó siete días después de la inoculación, mediante la siguiente escala: **0** = antibiosis total, no se observa infección visual ni microscópica; **1** = solo se observan al microscopio algunos esporangios en la zona de la gota de inóculo aplicada; **2** = al microscopio se observan esporangios en varias partes de la hoja; **3** = visualmente se observa infección en la mayoría de la hoja; **4** = se presenta infección total de *P. infestans*, y este valor corresponde al 100% de infección.

Para normalizar errores y homogenizar varianza, se aplicó la transformación $x' = \sqrt{x}$ a los datos obtenidos. El análisis fue efectuado mediante el programa estadístico S.A.S® (Statistical Analysis System Anexo 4).

3.5.2. Evaluación de antagonistas en invernadero

Este experimento consistió de seis tratamientos: mezcla A que incluyó a las cepas bacterianas A1, A18, A23, A38, A44, A46; mezcla P (cepas P14, P15, P21, P54, P61, P98); mezcla TR (cepas de *Trichoderma* R41, R44, T30); producto biológico comercial Biopak-F® a una dosis de 1 g 0.5 L⁻¹ de agua destilada; fungicida dimetomorf a una dosis de 2.5 g de producto comercial por 0.5 L de agua común y

testigo absoluto sin tratamiento. La concentración de las mezclas A y P fue de 10^{10} UFC mL⁻¹ y la de la mezcla TR de 50.3×10^5 UFC mL⁻¹; las mezclas A, P y TR se formaron con 150 mL de inóculo aforado a 0.5 L con agua destilada. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar se emplearon seis repeticiones por tratamiento y se consideró a una maceta como unidad experimental.

Los seis tratamientos se aplicaron en el follaje de las plantas de papa y únicamente en los tratamientos biológicos (mezclas A, P, TR y el Biopak F), los tubérculos de papa variedad Alpha fueron embebidos durante 60 minutos antes de su siembra. Posteriormente los tubérculos fueron colocados en suelo estéril contenido en macetas de plástico de 12" de diámetro. Inmediatamente después estas fueron regadas. Las macetas fueron dispuestas en cámaras de rocío permanente o microaspersión en las que se colocaron humidificadores para asegurar humedad constante.

Se hicieron cinco aplicaciones de los tratamientos al follaje, iniciándose 30 días después de la siembra (dds) dejando un intervalo de siete días entre cada aplicación. Conjuntamente las plantas de papa fueron inoculadas en tres ocasiones (con un intervalo de 15 días entre cada inoculación) con 20,000 esporangios mL⁻¹ de la mezcla de los grupos A1 y A2 de *P. infestans* mencionada en el apartado anterior. Antes de cada aplicación, la suspensión de esporangios se mantuvo a 4°C por 90 minutos para lograr tener además de esporangios, la presencia de zoosporas. Para evitar la desecación del patógeno, dichas inoculaciones se realizaron con un atomizador en las primeras horas de la mañana.

Las variables evaluadas fueron: severidad de la enfermedad y el número de esporangios producidos por *P. infestans* así, como el rendimiento y sanidad del tubérculo.

Las evaluaciones en el follaje se realizaron siete días después de cada aplicación del tratamiento respectivo, utilizando para ello la clave de campo propuesta en el Centro Internacional de la Papa por Henfling en 1987, la cual va de 0 a 100 % de severidad. Una vez obtenidos todos los datos, se procedió a realizar la estimación del Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (ABCPE o AUDPC) que fue seleccionada por ser una técnica recomendada en ausencia de ajuste de las epidemias a algún modelo epidemiológico. El cálculo se efectuó mediante la ecuación:

$$ABCPE = \sum [(Y_i + Y_{i+1}) / 2] (t_{i+1} - t_i)$$

Donde Y_i es la intensidad de la enfermedad y t es el periodo de evaluación en días, de manera que las unidades serán en %-días (Pedroza, 1995).

Tanto el cálculo del ABCPE como el análisis estadístico fueron realizados mediante el programa estadístico S.A.S® (Anexo 4).

Las evaluaciones de la producción de esporangios por tratamiento se realizaron paralelamente a las de severidad; es decir, cada siete días a partir de la primera aplicación de antagonistas (37 dds). Para ello, seis folíolos de cada tratamiento con síntomas típicos de esporulación de *P. infestans*, fueron colectados y

llevados al laboratorio en tubos de plástico de 12 mL, después se colocaron por tratamiento en vasos de precipitados de 50 mL a los que se les agregó 30 mL de agua destilada estéril. Para homogenizar la suspensión, el agua se agitó por dos minutos en un vortex. Con una micropipeta de 20 μ L se tomó una alícuota que fue colocada en un hematócitosmetro realizándose el conteo de esporangios tal y como lo describen French y Hebert (1982). Estos datos se analizaron estadísticamente con el programa estadístico S.A.S[®].

La evaluación en la producción de tubérculo sano y enfermo para cada tratamiento se realizó 65 dds ya que fue el tiempo máximo que permaneció vivo el follaje de las plantas de papa. Para ello, los tubérculos fueron extraídos de cada maceta y agrupados por tratamiento. El tubérculo consideró enfermo cuando presentó una consistencia blanda y presencia de una coloración canela o castaño-rosáceo en los cortes transversales, así como la emisión de olor fétido característico, resultado de la descomposición del tejido.

3.5.3. Evaluación de antagonistas en campo

Se establecieron dos experimentos en el campo experimental del PICTIPAPA A.C. uno en el verano del 2001 y otro en el 2002. En ambos se utilizó papa de la variedad Alpha y el diseño experimental fue completamente al azar con diez repeticiones por tratamiento, la unidad experimental fue una planta.

3.5.3.1. Experimento en campo 2001

El experimento se instaló el 10 de Julio del 2001 en una superficie de 12 m². Consistió de seis tratamientos (mezclas A, P y TR, Biopak F, dimetomorf, metalaxil) y el Testigo absoluto. Al igual que en la fase de invernadero, los seis tratamientos se aplicaron en el follaje y únicamente en las mezclas A, P, TR y el Biopak F, los tubérculos de papa se embebieron durante 60 minutos antes de que se sembraran. Posteriormente, estos fueron colocados en los sitios correspondientes a cada repetición de los tratamientos en los surcos en campo. La primer aplicación de los tratamientos al follaje se realizó 16 dds. Debido a la agresividad del patógeno existente de manera natural en el ambiente sólo se realizaron cuatro aplicaciones de los tratamientos.

3.5.3.2. Experimento en campo 2002

Este experimento se estableció en una superficie de terreno de 14 m². La siembra se realizó el 21 de Agosto del 2002 en el campo experimental del PICTIPAPA A.C. en Metepec, México, donde se probaron siete tratamientos: mezcla RG1 conformada por las bacterias R5, R11, R16, R17, R19, R29; mezcla RG2 (cepas R33, R34, R35, R38, R44, R51); mezcla TR (cepas de *Trichoderma* R41, R44, T30); producto biológico comercial BiopakF[®] a una dosis de 1 g 0.5 L⁻¹ de agua destilada; fungicida dimetomorf a una dosis de 2.5 g de producto comercial por 0.5 L de agua; fungicida metalaxil a una dosis de 2 mL de producto comercial por 0.5 L de agua y el testigo absoluto. La concentración de las mezclas RG1 y RG2 fue de 10¹⁰

células mL^{-1} y la de TR de $50.3 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$. Las dos mezclas bacterianas se formaron con 60 mL de inóculo aforado a 0.5 L con agua destilada, mientras que la mezcla fúngica se conformó por 90 mL de inóculo aforado a 0.5 L con agua destilada. Los siete tratamientos se aplicaron en el follaje de las plantas de papa y únicamente se embebieron tubérculos antes de sembrarse en las mezclas RG1, RG2, TR y el Biopak F durante 30 minutos. Posteriormente; estos fueron colocados en los sitios dispuestos en los surcos para cada repetición y tratamiento. 14 dds se realizó la primera aplicación de los tratamientos al follaje y por la agresividad del patógeno existente de forma natural en el ambiente, solo se realizaron tres aplicaciones.

La única variable evaluada en ambos experimentos fue la severidad de la enfermedad. Debido a la intensidad de la enfermedad no fue posible evaluar la producción de esporangios ni las variables de rendimiento y sanidad de tubérculo.

Las evaluaciones en follaje para ambos experimentos se realizaron siete días después de cada aplicación de los tratamientos respectivos, siguiendo las indicaciones explicadas en la evaluación en invernadero desde la toma de datos hasta la realización del análisis estadístico de los mismos, utilizando para ello el programa estadístico S.A.S® (Anexo 4).

3.5.4. Evaluación de antagonistas en maceta-campo 2002

Este experimento se estableció con la finalidad de evaluar si la edad de las plantas de papa en la cual se expone al patógeno influye en la intensidad del ataque

de *P. infestans* y por consiguiente, en la efectividad antagónica de los microorganismos utilizados en campo durante el ciclo 2002 sobre *P. infestans*.

La siembra se efectuó el 17 de Julio del 2002 en el invernadero del PICTIPAPA A.C. en Metepec, México.

Para los tratamientos de las mezclas RG1, RG2, TR y el Biopak F, los tubérculos de papa variedad Alpha fueron embebidos durante 30 minutos antes de su siembra. Posteriormente, estos fueron colocados en suelo estéril contenido en macetas de plástico de 12" de diámetro. Después de regarse, las macetas se colocaron en mesas de concreto ubicadas al interior del invernadero, donde fueron mantenidas durante 42 días libres del ataque de *P. infestans*. Durante este período, las plantas fueron asperjadas en dos ocasiones con los tratamientos respectivos como medida protectante. Posteriormente las plantas fueron llevadas a condiciones de campo, colocando cada maceta en el lugar determinado por el diseño experimental. Las plantas se sometieron únicamente a cuatro aplicaciones semanales más de los tratamientos en condiciones de campo, ya que debido a la severidad de la enfermedad no fue posible continuar con la evaluación. Las variables evaluadas fueron: severidad de la enfermedad y número de esporangios producidos por *P. infestans* así como el rendimiento y sanidad del tubérculo.

Los tratamientos que se probaron fueron los siete utilizados en el experimento de campo durante el Verano 2002. El diseño experimental que se utilizó fue

completamente al azar con diez repeticiones para cada tratamiento. Como unidad experimental se consideró a una maceta.

Las evaluaciones de la severidad, producción de esporangios y rendimiento de tubérculo se hicieron de la misma manera en que se realizaron en la evaluación en invernadero 2001, desde la toma de datos hasta la realización del análisis estadístico de los mismos utilizando el programa estadístico S.A.S® (Anexo 4).

En este caso la primer evaluación de la producción de esporangios, se efectuó a los 42 dds y la evaluación de la producción de tubérculo para cada tratamiento se realizó a los 70 dds ya que fue el tiempo máximo que permaneció vivo el follaje de las plantas de papa.

3.6. Evaluación de la población microbiana (UFC) en tubérculos de papa, en hojas de papa tratados y en mezclas diluidas.

La concentración de microorganismos en las diferentes mezclas (mezcla A, mezcla P, mezcla RG1 y RG2) que se conformaron con las bacterias de tipo A, P y R y la constituida por tres cepas de *Trichoderma spp.* (mezcla TR) que se aplicaron en las diferentes pruebas se presenta a en el Cuadro 2. El método por medio del cual se obtuvieron estos datos se presenta en el Anexo 1.

Cuadro 2. Unidades Formadoras de Colonias (UFC) obtenidas en las diferentes pruebas realizadas en invernadero y campo.

VARIABLE	MEZCLAS BACTERIANAS (A, P, RG1, RG2)	HONGOS (<i>Trichoderma spp.</i>)
Mezclas diluidas de 60 mL de inóculo a 0.5 L de agua	$26.3 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$	$50.3 \times 10^5 \text{ UFC mL}^{-1}$
Tubérculos de papa embebidos en mezcla diluida a 0.5 L	$61.3 \times 10^6 \text{ UFC cm}^{-2}$	$16.3 \times 10^5 \text{ UFC cm}^{-2}$
Hojas de papa asperjadas con mezcla diluida a 0.5 L	$135.6 \times 10^6 \text{ UFC cm}^{-2}$	$12.3 \times 10^5 \text{ UFC cm}^{-2}$
UFC = Unidades Formadoras de Colonias		

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Evaluación en laboratorio con el método de hojas desprendidas de papa

Existieron diferencias estadísticamente significativas ($\alpha \leq 0.05$) entre las cepas de la serie A empleadas (Anexo 5). Dos de las seis cepas probadas y la mezcla (MA), presentaron una inhibición igual o superior al 50% de la infección, tanto en el experimento con esporangios como con zoosporas como inóculo (Figuras 1 y 2). El mejor tratamiento para ambos experimentos fue la cepa A38 que proporcionó 82.61 y 73.91 % de inhibición a *P. infestans* respectivamente, en el caso de la inoculación con zoosporas la A44 fue otra de las cepas efectivas. Puede observarse claramente que la efectividad antagónica de las cepas es mayor al ser empleadas individualmente que al ser mezcladas, lo que indica un posible efecto antagónico entre ellas. También se aprecia una mayor inhibición de la infección cuando el inóculo utilizado es la zoospora que cuando es esporangio. La producción de metabolitos extracelulares tales como antibióticos, cianuro de hidrógeno (HCN) y sideroforos son el mecanismo de control más comúnmente explicado (Stanghellini y Miller, 1997) considerándose así una posible hipótesis a probar en trabajos posteriores.

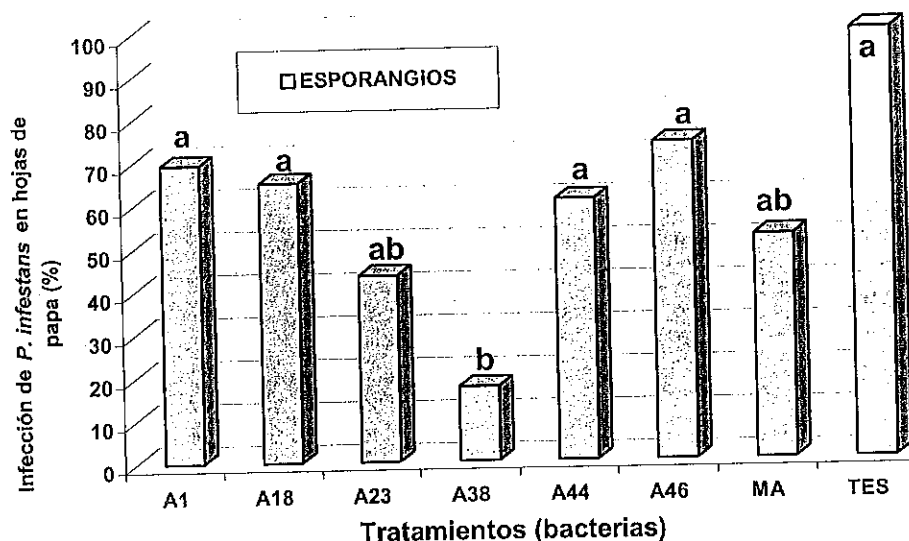


Figura 1. Efecto de cepas bacterianas aisladas de filosfera y caulosfera sobre la infección de *Phytophthora infestans* en hojas de papa desprendidas inoculadas con esporangios. Las barras con la misma letra son estadísticamente iguales en base a la prueba de comparación de medias Tukey ($\alpha \leq 0.05$).

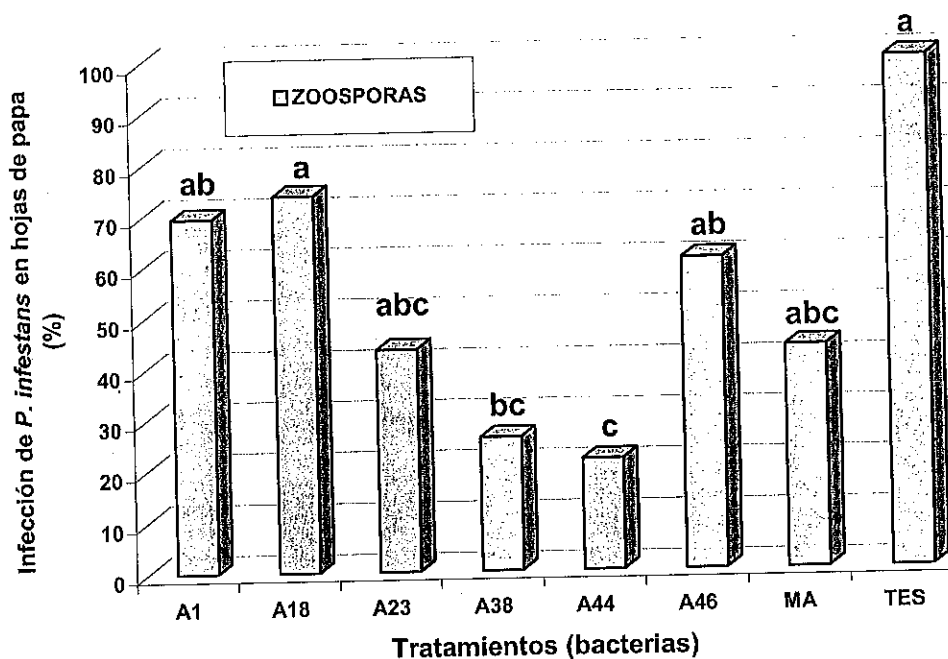


Figura 2. Efecto de cepas bacterianas aisladas de filosfera y caulosfera de papa sobre la infección de *P. infestans* en hojas de papa desprendidas inoculadas con zoosporas. Las barras con la misma letra son estadísticamente iguales en base a la prueba de comparación de medias Tukey ($\alpha \leq 0.05$).

En los experimentos establecidos con las cepas de bacterias de la serie R, estas ofrecieron diferente grado de control a los esporangios y zoosporas de *P. infestans* con un $\alpha \leq 0.05$ (Anexo 5). Para el caso de la inoculación con esporangios, las cepas bacterianas que mejor se comportaron fueron: R16, seguidas por la R34, R35 y R38, mezcla RG1 y la cepa R29 que aunque no presentaron diferencias significativas entre ellas (Anexo 5), conformaron grupos diferentes y se consideraron a todas como las mejores antagonistas a *P. infestans*. En la inoculación con zoosporas, estadísticamente las mejores cepas de bacterias en la inhibición del patógeno fueron R5, mezcla RG2 y la cepa R11 (Figuras 3 y 4). Estas bacterias efectivamente tienen efecto antagónico sobre *P. infestans* en las hojas de papa, ya sea de manera individual o mezcladas entre sí, lo que indica que no existe aparentemente efecto antagónico entre las cepas mezcladas; por otra parte, no se presentaron indicios de fitotoxicidad como en el trabajo realizado por Ferrera-Cerrato (1999). Se pudo observar claramente que cuando se inocularon las hojas con zoosporas las cepas bacterianas presentaron un mayor efecto antagónico sobre la infección de *P. infestans* que cuando se inocularon con esporangios, esto se aprecia perfectamente en la figura 4, donde únicamente la cepa R44 y el testigo superan el 60% de infección del patógeno.

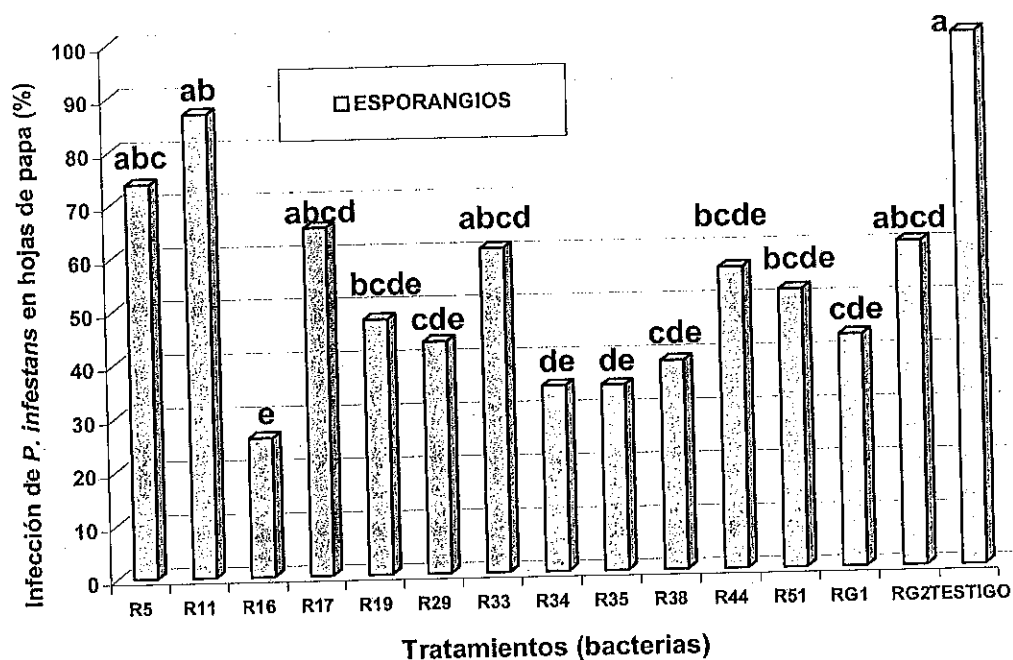


Figura 3. Efecto antagónico de cepas bacterianas aisladas de rizoplasma de papa sobre la infección de *P. infestans* en hojas de papa desprendidas inoculadas con esporangios. Las barras con la misma letra son estadísticamente iguales en base a la prueba de comparación de medias Tukey ($\alpha \leq 0.05$).

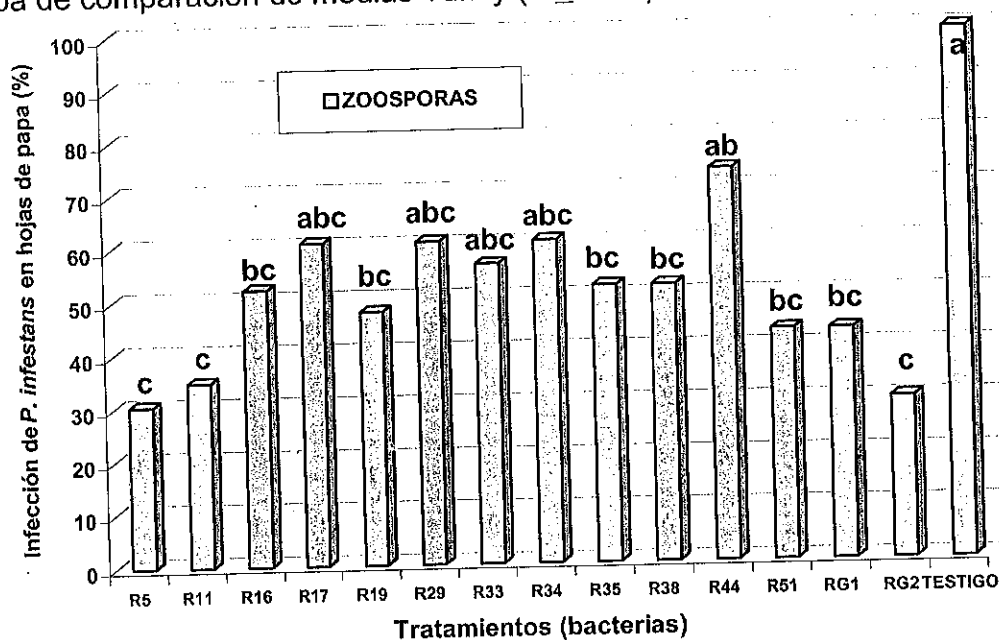


Figura 4. Efecto antagónico de cepas bacterianas aisladas de rizoplasma de papa sobre la infección de *P. infestans* en hojas de papa desprendidas inoculadas con zoosporas. Las barras con la misma letra son estadísticamente iguales en base a la prueba de comparación de medias Tukey ($\alpha \leq 0.05$).

4.2. Evaluación de antagonistas en invernadero 2001

Existieron diferencias estadísticamente significativas ($\alpha \leq 0.05$) entre los tratamientos. Con base en la comparación de medias del Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (ABCPE Anexo 5), los tratamientos biológicos la mezcla A, mezcla TR, Biopak-F y mezcla P fueron estadísticamente iguales entre sí ofreciendo una efectividad intermedia a la severidad del patógeno. El máximo control de la enfermedad fue obtenido con el tratamiento químico (dimetomorf) y el mínimo correspondió al testigo absoluto (Figura 5).

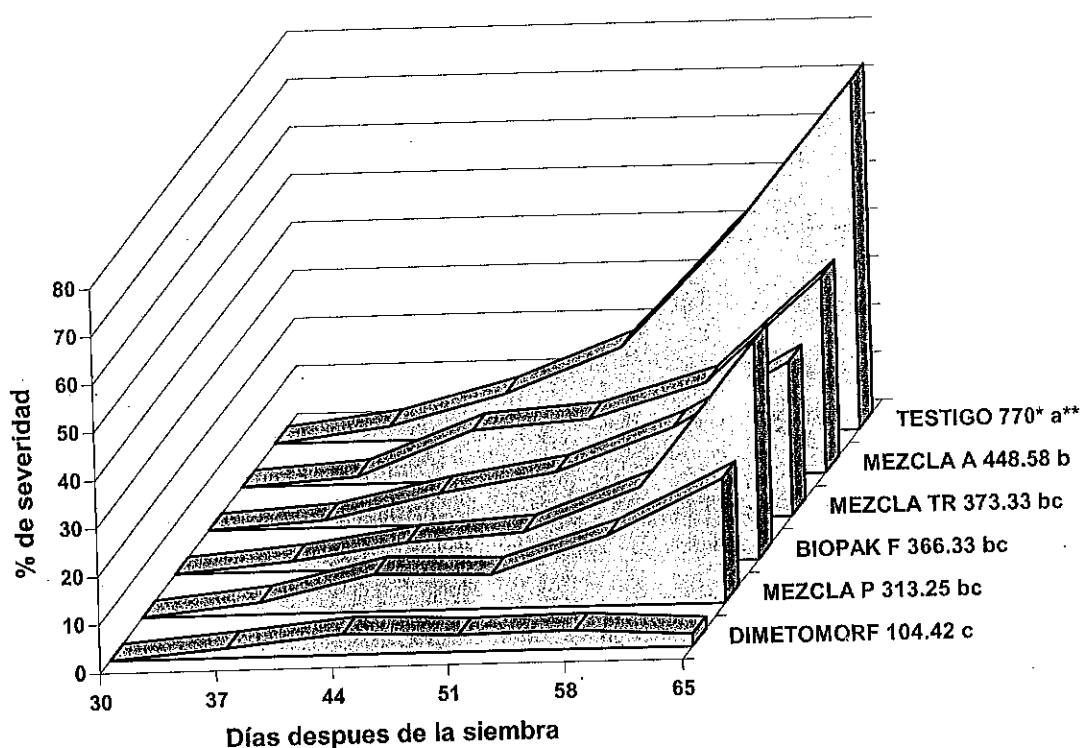


Figura 5. Efecto de los tratamientos sobre la severidad de *P. infestans* en invernadero durante el ciclo 2001.

*- Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad

** - Cifras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha \leq 0.05$).

Proporcionar condiciones controladas de temperatura y humedad a los microorganismos antagónicos aplicados, ayudó al efecto antagónico contra *P. infestans*, reduciendo la severidad de ataque al follaje de plantas de papa; en comparación con la presentada por el testigo absoluto. Mathre *et al.* (1999), mencionan que los antagonistas pueden ser manejados o explotados hasta alcanzar los resultados deseados mediante la adaptación de antagonistas semejantes al patógeno del cultivo a ser protegido debido a su habilidad de inhibir o competir con el patógeno blanco.

De manera práctica, esto puede ser utilizado en el manejo de otras enfermedades que son problema en invernaderos. Berger *et al.* (1996) sostienen que el biocontrol podría proveer una alternativa o reducir el uso de fungicidas en invernaderos con alta humedad y comentan que varios antagonistas microbianos, incluyendo cepas de *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Enterobacter* y cepas de hongos de los géneros *Gliocladium*, *Pythium* y *Trichoderma*, han mostrado actividad de biocontrol contra enfermedades de damping-off, alguno de los cuales han sido incluidos en productos comerciales.

La producción de esporangios hasta el inicio de la tercer semana fue similar en los seis tratamientos incluidos. Después de esta fecha su número se vio incrementado coincidiendo con la severidad de la enfermedad observada en el follaje (Figura 6).

Existieron diferencias estadísticamente significativas en la comparación de medias del número de esporangios producidos, entre los tratamientos (Cuadro 3). Los cuatro tratamientos biológicos (mezcla A, mezcla P, mezcla TR y Biopak F) resultaron con una media de producción de esporangios mL^{-1} de 37,000 a 59,500. El mínimo y máximo número de esporangios fue obtenido respectivamente con el dimetomorf y testigo absoluto. Los mejores tratamientos en la inhibición de producción de esporangios fueron la mezcla P y el producto Biopak F, ya que arrojaron las medias de esporangios mL^{-1} menores entre los tratamientos biológicos. En invernadero existió efecto inhibitorio de la producción de esporangios por parte de los tratamientos biológicos ya que ninguno de estos supero la esporulación del testigo absoluto, con lo que se comprueba la hipótesis de que existe efecto antagónico de los microorganismos seleccionados en la producción de esporangios de *P. infestans*.

Cuadro 3. Experimento en invernadero 2001. Análisis de la producción de esporangios en los tratamientos aplicados para el control de *P. infestans*.

Tratamientos	Media (esporangios mL^{-1})	Agrupación Tukey*
Testigo absoluto	76500	A
Mezcla A	59500	AB
Mezcla TR	49667	AB
Mezcla P	37500	AB
Biopak-F	37000	AB
Dimetomorf	12333	B

* Medias con la misma letra son estadísticamente iguales. Tukey ($P \leq 0.05$).

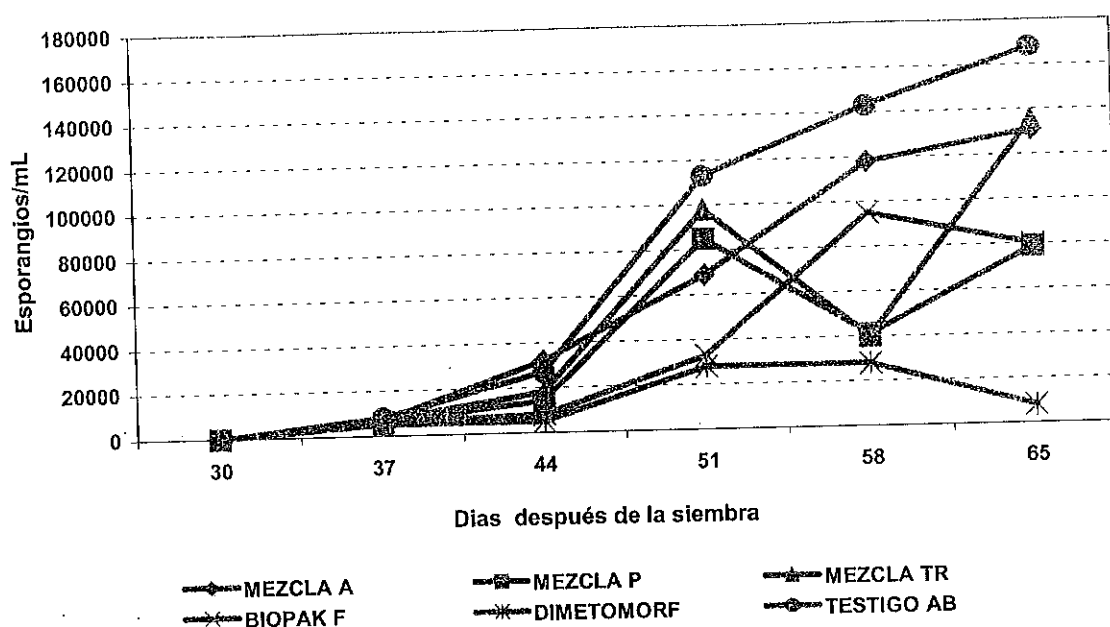


Figura 6. Producción de esporangios de *P. infestans* por tratamiento de las plantas de papa mantenidas en invernadero durante el ciclo 2001.

El efecto de los tratamientos sobre el rendimiento de tubérculo fluctuó de 449 a 1135 g por lote de cada tratamiento. Los únicos tratamientos que superaron al testigo absoluto fueron la mezcla TR (1023 g) a base de *Trichoderma* y el tratamiento químico Dimetomorf (1135 g). La mezcla A y Biopak F incluso fueron superados por el testigo (Figura 7). La razón por la cual la mezcla TR presentó la mayor producción se debió a que el hongo base (*Trichoderma*) tiene su mayor efectividad en el control de patógenos en el suelo por ser precisamente su hábitat natural y favorable. Benhamou y Chet (1993) por ejemplo, aseveran que entre los hongos antagonistas que han mostrado satisfactoriamente grados de control contra patógenos del suelo, varias especies de *Trichoderma* han sido reportadas con exitosa inhibición del crecimiento y desarrollo de patógenos.

Una vez más, el control químico ha demostrado la efectividad al favorecer la producción del cultivo y que realmente es difícil el tratar de evitar aplicaciones de funguicidas químicos para el control de enfermedades tan agresivas como es el caso del tizón tardío de la papa. En muchas ocasiones el manejo inadecuado de diversas enfermedades a generado un excesivo uso de agroquímicos, lo que ha provocado la generación de resistencia del patógeno blanco, así como de otros patógenos; lo que ocasiona una selección y por lo tanto la aparición de generaciones con mayor adaptación, lo que provoca un incremento en las dosis de aplicación y promueve la aparición y utilización de productos químicos más avanzados. También se favorece la eliminación de flora benéfica; que ocasiona una nula competencia, por lo tanto existe una mayor proliferación del patógeno.

La sanidad del tubérculo fluctuó del 70 al 100% y fue obtenida a partir de relacionar el peso del tubérculo enfermo con respecto a la producción total del tratamiento. Los tratamientos en los que se obtuvo la producción de mayor calidad, fueron el testigo químico (dimetomorf) y las mezclas TR y A, mismas que superaron la sanidad del testigo absoluto (Figura 7).

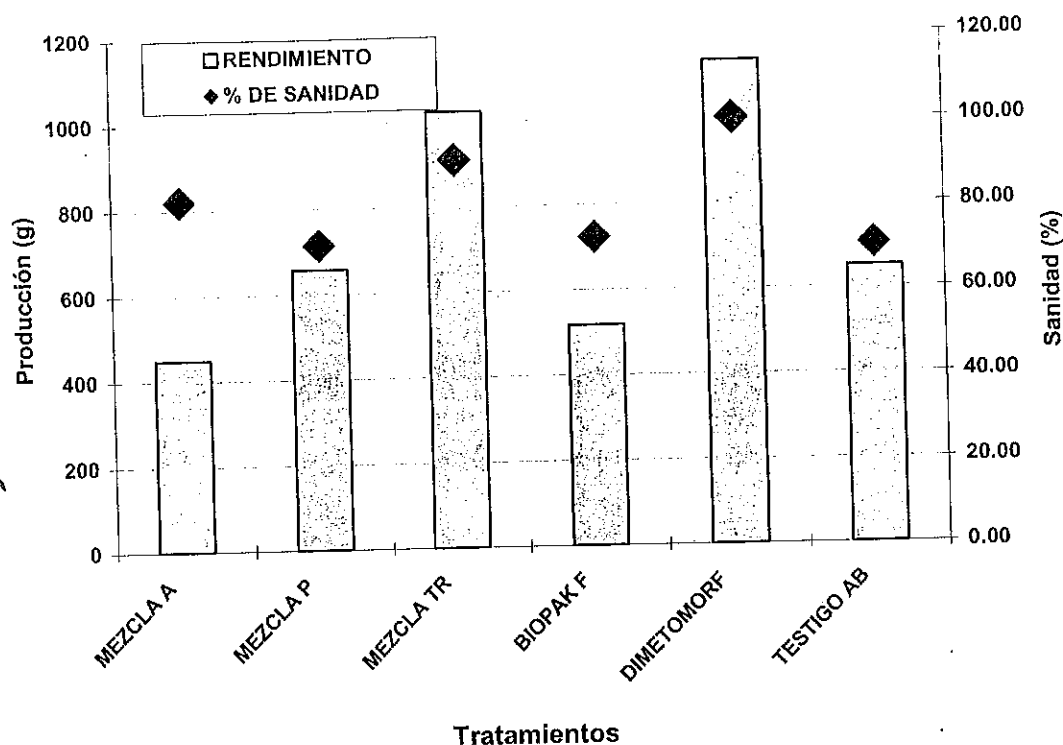


Figura 7. Efecto de los tratamientos aplicados durante el ciclo 2001 sobre el rendimiento y sanidad de tubérculos de papa producidos en condiciones de invernadero.

En las figuras 8 y 9 se aprecia la sintomatología de *P. infestans* presentada en los diferentes tratamientos durante el período de investigación.

Aunque dos de los tratamientos biológicos mostraron tener una buena calidad de la producción y pueden considerarse como alternativas al control químico, sería un componente clave en el desarrollo de una agricultura sustentable, económicamente provechoso con una mínima contaminación medioambiental (Barea *et al.*, 1996).

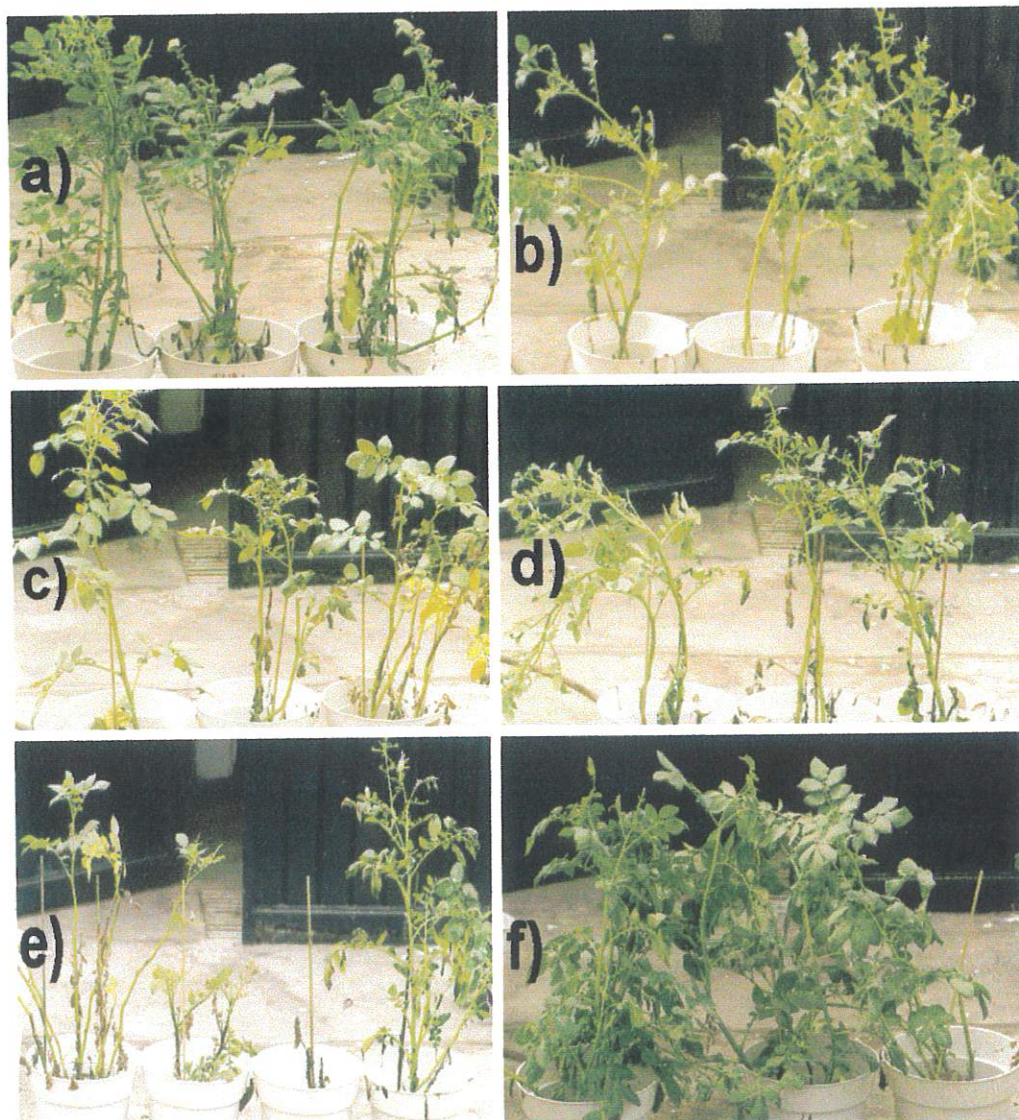


Figura 8. Efecto de los tratamientos aplicados en invernadero contra *Phytophthora infestans*, en follaje de plantas de papa. a) Mezcla A, plantas con daño moderado; b) Mezcla P, plantas con mínimos daños; c) Mezcla TR, follaje parcialmente sano; d) Biopak-F, follaje fuertemente dañado por el patógeno; e) Testigo Absoluto, plantas con ataque severo; f) Dimetomorf, plantas con el follaje totalmente sano.

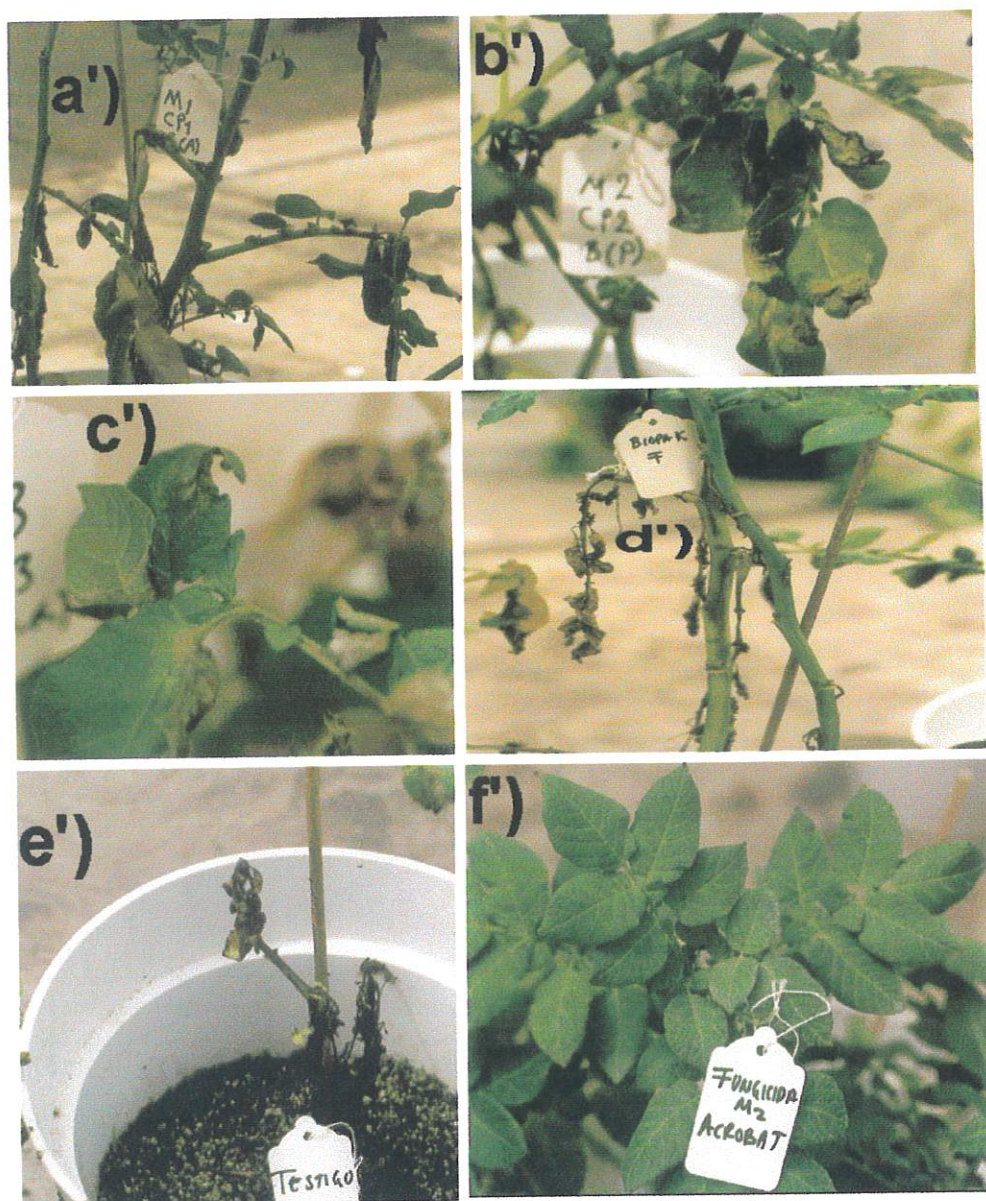


Figura 9. Acercamiento del efecto de los diferentes tratamientos aplicados en invernadero contra *P. infestans*, en follaje de plantas de papa.
a') Mezcla A, foliolos y tallos afectados; b') Mezcla P, puntas y bordes de hojas con daños; c') Mezcla TR, presencia de esporulación en hojas; d') Biopak-F, hojas, tallos secundarios y principales fuertemente dañados por el patógeno; e') Testigo Absoluto, plantas prácticamente destruidas por el patógeno; f') Dimetomorf, plantas con el follaje totalmente sano.

4.3. Evaluación de antagonistas en campo

4.3.1. Experimento en campo 2001

La severidad de *P. infestans* en condiciones de campo se detectó en las plantas de papa 23 dds y esta fluctuó del 12 al 100% de infección foliar. La agresividad de dicho patógeno fue tal, que solo en 21 días después de su primera detección alcanzó niveles de daño elevados, repercutiendo incluso en la mayoría de los tratamientos, situación respaldada por las diferencias estadísticamente significativas (Tukey $\alpha = 0.05$) entre los tratamientos (Figura 10).

El testigo químico (Metalaxil) fue el que mejor controló al patógeno; sin embargo, al realizar la prueba de comparación de medias Tukey del Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (ABCPE), dicho testigo químico también dio lectura de ABCPE, lo que pone de manifiesto la existencia de una cierta resistencia de *P. infestans* hacia el producto, o infección incipiente no controlada, sobre todo en la parte inicial de la infección.

Existen varios fungicidas químicos recomendados para el control de enfermedades causadas por *Phytophthora* y entre estos se menciona al metalaxil como uno de los mejores ya que tiene acción protectante y actividad curativa (Lozoya y Hernández, 2001; Schwinn, 1983).

El único tratamiento biológico estadísticamente diferente correspondió a la mezcla P, que mostró en los primeros 37 dds una tendencia más estable en el control del tizón tardío en campo. El comportamiento de los tres restantes tratamientos biológicos restantes fue estadísticamente igual al del testigo absoluto.

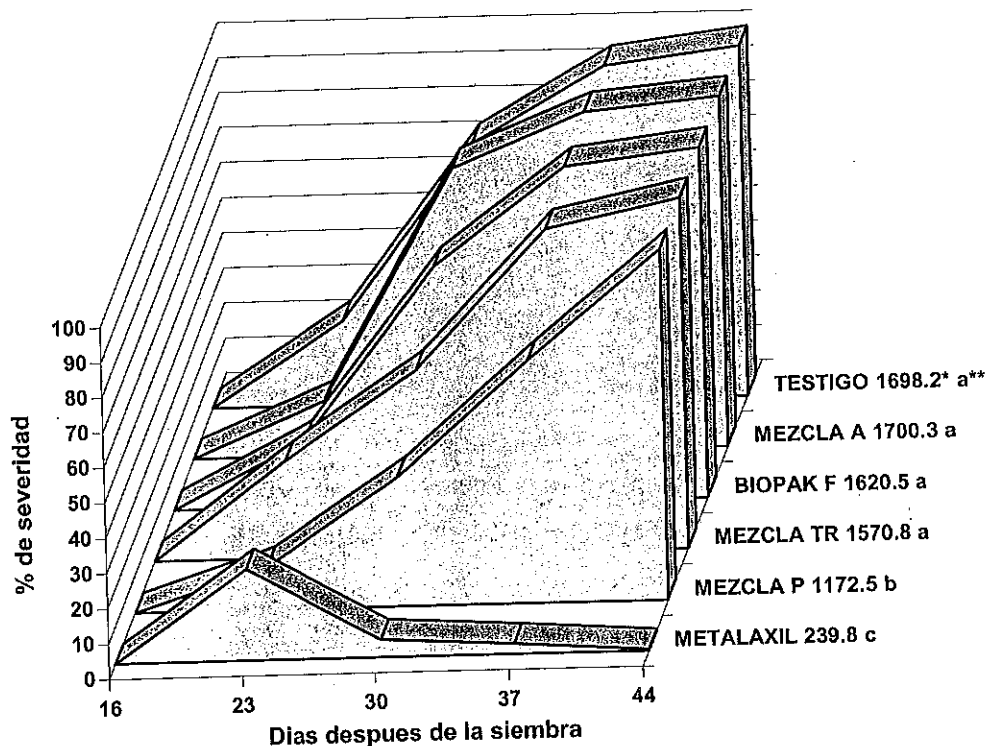


Figura 10. Efecto de los diferentes tratamientos sobre la severidad de *P. infestans* en las plantas de papa cultivadas en campo durante el ciclo 2001.

*- Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad

** - Cifras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha \leq 0.05$).

El efecto antagónico de los microorganismos seleccionados, fue menor en campo que en laboratorio, probablemente debido a una serie de factores adversos

que perjudican su establecimiento, desarrollo y actividad de los antagonistas en condiciones de campo. Lindow *et al.* (1996) indican que comúnmente el control biológico de enfermedades bajo condiciones de campo es muchas veces substancialmente menor y más variable que bajo condiciones controladas.

4.3.2. Experimento en campo 2002

En este ensayo al igual que en los anteriores, también se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($\alpha \leq 0.05$). De los cuatro tratamientos biológicos, únicamente la mezcla RG1 fue estadísticamente diferente y se consideró como el mejor tratamiento para el control del tizón tardío en el follaje; los tres tratamientos restantes no presentaron diferencias estadísticas entre ellos ubicándose, en un grupo independiente (Figura 11).

Como se señaló anteriormente, existe una gran diversidad de factores que afectan la actividad antagónica que pudieran ofrecer los microorganismos seleccionados. También se menciona la necesidad de fuentes de abastecimiento de nutrientes para cada antagonista (Hoitink y Boehm, 1999). Así por ejemplo el grado de supresión de la enfermedad alcanzado por competencia, es regido por numerosos factores bióticos (especies hospederas y estado nutricional) y abióticos (temperatura y humedad relativa) y su eficiencia no puede ser predecida correctamente. Por otra parte la supresión de enfermedades mediante agentes de biocontrol, es la manifestación sustentada de las interacciones dadas entre planta,

patógeno, agente de biocontrol y ambiente (Guetsky *et al.*, 2002; Bao y Lazarovits, 2001).

Por otro lado los tratamientos químicos (Metalaxil y Dimetomorf), aunque presentaron las medias más bajas, también presentaron lectura de ABCPE, situación que indica la posible generación de resistencia del patógeno al producto y mayormente al metalaxil que aunque es uno de los mejores, el patógeno ha generado resistencia hacia él. Según Sujkowski *et al.* (1995) los fungicidas chlorothalonil, cymoxanil y metalaxil son ampliamente usados en México para suprimir al tizón tardío. El metalaxil ha sido usado desde los primeros años de los 80's; se ha reportado además que la resistencia a este es común. Este fungicida es específico para Oomycetes, es sistémico, afecta el crecimiento micelial pero no la integridad de la zoospora y puede inhibir la RNA polimerasa. En la práctica, el chlorothalonil es usado exclusivamente como un protectante, pero el cymoxanil y metalaxil tienen "actividad post infección".

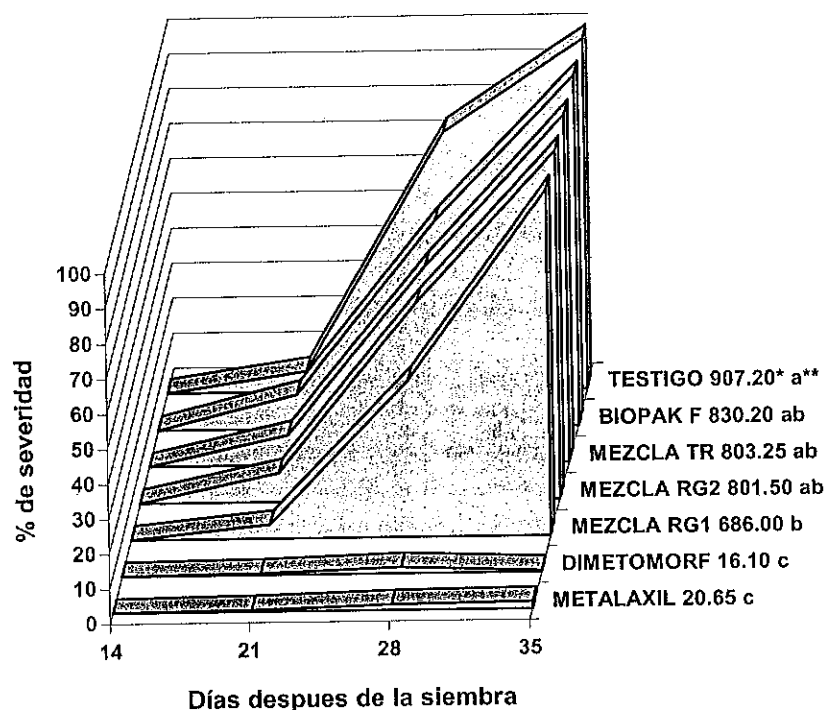


Figura 11. Efecto de los diferentes tratamientos sobre la severidad de *P. infestans* en las plantas de papa cultivadas en campo durante el ciclo 2002.

*- Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad

** - Cifras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha \leq 0.05$).

La agresividad de *P. infestans* en las plantas establecidas en campo durante el ciclo 2002 fue tan marcada que dichas plantas no lograron sobrepasar los 35 días después de la siembra y la altura alcanzada por estas fluctuó entre los 20 y 25 cm (Figuras 12 y 13).

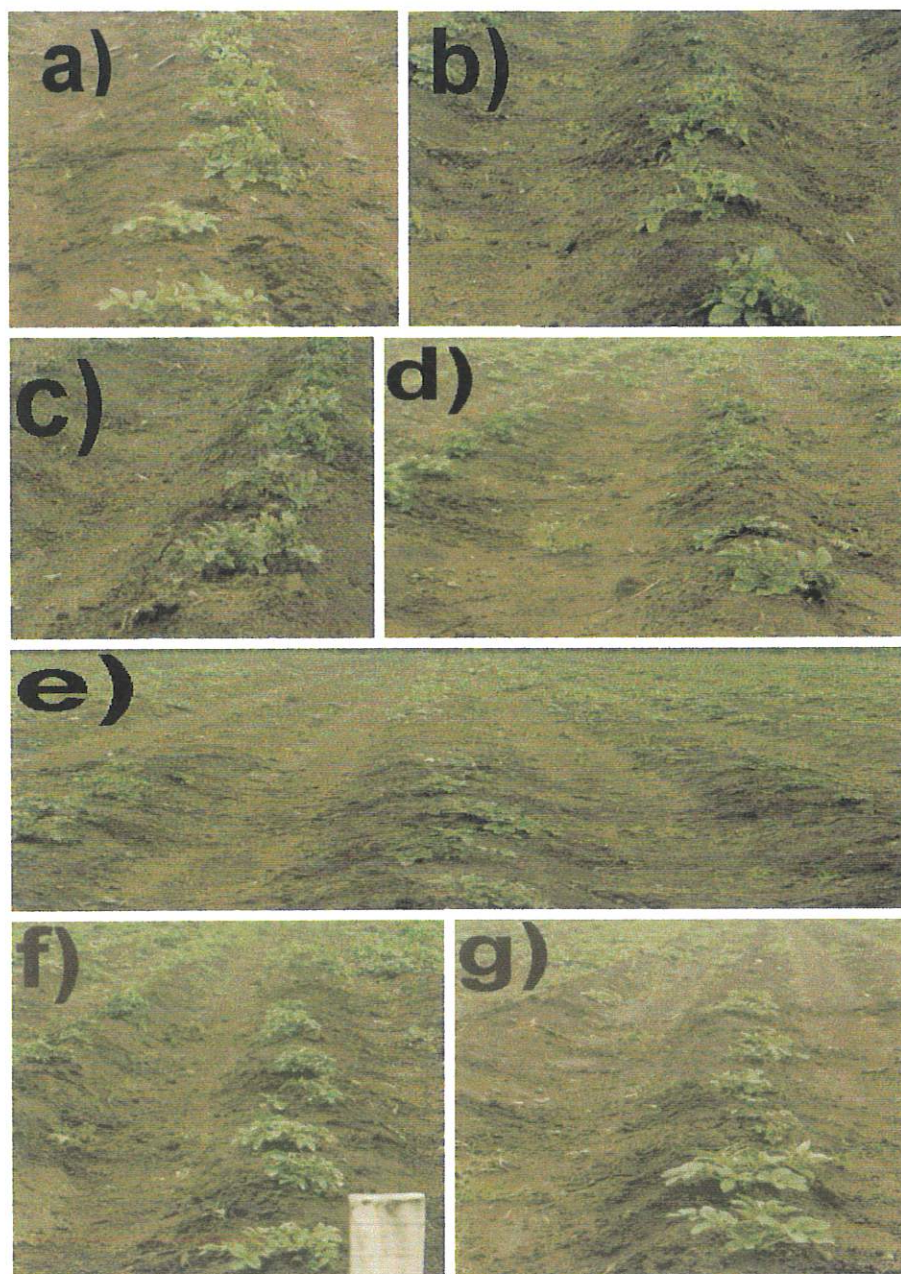


Figura 12. Efecto de los diferentes tratamientos en la fitosanidad inicial del follaje de las plantas de papa establecidas en campo durante el ciclo 2002. a) Mezcla RG1, b) Mezcla RG2, c) Mezcla TR, d) Biopak-F, e) Testigo Absoluto, f) Dimetomorf, g) Metalaxil; ninguno de los tratamientos mostró síntomas de *Phytophthora infestans*.

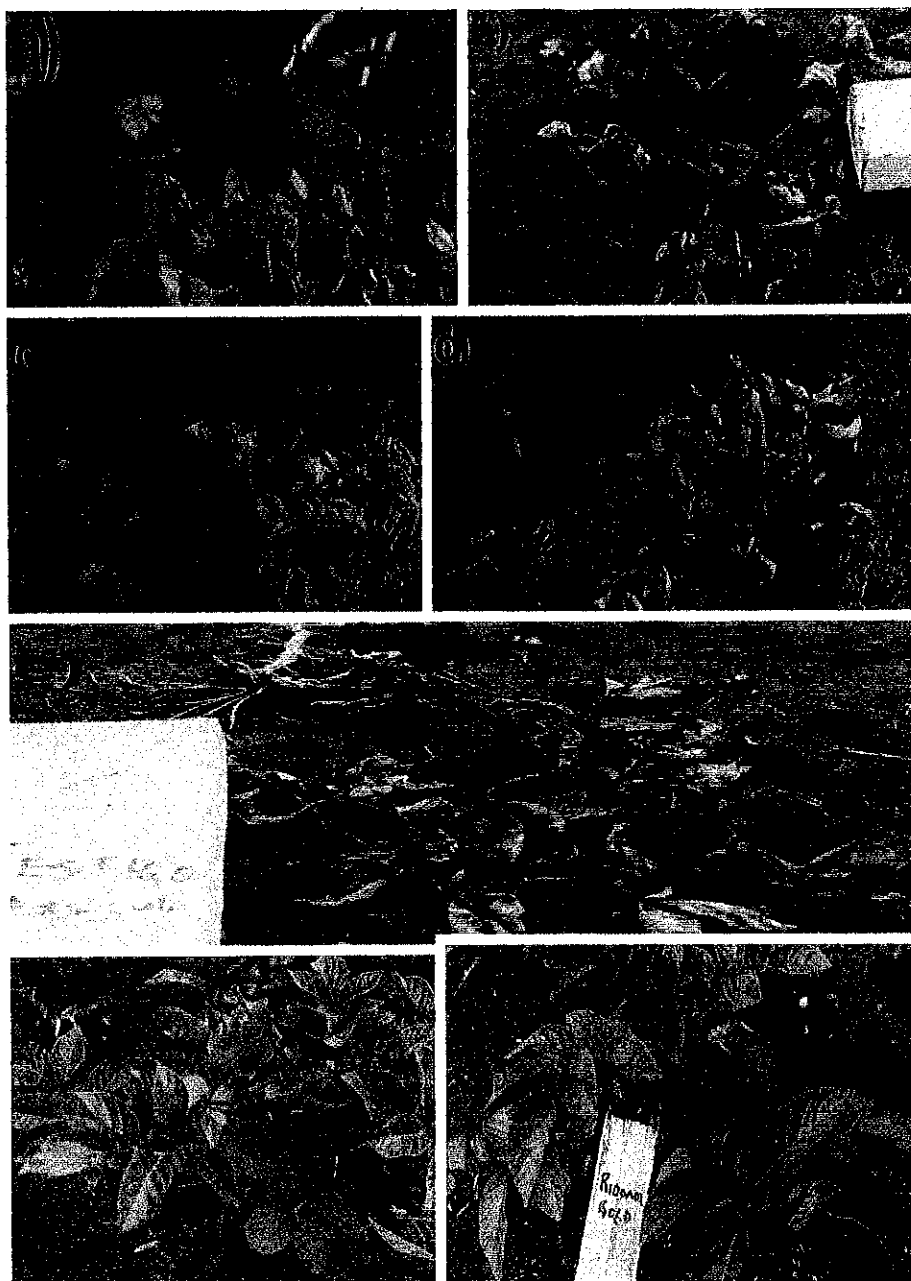


Figura 13. Efecto de los diferentes tratamientos en la fitosanidad terminal del follaje de las plantas de papa establecidas en campo durante el ciclo 2002. a) Mezcla RG1, planta con una mínima parte de follaje verde; b) Mezcla RG2, c) Mezcla TR, d) Biopak-F, e) Testigo Absoluto, en los cuatro incisos anteriores el follaje de la planta se encuentra totalmente dañado por el tizón tardío; f) Dimetomorf y g) Metalaxil, en ambos tratamientos se muestra la eficiencia de los fungicidas químicos de uso común en la protección de las plantas contra *P. infestans*.

4.4. Evaluación de antagonistas en maceta-campo 2002

En este experimento las plantas fueron mantenidas en invernadero por 42 dds antes de ser transferidas a campo. La mezcla RG2 fue el único tratamiento que mejor controló la severidad de *P. infestans* en el follaje de papa. Los tres tratamientos biológicos restantes junto con el testigo absoluto estadísticamente presentaron la misma significancia. Sin embargo, cabe señalar que ninguno de los anteriores superó a los testigos químicos, considerados como los mejores tratamientos (Figura 14).

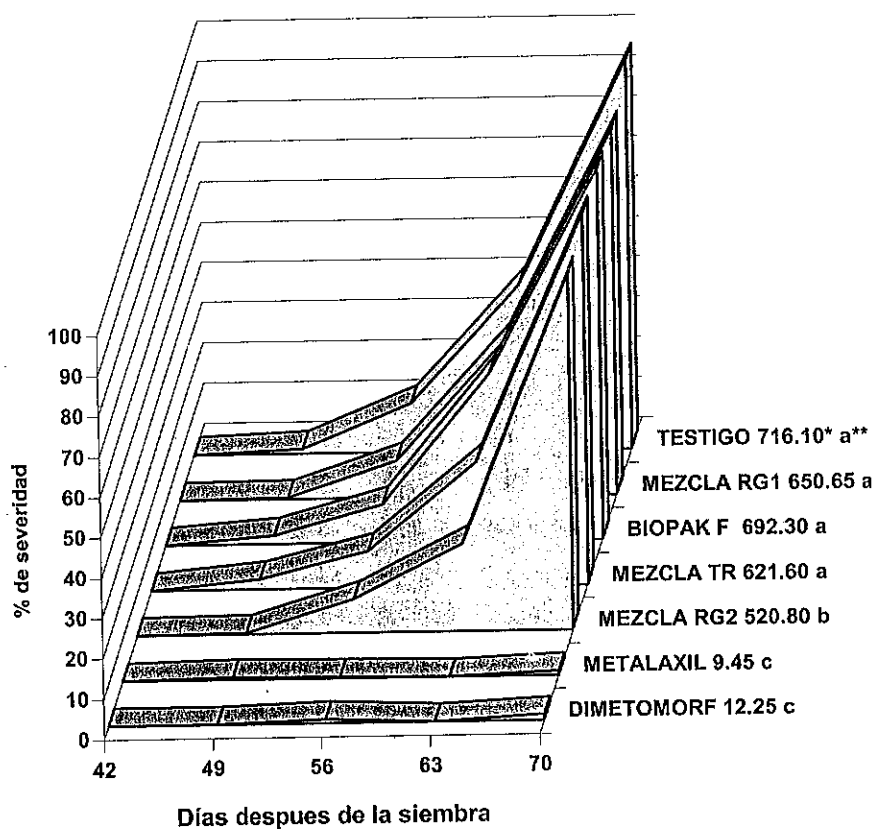


Figura 14. Efecto de los diferentes tratamientos sobre la severidad de *P. infestans* en las plantas de papa cultivadas en maceta-campo durante el ciclo 2002

*- Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad

** - Cifras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha \leq 0.05$).

Se observó que la edad de las plantas de papa ayuda a la actividad de control de los antagonistas e influye en la resistencia al ataque del tizón tardío. Todas las plantas de cada tratamiento llegaron a la etapa de producción, incluso las del testigo absoluto. Para fines de investigación esta medida es factible, pero para establecimientos comerciales existen otras medidas que pueden ayudar a mejorar e incrementar la eficacia del control biológico en condiciones de campo. Guetsky *et al.* (2002) menciona la combinación de los agentes biocontroladores con otras medidas que son menos afectadas por condiciones externas (p.e. fungicidas químicos) en alternancia o basados en un cierto esquema racional de acuerdo al pronóstico de las lluvias, desarrollo de agentes de biocontrol efectivos aún bajo un amplio rango de condiciones bióticas y abióticas y la aplicación de varios agentes biocontroladores simultáneamente, esto por poseer diferentes requerimientos ecológicos para sobrevivir, crecer y activarse.

De acuerdo con estos resultados, el obtener sólo a una mezcla antagónica como el mejor tratamiento para el control de *P. infetans*, hace suponer que los microorganismos que la conforman tienen una mayor capacidad de adaptación tanto al hospedante como al ambiente que los rodea así como la existencia de un grado de compatibilidad mayor. Steddom *et al.* (2002a) concluyen que uno de los problemas más grandes en el control biológico es mantener una población alta, es decir, un agente de biocontrol activo por todo el periodo de actividad de una enfermedad y deduce que debido a esto, el tiempo de aplicaciones de agentes de biocontrol es muy importante, demostrando la utilidad de las aplicaciones repetitivas

como estrategia para la liberación de agentes de biocontrol a escala comercial en campo.

Como en los experimentos anteriores; los tratamientos químicos siguen superando fácilmente a los tratamientos biológicos por las razones antes descritas. Grünwald *et al.* (2002) señala que el tizón tardío de la papa es frecuentemente manejado con una variedad de tácticas aunque en la agricultura comercial predomina el uso de fungicidas. Otros medios que podrían facilitar el control del patógeno sería la combinación de varias medidas sanitarias, uso de variedades resistentes y aspersiones con compuestos químicos aplicadas en la etapa adecuada (Agrios, 1996).

La severidad del tizón tardío en el follaje de las plantas de papa fue directamente proporcional al tiempo transcurrido después de la siembra (Figura 14) en los tratamientos biológicos (mezcla RG1, mezcla RG2, mezcla TR y Biopak F), así como en el testigo absoluto. No se presentaron aumentos drásticos de severidad a lo largo de tres semanas de evaluación como en el caso de las plantas establecidas en el suelo. La figura 15 muestra el estado fitosanitario de las plantas de papa antes de aplicar los tratamientos, y enseguida se ilustra la situación de las mismas al final del experimento (Figura 16).

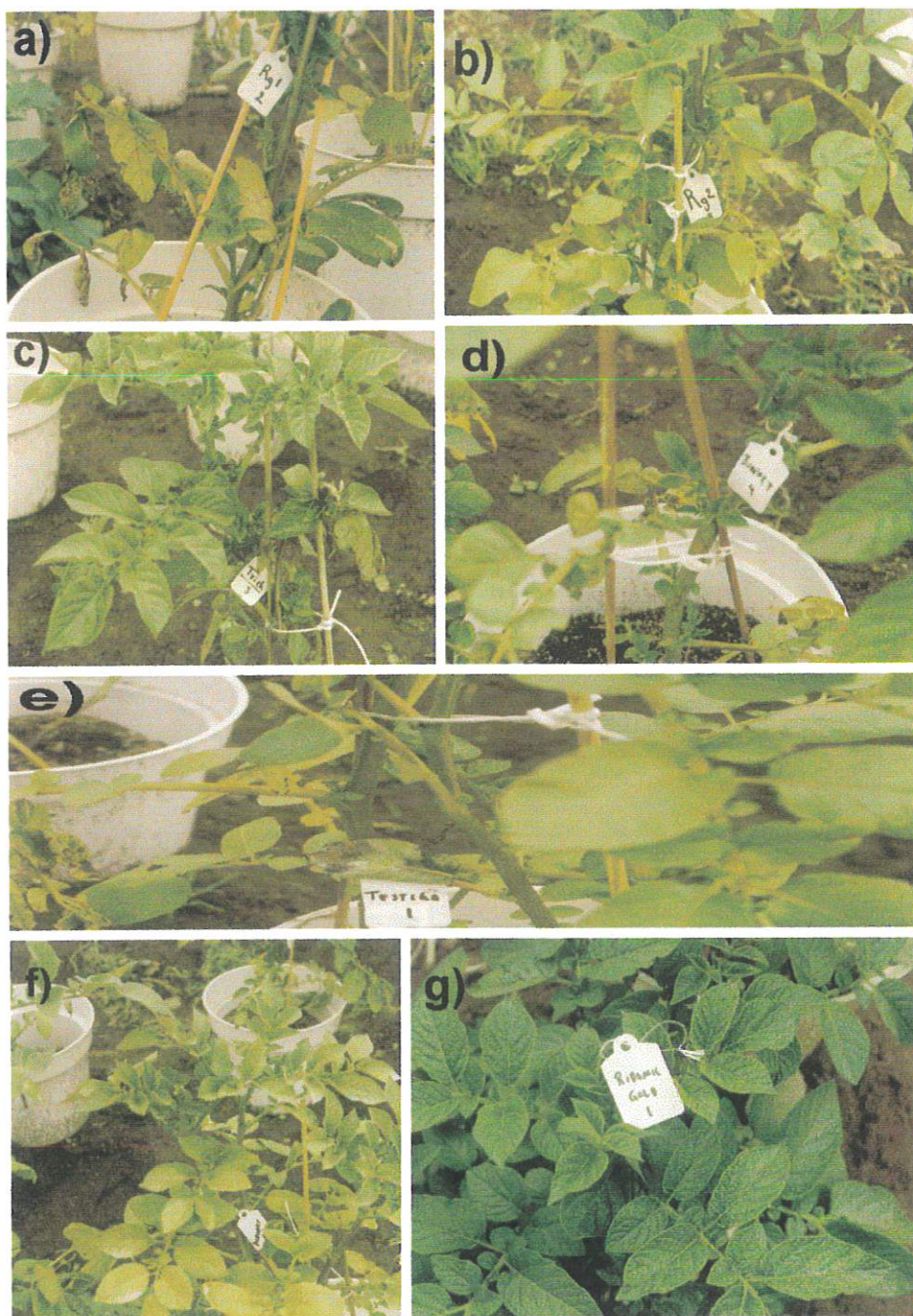


Figura 15. Efecto de los tratamientos en la fitosanidad inicial del follaje de las plantas de papa llevadas del invernadero a campo durante el ciclo 2002. a) Mezcla RG1, b) Mezcla RG2, c) Mezcla TR, d) Biopak-F, e) Testigo Absoluto, f) Dimetomorf, g) Metalaxil; Ninguno de los tratamientos muestra ataque de *Phytophthora infestans*.

Los tratamientos fueron estadísticamente diferentes ($\alpha \leq 0.05$) en cuanto al número de esporangios/mL⁻¹ producidos. En tanto la prueba de comparación de medias Tukey mostró que de los tratamientos biológicos, la mezcla RG2 y TR, así como el Biopak F fueron los que proporcionaron la mayor inhibición de la producción de esporangios; esto se sustentó debido a que si bien compartieron características estadísticas con el testigo absoluto, también lo hicieron con los fungicidas químicos (Cuadro 4), colocándolos en la parte media del rango de efectividad antagonica a *P. infestans*. El máximo control se obtuvo con los tratamientos químicos (Figura 17).

Cuadro 4. Experimento en maceta-campo 2002. Análisis de la producción de esporangios en los tratamientos aplicados para el control de *P. infestans*.

Tratamientos	Media (esporangios mL ⁻¹)	Agrupación Tukey
Testigo absoluto	11600	A
Mezcla RG1	10600	A
Biopak-F	8800	AB
Mezcla RG2	7400	AB
Mezcla TR	6000	AB
Metalaxil	800	B
Dimetomorf	800	B

($P \leq 0.05$)

Cabe señalar que la producción de esporangios fue muy inestable; en las primeras evaluaciones no se encontraron esporangios a pesar de que en el follaje de algunas plantas de algunos tratamientos ya había infección (Figura 17 evaluación a los 42 y 49 dds). La evaluación de la inhibición de esporangios se tornó muy deficiente ya que en los tratamientos se encontraron lecturas muy irregulares e incluso el testigo absoluto presentó una producción de esporangios mayor en la tercer evaluación que en la cuarta y quinta (Anexo 3). Este comportamiento pudo

deberse a las condiciones de temperatura y humedad relativa que se presentaron durante el desarrollo del experimento mismas que no fueron las más favorables ni se mantuvieron estables como en otros ciclos de cultivo pasados.

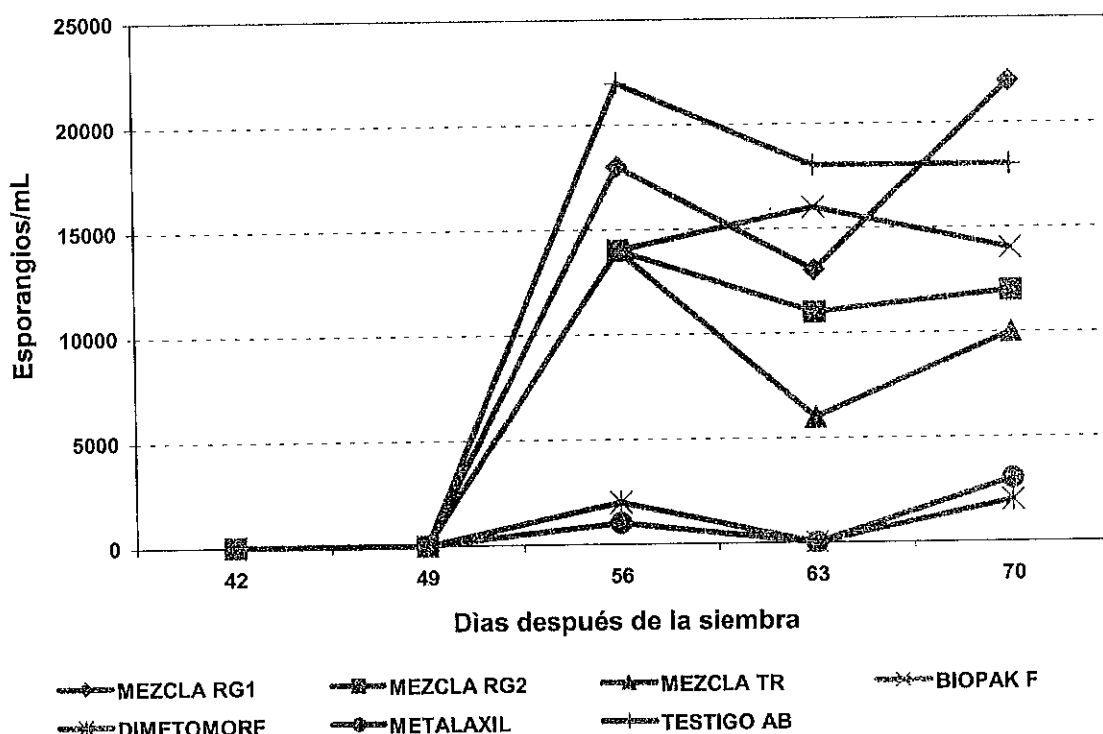


Figura 17. Producción de esporangios de *P. infestans* por tratamiento en las plantas de papa establecidas en maceta-campo durante el ciclo 2002.

La cosecha de los tubérculos fue realizada a los 70 dds observándose diferencias cuantitativas en el rendimiento obtenido de acuerdo al efecto generado por cada tratamiento, mismo que fluctuó de 1600 a 2010 g por lote de cada tratamiento. Todos los tratamientos aplicados en este experimento superaron al testigo absoluto, aunque el rendimiento de la mezcla TR y del Biopak F estuvo por arriba del testigo absoluto y este ultimo con solo 20g (1620g), pudimos observar que

existió efecto positivo por parte de ambos tratamientos en la producción de tubérculo de papa. Las mezclas RG2 y RG1 fueron los mejores tratamientos en cuanto a producción, ya que su rendimiento superó al del mejor testigo químico por más de 220 a 410 g respectivamente (Figura 18).

De todos los tratamientos utilizados (químicos y biológicos), la mezcla RG1 proporcionó el más alto rendimiento, debido probablemente a que tres de sus bacterias constituyentes tienen la capacidad de fijar nitrógeno (R16, R17 y R19) y otra más puede solubilizar fósforo (R11) *(Lara Hernández, 2002. Comunicación personal). Los rendimientos promedio de los tratamientos restantes se ubicaron sobre los del testigo absoluto y abajo de los de fungicidas químicos (Figura 18).

La sanidad del tubérculo fluctuó del 88 al 94.38 %. Los tratamientos en los que se obtuvo la producción de mayor calidad fueron con fungicidas químicos (Metalaxyl y Dimetomorf), seguidos por el empate de la mezcla RG1 y el Biopak F. Por otro lado, la mezcla RG2 y TR aunque presentaron los menores porcentajes de sanidad también superaron la sanidad del testigo absoluto (Figura 18).

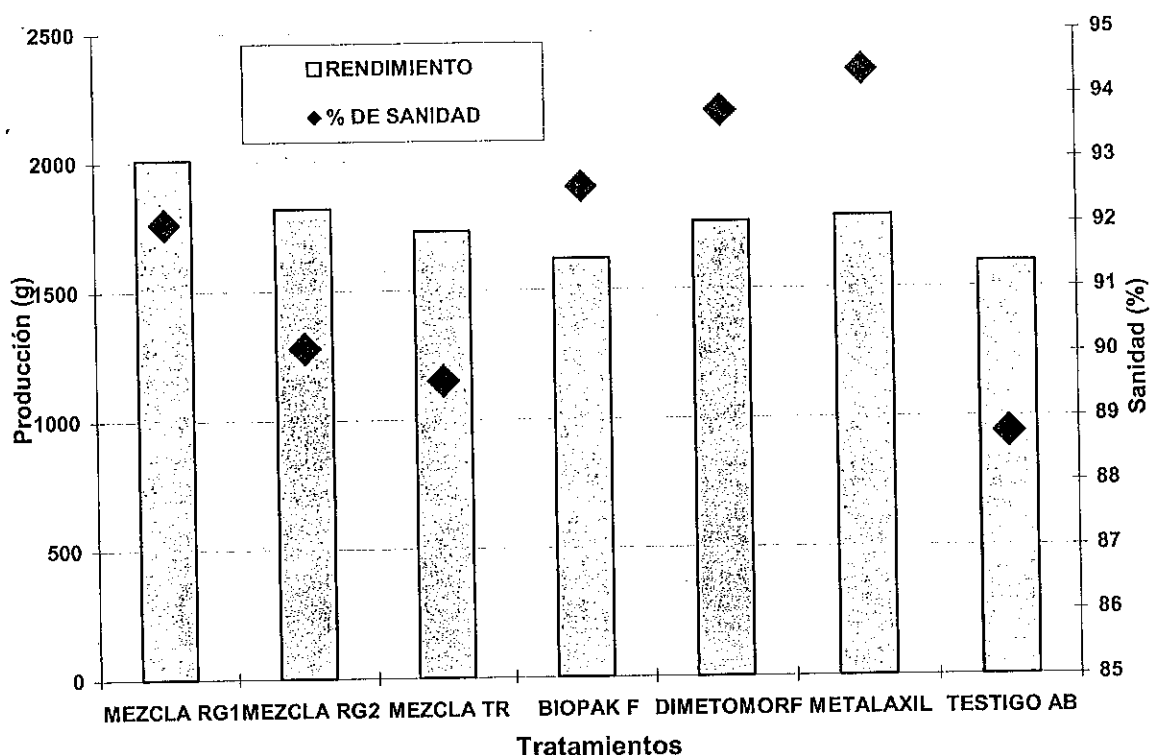


Figura 18. Efecto de los tratamientos aplicados en el experimento maceta-campo 2002 sobre el rendimiento y sanidad de tubérculos de papa producidos en condiciones de campo.

Bajo las condiciones de campo del Valle de Toluca se pudo apreciar que los fungicidas químicos son el recurso más viable para obtener producciones de alta calidad, aunque en cuanto a cantidad hayan sido superados por las mezclas RG1 y RG2. Esto podría deberse a varias interacciones positivas de compatibilidad entre sus componentes microbianos y la eficiencia del biocontrol de hongos fitopatógenos puede incrementarse combinando diferentes organismos con una amplia gama de metabolitos o genes capaces de proveer mayor control que el que podrían proporcionar los componentes individualmente. Por otro lado, el hongo imperfecto *Trichoderma* tiene la habilidad substancial de suprimir un amplio rango de hongos

fitopatógenos por medio de varios mecanismos tales como la producción de enzimas que degradan la pared celular (Lorito *et al.*, 1993b). No obstante, comercialmente los fungicidas químicos siguen siendo los mejores tratamientos.

5. DISCUSIÓN GENERAL

Todas las cepas bacterianas probadas en hojas desprendidas de papa en laboratorio tuvieron efecto antagónico sobre el desarrollo de la enfermedad cuando el inóculo consistió de esporangios y zoosporas, tanto de manera individual como mezcladas entre si por grupos afines, lo que evidenció efectividad en el control del patógeno.

Los tratamientos biológicos probados en invernadero y campo durante el ciclo 2001 repercutieron positivamente en el control del tizón tardío de la papa, tanto en follaje como en la producción de tubérculo. La mezcla de la serie de bacterias P proporciono el mayor control del tizón tardío en el follaje, en invernadero y campo mientras que la mayor producción de tubérculo se encontró en las plantas tratadas con la mezcla TR a base de *Trichoderma spp.*, sin superar la cantidad y calidad de la producción de los tratamientos químicos.

Los tratamientos biológicos probados en los experimentos establecidos durante el ciclo 2002, tuvieron efecto antagónico sobre *P. infestans* en el follaje así como promovieron la producción de tubérculos en algunos casos, de tal manera que la mezcla RG1(cepas bacterianas R5, R11, R16, R17, R19, R29) se considero como la mejor en el control del tizón tardío en el follaje de las plantas establecidas en campo directamente en el suelo, mientras que la mezcla RG2 (bacterias R33, R34, R35, R38, R44, R51) controló más eficazmente al tizón tardío en el follaje de las plantas establecidas en macetas a campo abierto. En lo que respecta a la producción

total de tubérculos las plantas tratadas con las mezclas RG1 y RG2 proporcionaron la producción más alta, superando a las tratadas con funguicidas químicos únicamente en cantidad más no en calidad.

De manera general, la fuerte presión de inóculo y las condiciones ambientales existentes en el campo del Valle de Toluca, México (Anexo 6) son probablemente la causa de que las mezclas de antagonistas (bacterias y *Trichoderma spp.*) sean menos eficientes en el control del tizón tardío al avanzar el ciclo fenológico de la papa.

Los microorganismos antagonistas utilizados en la presente investigación pudieran dar mejores resultados en el control de *P. infestans* tanto en invernadero como en otras áreas geográficas que se encuentren bajo condiciones menos favorables para el desarrollo de la enfermedad.

Los antagonistas evaluados en este trabajo proporcionaron un mejor efecto antagónico cuando se aplicaron en invernadero que en campo, esto confirma lo expuesto por Paulitz y Bélanger (2001), quienes mencionan a los sistemas de producción intensiva (invernaderos) como los nichos más adecuados para el empleo exitoso del control biológico de enfermedades vegetales, debido a que favorecen el control de varios factores entre los cuales el ambiente es uno de los principales. Las pruebas realizadas en invernadero pueden utilizarse para adaptar a microorganismos con capacidad de biocontrol a un cierto hospedante así como a condiciones ambientales específicas.

6. CONCLUSIONES

1. Se demostró la actividad antagónica de aislamientos bacterianos y fúngicos sobre el desarrollo de *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary, en diferentes ambientes. Este efecto fue más drástico en hojas desprendidas e invernadero que en el campo.
2. La presencia de los microorganismos indujo un efecto antiesporulante sobre el oomiceto fitopatógeno, aunque no a niveles de evitar la epifitía.
3. Algunos antagonistas favorecieron la producción y/o calidad de tubérculo.

7. LITERATURA CITADA

- Abad, Z. G., and J. A. Abad. 1997. Another look at the origin of late blight of potatoes, tomatoes, and pear melon in the Andes of south America. *Plant Disease* 81: 682-688.
- Abato Z, M. 1998. Antagonismo a *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary de suelos supresivos en papa. Tesis de Maestría en Fitopatología. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 74p.
- Agrios G, N. 1996. Fitopatología. Ed. Limusa, Noriega editores. México, D. F. pp: 317-324 y 183-233.
- Alarcón A., R. Ferrera-Cerrato, M. J. Manjares, N. Grünwald y H. Lozoya-Saldaña. 1999. Bacterias rizosféricas y de la tuberosfera de tres variedades de papa en función de su ciclo fenológico. Esteban Rodríguez Leyva y Juan José Escobar Aguayo (Eds.). In *Memorias del XXII Congreso Nacional de Control Biológico*. Montecillo, Edo. De Méx. 28 y 29 de Octubre de 1999. Colegio de Postgraduados. pp:47-49.
- Andrison, D.; 1995. Biology, ecology, and epidemiology of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* in soil. *Phytopathology* 85: 1053-1056.
- Anónimo. 1996. Manual para la protección de la papa. Bayer de México S. A. pp:2-3.

- Aylor, D. E., W. E. Fry, H. Mayton, and J. L. Andrade-Piedra. 2001. Quantifying the rate of release and escape of *Phytophthora infestans* sporangia from a potato canopy. *Phytopathology* 91: 1189-1196.
- Baker, R. 1987. Mycoparasitism: ecology and physiology. *Canadian Journal of Plant Pathology* 9:370-379.
- Bao, J. R., and G. Lazarovits. 2001. Differential colonization of tomato roots by nonpathogenic and pathogenic *Fusarium oxysporum* strains may influence fusarium wilt control. *Phytopathology* 91:449-456.
- Barea, J. M., C. Calvet, V. Estaún, and A. Camprubi. 1996. Biological control as a key component in sustainable agriculture. *Plant and Soil* 185:171-172.
- Benhamou, N., and I. Chet. 1993. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: Ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. *Phytopathology* 83: 1062-1071.
- Berger, F., H. Li, D. White, R. Frazer, and C. Leifert. 1996. Effect of pathogen inoculum, antagonist density, and plant species on biological control of *Phytophthora* and *Pythium* damping-off by *Bacillus subtilis* Cot1 in high-humidity fogging glasshouses. *Phytopathology* 86:428-433.
- Bin, L., G. R. Knudsen, and D. J. Eschen. 1991. Influence of an antagonistic strain of *Pseudomonas fluorescens* on growth and ability of *Trichoderma harzianum* to colonize sclerotia of *Sclerotinia esclerotiorum* in soil. *Phytopathology* 81:994-1000.
- Bull, C. T., K. G. Shetty, and K. V. Subbarao. 2002. Interactions between myxobacteria, plant pathogenic fungi, and biocontrol agents. *Plant Disease* 86:889-896.

- Calderoni A, V. 1978. Enfermedades de la papa y su control. Ed. Hemisferio sur. pp:13-21.
- Cook, R. J., Bruckart, W. L., and Coulson, J. R. 1996. Safety of microorganisms intended for pest and plant disease control. Framework for scientific evaluation. *Biological Control* 7:333-351.
- Cox, A. E. and E. C. Large. 1960. Potato blight epidemics throughout the world. Washington D. C. Agricultural Researches Service. 230p.
- Craig, H. C. 1991. Biological and cultural tests for control of plant diseases : An overview of 1991 reports. *Plant Disease* 75:969-971.
- Dandurand, L. M., and G. R. Knudsen. 1993. Influence of *Pseudomonas fluorescens* on hyphal growth and biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* in the spermosphere and rhizosphere of pea. *Phytopathology* 83:265-270.
- Doster, M. A., M. G. Milgroom, W. E. Fry. 1990. Quantification of factors influencing potato late blight suppression and selection for metalaxyl resistance in *Phytophthora infestans*: A simulation approach. *Phytopathology* 80: 1190-1198.
- Dunne, C., I. Delany, A. Fenton, and F. O'Gara. 1996. Mechanisms involved in biocontrol by microbial inoculants. *Agronomie* 16:721-729.
- Espinosa-Ramos C. A, R. Ferrera-Cerrato, A. Alarcón. 1999. Propiedades antagónicas de hongos endorrizosféricos aislados de *Solanum spp.* contra *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary. Esteban Rodríguez Leyva y Juan José Escobar Aguayo (Eds.). In Memorias del XXII Congreso Nacional de Control Biológico. Montecillo, Edo. De Méx. 28 y 29 de Octubre de 1999. Colegio de Postgraduados. pp:53-56.

- Ferrera-Cerrato R, M. E. Lara H, A. Alarcón, N. Grünwald y H. Lozoya-Saldaña. 1999. Capacidad antibiótica de bacterias aisladas de Rizosfera de *Solanum tuberosum* L. Contra *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary. Esteban Rodríguez Leyva y Juan José Escobar Aguayo (Eds.). In Memorias del XXII Congreso Nacional de Control Biológico. Montecillo, Edo. De Méx. 28 y 29 de Octubre de 1999. Colegio de Postgraduados. pp:63-66.
- Ferrera-Cerrato, R., A. Alarcón, M. A. Manjares, I. Portilla. 1998. Searching for antagonistic microorganisms against *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary in soil rhizospheric and potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. Colegio de Postgraduados. Montecillo Edo. De México. In Technical Report 1998. Programa Internacional Cooperativo del Tizón Tardío de la Papa A. C. (PICTIPAPA A.C.). Hector Lozoya Saldaña (Ed.). pp:39-53.
- Ferrera-Cerrato, R., M. E. Lara, A. Alarcón, J. J. Almaraz, J. Velasco. 1999. Antagonistic microorganisms to late blight (*Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary) in rhizospheric soil, tuberosphere, rhizoplane, phyloplane and caulosphere of potatoes (*Solanum tuberosum* L.). Colegio de Postgraduados. Montecillo Estado de México. In Technical Report 1999. Programa Internacional Cooperativo del Tizón Tardío de la Papa A. C. (PICTIPAPA A.C.). Hector Lozoya Saldaña (Ed.). pp:70-74.
- French R, T y T Hebert T. 1982. Métodos de investigación patológica . Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San Jose, Costa Rica. pp:168-211.
- Fry, W. E., S. B. Goodwin, A. T. Dyer, and J. M. Matuszak. 1993. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: Chronology, pathways, and implications. Plant disease. 77: 653-661.
- Glass, J. R., K. B. Johnson, and M. L. Powelson. 2001. Assessment of barriers to prevent the development of potato tuber blight caused by *Phytophthora infestans*. Plant Disease 85:521-528.

- Goodwin, S. B., L. J. Spielman, J. M. Matuszak, S. N. Bergeron, and W. E. Fry. 1992. Clonal diversity and genetic differentiation of *Phytophthora infestans* populations in Northern and central México. *Phytopathology* 82:955-961.
- Green, H., and D. F. Jensen. 1995. A tool for monitoring *Trichoderma harzianum*: II. The use of a GUS transformant for ecological studies in the rhizosphere. *Phytopathology* 85: 1436-1440.
- Grünwald, N. J., O. A. Rubio-Covarrubias, and W. E. Fry. 2000. Potato late-blight management in the Toluca Valley: Forecasts and resistant cultivars. *Plant Disease* 84:410-416.
- Grünwald, N. J., M. A. Hinojosa Cadena, O. Rubio Covarrubias, A. Rivera Peña, J. S. Niederhauser, and W. E. Fry. 2002. Potato cultivars from the mexican national program: Sources and durability of resistance against late blight. *Phytopathology* 92:688-693.
- Guetsky, R., D. Shtienberg., Y. Elad., E. Fischer, and A. Dinoor. 2002. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. *Phytopathology* 92: 976-985.
- Hagedorn, C., W. D. Gould, and T. R. Bardinelli. 1993. Field evaluations of bacterial inoculants to control seedling disease pathogens on cotton. *Plant Disease* 77: 278-282.
- Handelsman, J., and E. V. Stabb. 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *The Plant Cell* 8: 1855-1869.
- Harman, G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* 84: 377-392.

- Henfling J, W. 1987. El tizón tardío de la papa. *Phytophthora infestans*. Segunda edición. Centro internacional de la papa (CIP). Lima, Perú. 25 p.
- Hoitink, H. A. J., and M. J. Boehm. 1999. Biocontrol within the context of soil microbial communities: A substrate-dependent phenomenon. Annual Review Phytopathology 37:427-446.
- Hooker W, J. 1980. Compendio de enfermedades de la papa. Centro Internacional de la papa. pp:56-60, 91-94.
- Knudsen, G. R., and L. Bin. 1990. Effects of temperature, soil moisture, and wheat bran on growth of *Trichoderma harzianum* from alginate pellets. Phytopathology 80: 724-727.
- Lara H, M. E y R. Ferrera-Cerrato. 2002. Mecanismos microbianos en el control biológico. Microbiología Agrícola. R. Ferrera-Cerrato y A. Alarcón (eds.). Mundi-Prensa, México (ed.). en prensa.
- Liebman, J. A., and L. Epstein. 1992. Activity of fungistatic compounds from soil. Phytopathology 82: 147-153.
- Lindow, S. E., G. McGourty, and R. Elkins. 1996. Interactions of antibiotics with *Pseudomonas fluorescens* strain A506 in the control of fire blight and frost injury to pear. Phytopathology 86:841-848.
- Lodovica, M. G., Q. Migheli, and M. Mezzalama. 1995. Risk analysis in the release of biological control agents. Plant Disease 79: 1193-1201.
- Lorito, M., G. E. Harman, C. K. Hayes, R. M. Broadway, A. Tronsmo, S. L. Woo, and A. Di Pietro. 1993a. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: Antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. Phytopathology 83: 302-307.

- Lorito, M., A. Di Pietro, C. K. Hayes, S. L. Woo, and G. E. Harman. 1993b. Antifungal, synergistic interaction between chitinolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* and *Enterobacter cloacae*. *Phytopathology* 83: 721-728.
- Lorito, M., C. K. Hayes, A. Di Pietro, S. L. Woo, and G. E. Harman. 1994. Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan 1,3- β -glucosidase and an N-acetyl- β -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 84: 398-405.
- Lozoya-Saldaña, H., and A. Hernandez-Vilchis. 2001^a. Postharvest decay of potato tubers in moist chamber and in two types of soil. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:140-146.
- Lozoya-Saldaña, H. And A. Hernández-Vilchis. 2001b. Registered and section 18 compounds for control of late blight (*Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary) in potatoes in Toluca, México. *Agrociencia* 35:451-458.
- Malajczuk, N. 1983. Microbial antagonism to *Phytophthora*. In *Phytophthora; its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. D. C. Erwin, S. Bartnicki-García, and P. H. Tsao (Eds.). The American Phytopathological Society. APS PRESS. pp:197-218.
- Mathre, D. E., R. J. Cook, and N. W. Callan. 1999. Traversing the world of commercializing biocontrol agents for plant disease control. *Plant Disease* 83:972-983.
- Maurhofer, M., C. Keel, U. Schnider, C. Voisard, D. Hass, and G. Défago. 1992. Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 on its disease suppressive capacity. *Phytopathology* 82:190-195.
- Mayton, H., G. A. Forbes, E. S. G. Mizubuti, and W. E. Fry. 2001. The roles of three fungicides in the epidemiology of potato late blight. *Plant Disease* 85:1006-1012.

- Mizubuti, E. S. G., D. E. Aylor, and W. E. Fry. 2000. Survival of *Phytophthora infestans* sporangia exposed to solar radiation. *Phytopathology* 90:78-84.
- Niederhauser, J. S. 1956. The blight, the blighter, and the blighted. *Agricultural Journal of the Rockefeller Foundation* 19:55-63.
- Niederhauser J, S. y J Cervantes. 1956. La papa como cultivo de temporal en los valles altos de México. Programa cooperativo de agricultura entre la secretaría de agricultura y ganadería y la fundación Rockefeller. México. pp: 7-8.
- Niederhauser, J. S. 1991. *Phytophthora infestans*: the Mexican connection. In: *Phytophthora* (Symposium of the British Mycological Society, The British Society for Plant Pathology, and the Society of Irish Plant Patologists). J. A. Lucas, R. C. Shattock. D. S. Shaw y Louise R. Cooke. (Eds.) Dublin, Ireland. September 1989. Cambridge University Press. pp:25-45.
- Paulitz, T. C., and R. R. Bélanger. 2001. Biological control in greenhouse systems. *Annual Review Phytopathology* 39:103-133.
- Pedroza S, A. 1995. Epidemiología Agrícola. Principios y Aplicaciones. Universidad Autónoma Chapingo. Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas. Bermejillo, Durango. 104p.
- Punja, Z. K. 1997. Comparative efficacy of bacteria, fungi, and yeasts as biological control agents for diseases of vegetable crops. *Canadian Journal of Plant Pathology* 19:315-323.
- Pusey, P. L. 2002. Biological control agents for fire blight of apple compared under conditions limiting natural dispersal. *Plant Disease* 86:639-644.
- Reddick, D. 1932. Some diseases in wild potatoes in México.. *Phytopathology*. 22:609-612.

- Roiger, D. J., and S. N. Jeffers. 1991. Evaluation of *Trichoderma Spp.* For biological control of *Phytophthora* crown and root rot of apple seedlings. *Phytopathology* 81: 910-917.
- Romero C, S. 1993. Hongos Fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. Dirección general del patronato Universitario. Chapingo, México. 347p.
- Rousseau, A., N. Benhamou, I. Chet, and Y. Piché. 1996. Mycoparasitism of the extramatrical phase of *Glomus intraradices* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 86: 434-443.
- Schwinn, F. J. 1983. New developments in chemical control of *Phytophthora*. In *Phytophthora* its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology. D. C. Erwin, S. Bartnicki-García, and P. H. Tsao (Eds.). The American Phytopathological Society. APS PRESS. pp:327-334.
- Shea, S. R., and P. Broadbent. 1983. Developments in cultural and biological control of *Phytophthora* diseases. In *Phytophthora* its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology. D. C. Erwin, S. Bartnicki-García, and P. H. Tsao (Eds.). The American Phytopathological Society. APS PRESS. pp:335-350.
- Shtienberg, D., and W. E. Fry. 1990. Field and computer simulation evaluation of spray-scheduling methods for control of early and late blight of potato. *Phytopathology* 80: 772-777.
- Shtienberg, D., R. Raposo, S. N. Bergeron, D. E. Legard, A. T. Dyer, and W. E. Fry. 1994. Incorporation of cultivar resistance in a reduced-sprays strategy to suppress early and late blights on potato. *Plant Disease* 78:23-26.
- Stanghellini, M. E., and R. M. Miller. 1997. Their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. *Plant Disease* 81:4-12.

- Steddom, K., O. Becker, and J. A. Menge. 2002a. Repetitive applications of the biocontrol agent *Pseudomonas putida* 06909-rif/nal and effects on populations of *Phytophthora parasitica* in citrus orchards. *Phytopathology* 92:850-856.
- Steddom, K., J. A. Menge, D. Crowley, and J. Borneman. 2002b. Effect of repetitive applications of the biocontrol bacterium *Pseudomonas putida* 06909-rif/nal on citrus soil microbial communities. *Phytopathology* 92:857-862.
- Sujkowski, L. S., B. A. Fry, R. J. Power, S. B. Goodwin, T. L. Peever, R. A. Halmen, and W. E. Fry. 1995. Sensitives of Mexican isolates of *Phytophthora infestans* to chlorothalonil, cymoxanil, and metalaxyl. *Plant Disease* 79:1117-1120.
- Torres L, J. M. 1991. Supresividad de suelo al ataque de *Phytophthora infestans* (Mont) De Bary a tubérculos de papa en Toluca, Edo. De México. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Méx. 78p.
- Utkhede, R. S. 1996. Potential and problems of developing bacterial biocontrol agents. *Canadian Journal of Plant Pathology* 18:455-462.
- Van Loon, L. C., P. A. Bakker, and C. M. J. Pieterse. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review. Phytopathology* 36:453-483.
- Weller, D. M. 1998. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review Phytopathology* 26:379-407.
- Whipps, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52: 487-511.
- Wiley, J., y Bons. 1996. Phylogeny. *Introductory Mycology*. Cuarta edición. pp:63.
- Zentmyer, G. A. 1983. The World of *Phytophthora*. In: *Phytophthora*, its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology. D. C. Erwin, S. Bartnicki-García, and P. H. Tsao (Eds.). The American Phytopathological Society. APS PRESS. pp: 1-7.

8. ANEXOS

Anexo 1. Medios de cultivo

Agar Nutritivo

20 g de medio agar nutritivo (Merck®) por litro de agua destilada.

Procedimiento: En un matraz de 1 litro de capacidad colocar 500 mL de agua destilada y adicionar 7.5 g de agar nutritivo, tapar con papel aluminio sujetado con una liga de hule y esterilizar en una olla de presión a 18 lb pulg.⁻² por un lapso de 18 minutos. Una vez que el medio tiene una temperatura aceptable al tacto se procede al llenado cajas de Petri esterilizadas con aproximadamente 20 mL por caja. Esto último se realiza en condiciones asépticas.

Papa Dextrosa Agar (PDA)

39 g de medio PDA (Sigma®) por litro de agua destilada.

Procedimiento: En un matraz de 1 L de capacidad colocar 500 mL de agua destilada y adicionar 19.5 g de PDA. La esterilización y vaciado se realizó tal y como y como se describió en el apartado anterior.

Agar Agua

Pueden emplearse de 8 a 15 g de Agar-agar (Merck®) por litro de agua destilada

Procedimiento: En un matraz de 500 mL de capacidad poner 200 mL de agua destilada y agregar 4 g de agar-agar. El esterilizado vaciado en cajas de Petri se realiza de igual manera que en el apartado inicial.

Caldo nutritivo

8 g de caldo nutritivo (Merck®) por litro de agua destilada.

Procedimiento: Agregar 4 gramos de caldo nutritivo en 500 mL de agua destilada, contenidos en un matraz erlenmeyer de 1 litro de capacidad. La esterilización se realizó como se describe anteriormente.

Conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de bacterias y hongos en tubérculos de papa embebidos, en hojas de papa asperjadas y en mezclas diluidas.

La evaluación de la población microbiana por medio de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) presentes en tubérculos y hojas de papa se realizó de la siguiente manera:

Se tomaron 10 trocitos de 1 cm² ya sea de la superficie de tres tubérculos de papa embebidos o de los folíolos asperjados (uno por foliolo), seleccionados para tal objetivo.

Los 10 trocitos (según cada caso), fueron colocados en tubos de dilución con 9 mL de agua destilada estéril; este se agitó en un vortex por dos minutos obteniéndose así la dilución 10⁻¹. 1 mL de tal suspensión fue transferido a otro tubo de dilución para dar lugar a la dilución 10⁻². Este procedimiento se repitió hasta llegar a la dilución 10⁻⁷.

Para la cuantificación de la población microbiana se escogieron las tres diluciones más apropiadas de cada mezcla. Para el caso de las bacterias, las diluciones seleccionadas fueron 10^{-5} a 10^{-7} mientras que para los hongos, estas fueron 10^{-2} a 10^{-4} . Posteriormente, 0.1 mL de las diluciones anteriores fue colocado por triplicado en la parte central de una caja petri con medio sólido, Agar Nutritivo en el caso de las bacterias y PDA para el hongo (Anexo 1). La alícuota (0.1 mL) fue distribuida uniformemente en el medio de la caja con la ayuda de un tubo de cristal esterilizado. Todo lo anterior se hizo en condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar. Las cajas fueron incubadas durante cinco días a 28°C . La evaluación de las bacterias se realizó dos días después de la siembra y la de los hongos a los dos y cinco días después de la siembra. El promedio de las tres cajas fue convertido a UFC mL^{-1} o UFC cm^{-2} de cada prueba.

Anexo 2. Fermentador

Material

Para la elaboración de este fermentador se utilizó el material siguiente: manguera de látex de 7 mm de diámetro interior, tubo de cristal de 7 mm de diámetro exterior, jeringas esterilizables de 60 cc de capacidad, algodón absorbente, velo de ángel, gasa, tapones de hule del número 6.5 y 9, papel aluminio, pinzas Hoffman, ligas de hule, matraces erlenmeyer de 1000 mL y aditamentos para pecera (manguera de plástico flexible, una bomba de aire, dos válvulas de paso de aire una de cinco pasos y otra de dos).

Armado

Filtros. Para la elaboración de los filtros se utilizaron jeringas de 60 cc cuya parte frontal (donde va la aguja) fue cortada (estas serán referidas posteriormente como tubos). Una vez realizado lo anterior, se procedió a introducir algodón hasta llenar dos terceras partes del tubo, colocando al final gasa y velo de ángel. En cada lado del tubo fue colocado un tapón de hule en cuya perforación de 7 mm de diámetro se colocó a su vez un pedazo de tubo de vidrio de 7 mm de diámetro exterior y de 6 a 8 cm de longitud; una vez colocados los tubos los tapones fueron sujetos con hilo. Finalmente los filtros fueron sellados con masquen tape.

Distribuidor de aire. Este distribuidor se armó con una válvula de cinco pasos de aire y otra de dos pasos unidas por manguera de hule. Todo este material generalmente se utiliza como aditamento para peceras. Una vez unidas las dos válvulas, se tienen seis salidas de aire y en cada una de ellas se conectó un pedazo de manguera de hule de pecera de 8 cm de largo que sirvió para conectar las fuentes de aire a los fermentadores.

Cámara de fermentación. A cada matraz erlenmeyer de 1000 mL se le colocó un tapón de hule del número 9 con dos perforaciones de 7 mm de diámetro. En estas

perforaciones se introdujeron tubos de vidrio de 7 mm de diámetro exterior: uno con 30 cm y el otro con 20 cm de longitud; los dos tubos fueron doblados a un ángulo de 90° y 45° respectivamente, de tal manera que el tubo de mayor longitud funcionó como entrada de aire y el más corto de salida.

Ensamblado

La fuente de aire para los fermentadores es la bomba de pecera. Esta se conecta a la entrada principal del distribuidor de aire mediante manguera de plástico flexible.

En cada una de las seis salidas de aire del distribuidor se conectó un filtro de algodón mediante un pedazo de manguera de látex.

A cada pedazo de manguera de látex se le colocó una pinza Hoffman en su parte media para controlar más eficientemente el paso de aire y evitar movimiento innecesario de las conexiones. Sus extremos fueron además asegurados con ligas de látex para evitar fugas de aire.

El filtro conectado al distribuidor de aire se colocó en la entrada de aire de la cámara de fermentación (tubo de vidrio más largo) con ayuda de manguera de látex. La longitud de la manguera fue variada (debe cubrir perfectamente los tubos de vidrio tanto el de salida del filtro como el de entrada de aire de la cámara de fermentación). Las uniones se aseguraron con ligas de látex perfectamente estiradas y amarradas.

En la salida de aire de cada cámara de fermentación (tubo mas corto) se conectó otro filtro de algodón mediante un pedazo de manguera de látex, que cubrió totalmente los tubos de vidrio (el de salida de la cámara y el de entrada del filtro). Las uniones se aseguran con ligas y pinzas Hoffman.

Funcionamiento

Esterilización del material. Todas las partes que forman a la batería de fermentadores se esterilizaron a una presión de 18.5 lb pulg.⁻² por un periodo de una hora, y el armado se realizó en condiciones asépticas.

Inoculación. En cada cámara de fermentación se colocaron 500 mL de medio de cultivo líquido (caldo nutritivo) esterilizado como se describió en el apartado 8.1.1. Una vez que se enfrió, el medio líquido fue inoculado con ayuda del asa bacteriológica con cada una de las cepas de bacterias que se pretendían incrementar. El inóculo fue tomado de las placas de AN previamente sembradas el cual se diluyó en 5 mL de agua destilada estéril; y fue vertido en el medio líquido contenido en las cámaras de fermentación, todo esto fue realizado en condiciones asépticas en la cámara de flujo laminar y calor (mecheros).

Aireación. El abastecimiento de oxigenación a cada fermentador se proporcionó con la bomba de aire de pecera. Para ello se introdujo el tubo de vidrio de entrada de aire lo más abajo posible sin tocar el fondo del matraz. Los pasos de aire del distribuidor fueron calibrados para lograr una aireación constante y adecuada sobre el medio líquido, es decir, que la formación de burbujas de aire en el interior no sobrepasar el tubo de salida.

Tiempo de aireación. El tiempo que se le proporcionó aireación a los fermentadores en función del grado de turbidez alcanzado en el medio y a la producción de inóculo, fue variado, siendo de cinco días el período óptimo.

Producción de inóculo libre de contaminantes. Se realizaron pruebas para determinar la cantidad de inóculo producido en cada cámara de fermentación cuantificándose 81.3×10^6 UFC mL⁻¹. Se corroboró además la ausencia de agentes contaminantes en las bacterias de interés objeto del incremento. Esto fue realizado con bacterias cuyas características morfológicas facilitaron su identificación (R51 por ejemplo).

Anexo 3. Datos obtenidos en las diferentes evaluaciones realizadas

Evaluaciones realizadas en el año 2001

Porcentaje de severidad (%promedio) de *P. infestans* en el experimento de invernadero durante el ciclo 2001.

DDS	MEZCLA A	MEZCLA P	MEZCLA TR	BIOPAK F	ACROBAT	TESTIGO ABSOLUTO
30	0	0	0	0	0	0
37	1.5	2.5	1.5	2	2	3
44	10.5	7.8	6.5	5.3	4.3	9.1
51	12.3	7	10.3	6.8	3.5	18.3
58	19.3	14.5	19	15.5	3.8	43
65	40.8	25.8	32	45.3	2.5	73

DDS = Días después de la Siembra

Número de esporangios mL⁻¹ producidos en los tratamientos de invernadero 2001.

DDS	MEZCLA A	MEZCLA P	MEZCLA TR	BIOPAK F	ACROBAT	TESTIGO ABSOLUTO
30	0	0	0	0	0	0
37	7000	6000	7000	6000	5000	8000
44	32000	14000	18000	8000	5000	27000
51	69000	85000	98000	33000	28000	113000
58	118000	41000	40000	95000	28000	143000
65	131000	79000	135000	80000	8000	168000

Rendimiento de tubérculos de papa por tratamiento en el experimento de invernadero durante el ciclo 2001.

TRATAMIENTO	PESO TUBÉRCULO SANO (g)	PESO TUBÉRCULO ENFERMO (g)
MEZCLA A	368	81
MEZCLA P	469	188
MEZCLA TR	930	93
BIOPAK F	375	143
DIMETOMORF	1135	0
TESTIGO ABSOLUTO	456	193

Porcentaje de severidad (%promedio) de *P. infestans* en el experimento de campo durante el ciclo 2001.

DDS	MEZCLA A	MEZCLA P	MEZCLA TR	BIOPAK F	RIDOMIL GOLD	TESTIGO ABSOLUTO
16	0	0	0	0	0	0
23	15.6	12	27.5	18.8	26	24
30	81	36.5	52.5	67.5	5	73.5
37	96.3	69	91.9	95.2	3	95.1
44	100	100	100	100	0.5	100

DDS = Días después de la Siembra

Evaluaciones realizadas en el año 2002

Porcentaje de severidad (%promedio) de *P. infestans* en el experimento de campo durante el ciclo 2002.

DDS	MEZCLA RG1	MEZCLA RG2	MEZCLA TR	BIOPAK F	ACROBAT	RIDOMIL GOLD	TESTIGO ABS.
14	0	0	0	0	0	0	0
21	4.1	8.3	8.6	9.6	0.4	0.4	5.8
28	44.5	56.5	56.5	59	1.7	1.5	73.8
35	98.8	99.4	99.3	100	0.4	2.1	100

DDS = Días después de la Siembra

Porcentaje de severidad (%promedio) de *P. infestans* en el experimento de maceta-campo durante el ciclo 2002.

DDS	MEZCLA RG1	MEZCLA RG2	MEZCLA TR	BIOPAK F	ACROBAT	RIDOMIL GOLD	TESTIGO ABS.
42	0	0	0	0	0	0	0
49	0.3	0.3	2.5	2.1	0	0.5	1.2
56	9.1	8.3	9.1	9.4	1	0.3	11.9
63	38.3	21.8	30.8	41.5	0	0	41
70	90.5	86	91.8	91.8	1.5	1.1	96.4

DDS = Días después de la Siembra

Número de esporangios mL^{-1} producidos en los tratamientos en maceta-campo durante el ciclo 2002.

DDS	MEZCLA RG1	MEZCLA RG2	MEZCLA TR	BIOPAK F	ACROBAT	RIDOMIL GOLD	TESTIGO ABS.
42	0	0	0	0	0	0	0
49	0	0	0	0	0	0	0
56	18000	14000	14000	14000	2000	1000	22000
63	13000	11000	6000	16000	0	0	18000
70	22000	12000	10000	14000	2000	3000	18000

DDS= Días después de la siembra

Rendimiento de tubérculos de papa por tratamiento en el experimento de maceta-campo durante el ciclo 2002.

TRATAMIENTO	PESO TUBÉRCULO SANO (g)	PESO TUBÉRCULO ENFERMO (g)
MEZCLA RG1	1850	160
MEZCLA RG2	1640	180
MEZCLA TR	1550	180
BIOPAK F	1500	120
DIMETOMORF	1650	110
METALAXIL	1680	100
TESTIGO ABSOLUTO	1420	180

Anexo 4. Programas estadísticos utilizados.

Programa utilizado en S.A.S® para el análisis estadístico de los datos obtenidos en las diferentes evaluaciones hechas en laboratorio.

```
DATA ;  
INPUT BACTER $ REPE VESC;  
VALE=SQRT(VESC); transformación  $x' = \sqrt{x}$   
CARDS;  
DATOS DEL LABORATORIO;
```

```
PROC PRINT;  
PROC GLM;  
CLASS BACTER REPE;  
MODEL VALE= BACTER REPE;  
MEANS BACTER/TUKEY;  
RUN;
```

Programa utilizado en S.A.S® para el análisis estadístico de los datos obtenidos en las diferentes evaluaciones hechas en invernadero y campo.

```
DATA ;  
INPUT EVALUACION DDS REP MEZCLA SEV;  
CARDS;  
DATOS DE CAMPO;
```

```
PROC SORT; BY MEZCLA REP DDS;  
DATA AUDPC; SET CAMPO;  
    SEGAREA = ((SEV + LAG (SEV))/2) * (DDS - LAG(DDS));  
    IF DDS =16 THEN SEGAREA = . ;  
PROC PRINT;  
TITLE 'Área Parcial Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (% - días).';  
PROC SUMMARY DATA = AUDPC NWAY;  
    CLASS REP MEZCLA;  
    VAR SEGAREA;  
    OUTPUT OUT = TOTAREA SUM(SEGAREA)=TOTAREA;  
PROC PRINT;  
TITLE 'Área Total Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (%-días).';  
TITLE2 'por repetición, de los tratamientos utilizados Vs. Tizón tardío.';  
    PROC GLM DATA=TOTAREA;  
    CLASS REP MEZCLA;  
    MODEL TOTAREA = REP MEZCLA;  
    MEANS MEZCLA/TUKEY;  
TITLE 'Anova para el Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (%-días).';  
RUN;
```

Anexo 5. Análisis de varianza de los diferentes experimentos realizados

Evaluación en hojas desprendidas de papa de bacterias serie A sobre esporangios de *P. infestans*.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Pr > F
Tratamiento	12	9.98	0.83	4.37	0.0003
Error	35	6.66	0.19		
Total	47	16.65			
$R^2 = 0.59$		C. V. (%) = 31.13			

Evaluación en hojas desprendidas de papa de bacterias serie A sobre zoosporas de *P. infestans*.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Pr > F
Tratamiento	12	8.49	0.70	3.83	0.0009
Error	35	6.46	0.18		
Total	47	14.95			
$R^2 = 0.56$		C. V. (%) = 32.10			

Evaluación en hojas desprendidas de papa de bacterias serie R sobre esporangios de *P. infestans*.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Pr > F
Tratamiento	19	6.42	0.33	5.16	0.0001
Error	70	4.58	0.06		
Total	89	11.00			
$R^2 = 0.58$		C. V. (%) = 18.14			

Evaluación en hojas desprendidas de papa de bacterias serie R sobre zoosporas de *P. infestans*.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Pr > F
Tratamiento	19	5.05	0.26	3.94	0.0001
Error	70	4.72	0.06		
Total	89	9.78			
$R^2 = 0.51$		C. V. (%) = 18.67			

Experimento en invernadero 2001. Análisis del Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (ABCPE) de los tratamientos aplicados para el control de *P. infestans*

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Pr > F
Tratamiento	10	1482522.9	148252.29	5.60	0.0002
Error	25	661990.34	26479.61		
Total	35	2144513.24			
$R^2 = 0.69$		C. V. (%) = 41.09			

Experimento en invernadero 2001. Análisis de la producción de esporangios en los tratamientos aplicados para el control de *P. infestans*

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Pr > F
Tratamiento	10	68747166666	687416666	8.76	0.0001
Error	25	19627583333	785103333		
Total	35	88374750000			
$R^2 = 0.77$		C. V. (%) = 61.69			

Experimento en campo 2001. Análisis del Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (ABCPE) de los tratamientos aplicados para el control de *P. infestans*

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Pr > F
Tratamiento	14	16449923.52	1174994.53	21.32	0.0001
Error	45	2480428.38	55120.63		
Total	59	18930351.91			
$R^2 = 0.86$		C. V. (%) = 17.60			

Experimento en campo 2002. Análisis del Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (ABCPE) de los tratamientos aplicados para el control de *P. infestans*

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Pr > F
Tratamiento	15	9339616.65	622641.11	24.52	0.0001
Error	54	973872.55	18034.67		
Total	69	10313489.2			
$R^2 = 0.90$		C. V. (%) = 23.12			

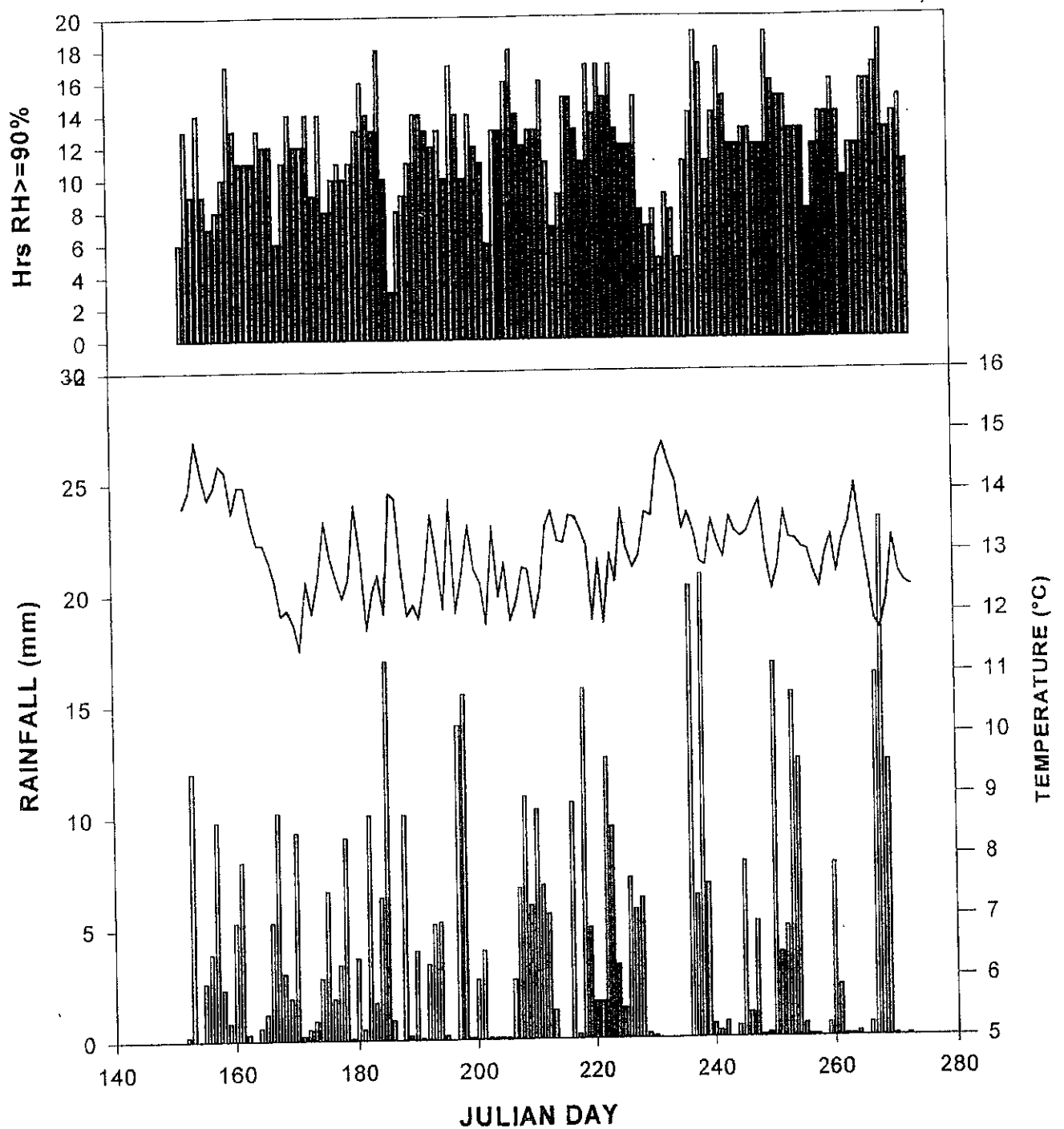
Experimento en maceta-campo 2002. Análisis del Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (ABCPE) de los tratamientos aplicados para el control de *P. infestans*

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Pr > F
Tratamiento	15	5967985.27	397865.68	82.26	0.0001
Error	54	261179.8	4836.66		
Total	69	6229165.07			
$R^2 = 0.95$		C. V. (%) = 15.10			

Experimento en maceta-campo 2002. Análisis de la producción de esporangios en los tratamientos aplicados para el control de *P. infestans*

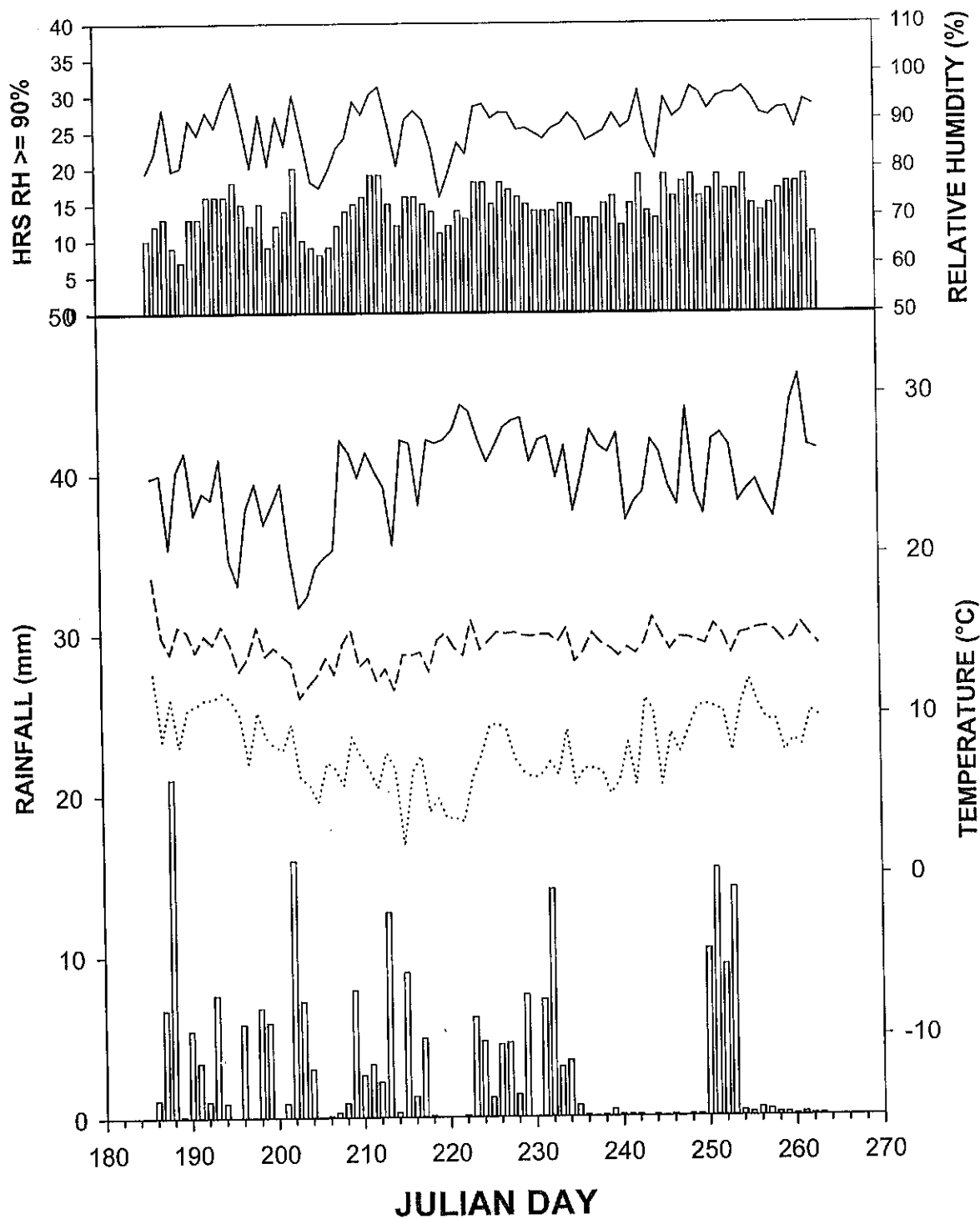
Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Pr > F
Tratamiento	10	1613714285.71	161371428.57	8.75	0.0001
Error	24	442857142.85	18452380.95		
Total	34	2056571428.57			
$R^2 = 0.78$		C. V. (%) = 65.36			

Anexo 6. Graficas de condiciones ambientales de Toluca, México 2001-2002



- Daily rainfall (mm), average daily temperature (°C), and number of hours during which relative humidity is above 90% (Hrs RH $\geq$ 90%) during the period of potato growing. Toluca, México, 2001.

Kindly provided by Gaspar Romero-Montes, CEEM staff.



Daily rainfall (mm), maximum, minimum and average daily temperature (°C), average daily relative humidity (%) and number of hours/day with relative humidity above 90% (Hrs RH $\geq$ 90%) during the potato growing cycle. Toluca, México, 2002.