

Efectividad *in vitro* de *Bacillus* y polifenoles de plantas nativas de México sobre *Rhizoctonia-Solani**

In vitro effectiveness of *Bacillus* and polyphenols of native plants from Mexico on *Rhizoctonia-Solani*

Francisco Castillo-Reyes¹, Francisco Daniel Hernández-Castillo^{2§}, Gabriel Gallegos-Morales², Alberto Flores-Olivas², Raúl Rodríguez-Herrera³ y Cristóbal N. Aguilar³

¹Campo Experimental Saltillo-INIFAP. Carretera Saltillo-Zacatecas, km 342+119, Núm. 9515, Buenavista, Saltillo, Coahuila. C. P. 25315. (reyes.francisco@inifap.gob.mx). ²Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro-Departamento de Parasitología. Buenavista, Saltillo, Coahuila. (fdanielhc@hotmail.com; ggalmor@uaaan.mx.; afloli@uaaan). Tel: 52 844 411 03 26, fax: +52 844 411 0226. ³Universidad Autónoma de Coahuila-Departamento de Investigación en alimentos, Facultad de Ciencias Químicas, 25000. Saltillo, Coahuila, México. [§]Autor para correspondencia: fdanielhc@hotmail.com.

Resumen

Con el objetivo de encontrar alternativas para el manejo de patógenos que provocan enfermedades en el sistema radical de las plantas se evaluó el efecto *in vitro* de bacterias antagonista del género *Bacillus* aisladas de la rizosfera y de extractos etanolicos de plantas de las especies *Larrea tridentata*, *Flourensia cernua*, *Opuntia ficus-indica*, *Agave lechuguilla* y *Yucca filifera* endémicas del desierto Chihuahuense contra el fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. Las bacterias se obtuvieron de la forma esporulada, una suspensión de suelo se calentó 15 min 80 °C para eliminar formas no esporuladas. Los extractos vegetales se obtuvieron por infusión. Como resultado se encontró que las cepas de *Bacillus* aislados presentan un efecto antagonista *in vitro* sobre la inhibición micelial de *Rhizoctonia solani* desde 40 a 67%. La caracterización por secuenciación del gen 16S del ADNr se determinó que los aislamientos pertenecen a las especies de *B. subtilis*, *B. pumilus* y a *B. atrophaeus*, quienes están reportadas con efecto antagónico sobre organismos fitopatógenos. Para el caso de los extractos se encontró un efecto en la inhibición micelial hasta 100% en su mayoría todos los extractos inhibieron el crecimiento del micelio de *R. solani* al 100% excepto el extracto de *Y. filifera* que solo tuvo 46% con la dosis más alta evaluada (3 000 ppm). Los extractos de *F. cernua* muestran que a 160 ppm de polifenoles totales se inhibe completamente a *R. solani*.

Abstract

In order to find alternatives for pathogen management causing diseases in the root system of plants, was evaluated the *in vitro* effect of antagonistic bacteria of the genus *Bacillus* isolated from rhizosphere and from ethanolic extracts of plants species *Larrea tridentata*, *Flourensia cernua*, *Opuntia ficus-indica*, *Agave lechuguilla* and *Yucca filifera*, that are endemic from the Chihuahua desert against plant pathogen *Rhizoctonia solani*. Bacteria were obtained as spore form; a soil suspension was heated for 15 min at 80 °C to remove non-sporulating forms. Plant extracts were obtained by infusion. As a result it was found that strains of *Bacillus* isolates have an *in vitro* antagonistic effect on mycelia inhibition of *Rhizoctonia solani* from 40 to 67%. The characterization 16S rDNA gene sequencing determined that the isolates belong to the species of *B. subtilis*, *B. pumilus* and *B. atrophaeus*, that are reported with antagonistic effect on plant pathogenic organisms. In the case of extracts, an effect on mycelial inhibition of up to 100% was found; most extracts inhibited micelial growth of *R. solani* at 100% except for *Y. filifera* extract that only obtained 46% with the highest dose evaluated (3 000 ppm). *F. cernua* extracts show that at 160 ppm of total polyphenols completely inhibited *R. solani*.

Keywords: *Rhizoctonia solani*, antagonism, bacteria, extracts, mycelial inhibition, plant extract, rhizosphere.

* Recibido: septiembre de 2014
Aceptado: enero de 2015

Palabras clave: *Rhizoctonia solani*, antagonismo, bacterias, extractos, extracto vegetal, inhibición micelial, rizosfera.

Introducción

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

Una alternativa para disminuir el efecto de *R. solani* en el cultivo, es la utilización de metabolitos secundarios de plantas (polifenoles) y microorganismos antagonistas, principalmente de la bacteria del género *Bacillus* considerada como uno de los agentes de control biológico más eficaces por sus propiedades en la inhibición de fitopatógenos (Sid *et al.*, 2003; Schisler *et al.*, 2004). En la microbiota del suelo existe una gran variedad de microorganismos, compuesta por una mezcla de actinomicetos, hongos, bacterias, protozoarios, etc., siendo mayor en la zona de la rizosfera al ser fisiológicamente más activa (Guetsky *et al.*, 2001). El efecto antagonista que presentan ciertos grupos de hongos y bacterias contra hongos fitopatógenos de suelo es una acción que puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos en vegetales.

De esta manera los microorganismos del suelo juegan un papel crítico en la interacción planta-suelo a nivel rizosfera, tanto los patógenos como los agentes de biocontrol (López *et al.*, 2007). En función a lo anterior, el objetivo de este estudio fue determinar el efecto antagonista *in vitro* de *Bacillus* sp. de la rizosfera y antifúngico de extractos aislados de plantas del semidesierto Chihuahuense sobre *Rhizoctonia solani* Kühn.

Materiales y métodos

Tejido vegetal. Plantas completas (hojas, tallos y raíces) de las especies *Larrea tridentata*, *Flourensia cernua*, *Opuntia ficus-indica*, *Agave lechuguilla* y *Yucca filifera*,

Introduction

One of the fungi that limit the production of potato in Mexico is *Rhizoctonia solani* Kühn, the disease is known as black scurf of potato, which can produce serious damage to yield and tubers quality (Hernández *et al.*, 2001). The main control of this pathogen is made through the application of agrochemicals; however, the use of these products has caused many problems to the environment, such as toxicity, in addition to resistance in certain pathogens (Hernández *et al.*, 2005).

An alternative to reduce the effect of *R. solani* in crops, is the use of secondary metabolites of plants (polyphenols) and antagonistic microorganisms, mainly bacteria of the genus *Bacillus*, considered as one of the most effective biocontrol agents, for their inhibiting properties on pathogens (Sid *et al.*, 2003; Schisler *et al.*, 2004). In soil microbiota there is a wide variety of microorganisms, consisting of a mixture of actinomycetes, fungi, bacteria, protozoa, etc., being higher in rhizosphere area for being physiologically more active (Guetsky *et al.*, 2001). The antagonistic effect that certain groups of fungi and bacteria present against phytopathogenic soil fungi is an action that can be exploited as biological control for plant pathogens.

Thus soil microorganisms play a critical role in plant-soil interaction at rhizosphere level, both pathogens and biocontrol agents (López *et al.*, 2007). According to the above, the aim of this study was to determine the *in vitro* antagonistic effect of *Bacillus* sp. from rhizosphere and antifungal extracts isolated of plants from the Chihuahua semi desert on *Rhizoctonia solani* Kühn.

Materials and methods

Plant tissue. Complete plants (leaves, stems and roots) of species *Larrea tridentata*, *Flourensia cernua*, *Opuntia ficus-indica*, *Agave lechuguilla* and *Yucca filifera*, were collected in the southern region of Coahuila (on km 27 from the Saltillo-Monclova highway). The samples were transported to the Laboratory of Microbiology from the Department of Food Research, at the Faculty of Chemical Sciences in the Autonomous University of Coahuila, in labeled plastic bags. Each plant tissue was dried at environmental temperature and in an oven (Labnet International, Inc.) for two days at

se recolectaron en la región sur de Coahuila (sobre el km 27 de la carretera Saltillo-Monclova). Las muestras obtenidas se transportaron al Laboratorio de Microbiología del Departamento de Investigación en Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila, en bolsas plásticas etiquetadas. Cada tejido vegetal se deshidrató al medio ambiente y en una estufa (Labnet Internacional, Inc) durante dos días a una temperatura de 60 °C; y se pulverizó en un molino (Thomas Wiley) con malla de 1mm. El pulverizado se almacenó en frascos color ámbar o botes de plástico secos a temperatura ambiente y en oscuridad.

Extracción de polifenoles (polifenoles). La extracción de polifenoles de las muestras colectadas se llevó a cabo en una relación de 1:4 (peso/volumen solvente) por el método de infusión. En un matraz Erlenmeyer de 1 litro cubierto con aluminio para evitar la oxidación de los polifenoles por efecto de la luz, se colocó 150 gramos de muestra vegetal y 600 mL del solvente en agitación constante en un sistema de reflujo a una temperatura de 60 °C por un tiempo de 7 h. Una vez terminado el reflujo se filtró el material utilizando papel Wattman de Núm. 4 sobre un embudo Buhner con la ayuda de bomba de vacío, recolectando el filtrado en un matraz Kitasato con capacidad de 2 litros. Los extractos etanolicos obtenidos se almacenaron a 4 °C.

Cuantificación de polifenoles totales. La cuantificación se determinó por espectrofotometría usando luz UV a través de las técnicas de Makkar (1999) para polifenoles hidrolizables equivalentes a ácido gálico y la de Swain y Hillis (1959) para polifenoles condensados equivalentes a catequina. De cada extracto se preparó una dilución 1:20 (extracto: agua). De cada dilución para polifenoles condensados se colocó 0.5 ml en un tubo ensaye, y agregó 3 ml de HCL/Butanol (1:9) y 0.1 ml de reactivo Férrico 0.1 N. Por otro lado se preparó catequina en agua destilada a las concentraciones de 0, 200, 400, 600, 800 y 1 000 ppm para determinar la curva de referencia.

Los tubos se taparon fuertemente y fueron calentados por 1 h en baño María a 90 °C, después de este tiempo se dejó enfriar y se leyó la absorbancia con UV/visible a 460 nm. Para polifenoles hidrolizables, se colocaron 400 µl de muestra diluida en un tubo de ensaye, enseguida se adiciono 400 µl del reactivo comercial Folin-Ciocalteu, se agito y dejó reposar por 5 min. Después se agregó 400 µl de NaCO₃ (0.01M), y 2.5 ml de agua destilada. Por otro lado se preparo ácido gálico en agua destilada a las concentraciones de 0, 200, 400, 600, 800, 1 000 ppm, mas cada reactivo anteriormente señalado y se leyó a 725 nm de UV/visible.

60 °C; and was pulverized in a mill (Thomas Wiley) 1mm mesh. The sample was stored in amber bottles or plastic cans, dried at room temperature in the dark.

Extraction of polyphenols (polyphenols). It was conducted in a relation 1: 4 (weight / volume solvent) by the infusion method. In a 1 liter Erlenmeyer flask covered with aluminum foil to prevent oxidation of polyphenols due to light, put 150 grams of plant sample and 600 mL of solvent, in constant agitation in a reflux system at a temperature of 60 °C for a period of 7 h. Once reflux is finished the material was filtered using Wattman paper no. 4 on a Buhner funnel with the aid of a vacuum pump, collecting the filtrate in a vacuum flask with a capacity of 2 liters. The ethanolic extracts were stored at 4 °C.

Quantification of total polyphenols. Quantification was determined through spectrophotometry using UV light through Makkar techniques (1999) for hydrolyzable polyphenols equivalent to gallic acid and to Swain and Hillis (1959) for condensed polyphenols equivalent to catechin. From each extract a 1:20 dilution (water:extract) was prepared. From each dilution for condensed polyphenols 0.5 ml were placed in an assay tube and then added 3 ml of HCl / butanol (1:9) and 0.1 ml of ferric reagent at 0.1 N. Furthermore catechin was prepared in distilled water at concentrations 0, 200, 400, 600, 800 and 1 000 ppm to determine reference curve.

The tubes were tightly capped and heated for 1 h in a water bath at 90 °C, after this time, allowed to cool and then absorbance was read with UV / visible at 460 nm. For hydrolysable polyphenols, 400 µl of diluted sample was placed in a test tube, and then 400 µl of commercial Folin-Ciocalteu reagent was added, stirred and allowed to stand for 5 min. Then 400 µl of NaCO₃ (0.01M), and 2.5 ml of distilled water was added. Furthermore gallic acid was prepared in distilled water at concentrations of 0, 200, 400, 600, 800 and 1 000 ppm, plus each reagent mentioned above and read at 725 nm UV/visible.

Obtaining antagonistic bacteria

Isolation of bacterial strains. A sampling was addressed to plant rhizosphere and 100 g of soil was collected. Sampled plants correspond to mesquite, nopal, maguey, gobernadora, lechuguilla and yuca. Each sample was recorded and moved to the Laboratory of Phytopathology from the Department of Agricultural Parasitology at the Universidad Autonoma

Obtención de bacterias antagonistas

Aislamiento de cepas bacterianas. Se realizó un muestreo dirigido a la zona de la rizosfera de plantas, se colectó 100 g de suelo. Las plantas muestreadas corresponden a mezquite, nopal, maguey, gobernadora, lechuguilla y yuca. Cada muestra se registró y se trasladó al Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología Agrícola en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). Las muestras se procesaron individualmente para lo que se pesó un gramo de suelo con raíces y se colocó en un tubo de ensayo que contenía 9 ml de agua destilada estéril. Todos los tubos se incubaron en baño maría a una temperatura de 80 °C por 15 min, después del tiempo transcurrido se dejaron enfriar y se procedió a la inoculación de cada una de las muestras en cajas petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA), colocando 100 µL de la solución de suelo-raíz que se dispersó en toda la caja con la ayuda de una varilla de vidrio; los medios de cultivo inoculados se incubaron a 25±1 °C.

Preselección de colonias de *Bacillus* sp., con efecto antagonista. Después de 12 h de incubación de los medios de cultivo, se colocó un explante de 0.5 cm con micelio de *R. solani* y se volvió a incubar a la misma temperatura por 48 h al término de este tiempo se seleccionaron las colonias de bacterias que mostraron un efecto en la inhibición del crecimiento micelial de *R. solani* y se sembraron en una nueva caja con PDA todas aquellas colonias bacterianas que presentaron un halo de inhibición, colocando cada colonia seleccionada en cada uno de los puntos cardinales de la caja petri y enseguida se colocó un disco con micelio del hongo y se incubó a la misma temperatura. Por último se purificaron las colonias que mostraron consistentemente el halo de inhibición a *R. solani* en medio King de B sembrando por estría sencilla y se verificó la pureza de la colonia bacteriana. Cada aislamiento bacteriano se identificó y conservó a 4 °C. Se realizaron tinciones de Gram y tinción de endospora, para verificar que la bacteria aislada fuera gram positiva y con presencia de endospora como corresponde a el género de *Bacillus*.

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

Extracción de ADN. Cada cepa a identificar se incrementó en medio líquido a base de papa-dextrosa y se incubó a 25±1 °C por 72 h. En seguida se trasladó a la cámara de transferencia laminar en donde se filtro para recuperar la biomasa fungosa

Agraria Antonio Narro (UAAAN). Samples were individually processed for which one gram of soil with roots was weighed and placed in a test tube containing 9 ml of sterile distilled water. All tubes were incubated in a water bath at 80 °C for 15 min, after the elapsed time, allowed to cool and proceeded to the inoculation of each of the samples in Petri dishes with a culture medium of potato-dextrose-agar (PDA), placing 100 µL of the root-soil solution which is dispersed throughout the case with the help of a glass rod; the inoculated culture media were incubated at 25 ± 1 °C.

Screening for *Bacillus* sp., colonies, with antagonistic effect. After 12 h of incubation of culture media, an explant of 0.5 cm with mycelium from *R. solani* was placed and re-incubated at the same temperature for 48 h; at the end of this time bacterial colonies showing an inhibition effect on mycelial growth of *R. solani* were selected and re plated in a new petry dish with PDA, all those bacterial colonies that showed an inhibition halo, placing each selected colony in each of the cardinal points of the petri dish and then placed a disc with fungal mycelium and incubated at the same temperature. Finally colonies that consistently showed an inhibition halo to *R. solani* were purified on King B medium by simple spreading and purity of bacterial colony was verified. Each bacterial isolate was identified and stored at 4 °C. Gram staining and endospore staining were made to verify that the isolated bacteria were gram positive and with presence of endospores as corresponds to the genus *Bacillus*.

Characterization of *Bacillus* spp., for 16's ribosomal sequencing.

DNA extraction. Each strain to be identified was increased in liquid medium potato-dextrose-based and incubated at 25 ± 1 °C for 72 h. Then moved to a laminar flow cabinet where it was filtered to recover fungal biomass and placed in sterile aluminum paper, identified with its respective code. Immediately thereafter, 400 µl of TE 1X buffer, 2.5 µl of SDS at 20% and 20 µl of proteinase K (20 mg / ml) was added, mixed by vortex and incubated for one hour at 37 ° C. Subsequently added 1/3 of the total volume of sodium acetate at 3.3 M and pH = 6.1, plus 0.1 volume of absolute ethanol, allowed to precipitate for 10 min at - 20 °C; then centrifuged at 12 000 rpm for 10 min and the supernatant was removed to a new sterile tube and added 0.5 ml phenol-chloroform-isoamyl alcohol, mixed and centrifuged at 12 000 rpm for 10 min; subsequently the supernatant was

y se colocó en papel aluminio estéril identificado con su respectiva clave. Inmediatamente después, se agregó 400 µl de buffer TE 1X, 2.5 µl de SDS al 20% y 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml), se mezcló por vortex y se incubó por una hora a 37 °C. Posteriormente se le agregó 1/3 del volumen total de acetato de sodio al 3.3 M y pH= 6.1 más 0.1 volumen de etanol absoluto, se dejó precipitar por 10 min a - 20 °C. Enseguida se centrifugó a 12 000 rpm durante 10 min y se separó el sobrenadante a un tubo nuevo estéril y adicionó 0.5 ml de Fenol-cloroformo- alcohol isoamílico, se mezcló y centrifugó a 12 000 rpm por 10 min. Posteriormente se recuperó el sobrenadante y agregó 0.5 ml de isopropanol, se centrifugó a 12 000 rpm por 5 min. Después se decantó y lavó la pastilla con etanol al 70%, se dejó secar a temperatura ambiente y se suspendió en agua miliQ, por último se verificó la integridad y calidad del ADN extraído en gel de agarosa al 1%, bajo electroforesis horizontal aplicando un voltaje de 65 volts por 30 min.

Reacción en cadena de la polimerasa: una vez obtenido el ADN de las cepas bacterianas, se procedió a amplificar la región ribosomal 16S. Se realizó una mezcla de amplificación en un volumen final de 50 µl, compuesto por 14.5 de agua destilada esteril, 2.5 µl de buffer PCR (10X), 1 µl de MgCl₂ (25mM), 0.5 µl de dntp's (10 mM), 2.0 µl de cada iniciador (16s FGPL 5'CCG GGT TTC CCC ATT CGG-3' y 16S FGPS 5'- GGA GAG TTA GAT CTT GGC TC-3), 0.5 µl de ADN Taq-polimerasa y 1 µl de ADN. Las reacciones de amplificación se efectuaron usando un termociclador (Thermo Electron Corporation P x 2 Thermal Cycler) bajo el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C por un min, 35 ciclos a 95 °C por 1, 54 °C por 1 y 72 °C por 1 min y una extensión final de 72 °C por 5 min. Las bandas amplificadas se observaron en un gel de agarosa al 1.5 %.

Secuenciación de productos de PCR: la secuenciación se efectuó en la unidad de síntesis y secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM (USSDNA), utilizando el método de Singer. Una vez obtenidos las secuencias, se analizaron en la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), usando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para secuencias altamente similares, comparando cada secuencia del gen 16S amplificado obtenidas de los aislamientos de la rizosfera (Cuadro 3), con las secuencias almacenadas en la base de datos. Cada una de las secuencias obtenidas se le depuró la parte inicial y final (20 y 5 nucleótidos) por razón de aumentar la sensibilidad del análisis.

recovered and added 0.5 ml of isopropanol, centrifuged at 12 000 rpm for 5 min; then decanted and washed the pellet with 70% ethanol, allowed to dry at room temperature and suspended in milliQ water, finally the integrity and quality of DNA extracted in agarose gel 1% was verified, under horizontal electrophoresis applying a voltage of 65 volts for 30 min.

Polymerase chain reaction: once the DNA of bacterial strains was obtained, proceeded to amplify the 16S ribosomal region. A mixture of amplification was made in a final volume of 50 µl, composed by 14.5 of sterile distilled water, 2.5 µl of PCR buffer (10X), 1 µl of MgCl₂ (25 mM), 0.5 µl of dntp's (10 mM), 2.0 ul of each primer (16s FGPL 5'CCG GGT TTC CCC ATT CGG-3' and 16S FGPS 5'- GGAGAGTTAGATCTTGGCTC-3), 0.5 µl of Taq DNA polymerase and 1 µl of DNA. The amplification reactions were conducted using a thermal cycler (Thermo Electron Corporation P x 2 Thermal Cycler) under the following program: initial denaturation at 95 °C for 1 min, 35 cycles at 95 °C for 1, 54 °C for 1 and 72 °C for 1 min and a final extension of 72 °C for 5 min. The amplified bands were observed on agarose gel 1.5%.

Sequencing of PCR products: sequencing was performed on the synthesis unit and DNA sequencing at the Institute of Biotechnology from UNAM (USSDNA) using the Singer method. Once obtained the sequences, were analyzed in the database of GenBank from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using BLAST tools (Basic Local alignment Search Tool) for highly similar sequences, comparing each sequence from amplified 16S gene obtained from rhizosphere isolates (Table 3), with the sequences stored in the database. Each of the obtained sequences was purged the start and end (20 and 5 nucleotides) part in order to increase the sensitivity of the analysis.

Determination of anti-fungal and antagonistic effect

Antagonistic effect of *Bacillus* sp. The antagonistic effect was determined by a paired confrontation technique between the antagonist and plant pathogen. In petri dishes with medium based on potato dextrose agar, a loop of each bacterial strain was placed in the four cardinal points of the petry dish, and then a disc with mycelium from *R. solani* was placed and incubated at 25 ± 1 °C, until control without bacteria filled the petri dish. Four replicates per treatment were performed. The variable to be measured

Determinación del efecto anti fúngico y antagonista

Efecto antagónico de *Bacillus* sp. El efecto antagonista se determinó por medio de la técnica de confrontación dual entre el antagonista y el fitopatógeno. En cajas petri con medio a base de papa-dextrosa-agar, se colocó una asada de cada cepa bacteriana en los cuatro puntos cardinales de la caja, enseguida se colocó un disco con micelio de *R. solani* y se incubó a 25 ± 1 °C, hasta que el testigo sin bacteria llenara la caja petri. Se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento. La variable medida fue el crecimiento radial del hongo confrontado con cada cepa bacteriana, el cual se transformó a por ciento de inhibición. Las diferencias en inhibición se determinaron por la prueba de medias de Tukey.

Efecto anti fúngico de los extractos polifenólicos. La evaluación de los diferentes extractos se utilizó la técnica del medio envenenado. Para ello se determinó y cuantificó el volumen de cada extracto de acuerdo a la cantidad de polifenoles totales (polifenoles condensados + polifenoles hidrolizables) presente en cada extracto y se agregó a un matraz con el volumen de agua y PDA exacto a la concentración deseada (Cuadro 1). Discos con micelio fúngico (0.4 cm) se colocaron en el centro de la caja petri quien contenía medio de cultivo PDA envenenado por extracto a diferentes concentraciones. Las cajas inoculadas se incubaron a 25 ± 2 °C, la eficacia de los tratamientos se evaluó midiendo el crecimiento radial del hongo cuando el testigo cubrió totalmente la caja.

El valor de crecimiento (cm) se transformó a porcentaje de inhibición (P) usando como referencia al tratamiento control (sin extracto) bajo la siguiente expresión matemática: $p = (C-T)/C \times 100$, donde, C es el diámetro de la colonia sin tratamiento y T es la colonia bajo tratamiento con extracto. El experimento fue establecido bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Se realizó un análisis Probit para determinar la concentración inhibitoria al 50% de cada extracto. Los datos se analizaron usando software SAS V8.1.

Resultados y discusión

Efecto de bacterias antagonistas

Distribución de cepas bacterianas en la rizosfera de plantas del semidesierto. De un total de 80 colonias aisladas se seleccionaron 14 cepas con efecto en la inhibición del

was radial growth of the fungus confronted with each bacterial strain, which was transformed to inhibition percentage. Differences in inhibition were determined by Tukey test.

Anti-fungal effect of polyphenolic extracts. To evaluate the different extracts, the poisoned medium technique was used. For this was determined and quantified the volume of each extract according to the amount of total polyphenols (condensed polyphenols + hydrolyzable polyphenols) present in each extract and added to a flask with water volume and accurate PDA to the desired concentration (Table 1). Fungal mycelium disks (0.4 cm) were placed in the center of the petri dish containing PDA culture medium poisoned by extracts at different concentrations. The inoculated dishes were incubated at 25 ± 2 °C, treatment effectiveness was evaluated by measuring radial growth of the fungus when the control completely covered the petry dish.

Growth value (cm) was converted to inhibition percentage (P) using as reference the control treatment (without extract) under the following mathematical expression: $P = (C-T) / C \times 100$ where C is the diameter of the colony without treatment and T is the colony under treatment with extract. The experiment was established under a completely randomized design with four replications. A probit analysis was performed to determine the inhibitory concentration at 50% of each extract. Data were analyzed using SAS V8.1 software.

Results and discussion

Effect of antagonistic bacteria

Distribution of bacterial strains in rhizosphere from semi-desert plants. From a total of 80 isolated colonies, 14 strains with inhibition effect on mycelium growth of *R. solani* (Table 1) were selected. In the morphological characterization, all strains had bacillus shape, Gram positive and endospore formation in the central part.

Inhibition effect of *Bacillus* sp., on mycelial growth of *R. solani*. The analysis of variance detected significant differences ($p = 0.05$) in the development of mycelium by effect of bacterial strains (Table 2). The greatest effect was

crecimiento del micelio de *R. solani* (Cuadro 1). En la caracterización morfológica, todas las cepas presentaron forma de bacilo, tinción de Gram positiva y formación de endospora en la parte central.

67% and the lowest 40%, on the inhibition of *R. solani*. These results contrast with those obtained by Hernández *et al.* (2008), who found a maximum effect on the inhibition of *R. solani* of 40.4% with strains of *Bacillus* spp. isolated

Cuadro 1. Diversidad de cepas en plantas del semidesierto con efecto antagonista sobre *Rhizoctonia solani*.
Table 1. Strains diversity in semi-desert plants with antagonistic effect on *Rhizoctonia solani*

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

Efecto de *Bacillus* sp en la inhibición del crecimiento del micelio de *R. solani*. El análisis de varianza detectó diferencias significativas ($p= 0.05$) en el desarrollo del micelio por efecto de las cepas bacterianas (Cuadro 2). El mayor efecto se observó con 67% y el menor con 40% sobre la inhibición de *R. solani*. Estos resultados contrastan con los obtenidos con Hernández *et al.* (2008), quienes encontraron un efecto máximo en la inhibición de *R. solani* de 40.4% con cepas de *Bacillus* spp, aisladas de la rizosfera de plantas de los cultivos de papa y chile. Así mismo son similares con los de Mojica-Marin *et al.* (2009), quienes encontraron un rango de inhibición de 34.4 a 66.6 por ciento en la inhibición micelial de *R. solani* por *B. thuringiensis*. En relación a el comportamiento del fitopatógeno, parece ser que las cepas de *Bacillus* aislados de la rizosfera de especies de plantas diferentes al cultivo son más eficaces para inhibir a *R. solani in vitro*.

La prueba de cultivo duales es extensamente usada como una de las pruebas preliminares *in vitro* para seleccionar agentes de control biológico (Hoyos *et al.*, 2008; Calvo-Araya *et al.*, 2012). En el presente estudio, este método mostro que las 14 cepas de bacterias evaluadas presentaron diferentes capacidades para inhibir a *R. solani*, por ejemplo la cepa 53F6 produjo la mayor inhibición de crecimiento (67.2%) de *R. solani*, mientras que la cepa 5.1 inhibió 40%. Esta ampliamente documentado que cepas de una misma especie, pueden exhibir diferentes capacidades para producir toxinas e inhibir el crecimiento de diferentes microorganismos (Choi *et al.*, 1999). La antibiosis es generalmente el modo de antagonismo observado en *Bacillus* spp.

Generalmente producen clases de antibióticos como bacilomicina, fungimicina, micosubtilina y zwittermicina, compuestos que han demostrado ser efectivos en suprimir

from the rhizosphere of potatoes and chili plants. Still similar to those from Mojica-Marin *et al.* (2009), who found a range of inhibition from 34.4 to 66.6 % on mycelial inhibition of *R. solani* by *B. thuringiensis*. Behavior in relation to plant pathogen, it appears that *Bacillus* strains isolated from rhizosphere of different crops species are more effective in inhibiting *in vitro* *R. solani*.

The dual culture test is widely used as a preliminary *in vitro* test to select biological control agents (Hoyos *et al.*, 2008; Calvo-Araya *et al.*, 2012). In the present study, this method showed that 14 bacteria strains tested had different abilities to inhibit *R. solani*, e.g. strain 53F6 produced the greatest inhibition of growth (67.2%) on *R. solani*, while strain 5.1 inhibited 40%. Is widely documented that strains of the same species may exhibit different abilities to produce toxins and inhibit the growth of various microorganisms (Choi *et al.*, 1999). Antibiosis is the overall antagonism mode observed in *Bacillus* spp.

Generally produce different types of antibiotics like bacillomycin, fungimicina, mycosubtilin and zwittermicin, compounds that have proven to be effective in suppressing *in vitro* or *in situ* growth of pathogens (Pal and Gardener, 2006; Cazorla and rosemary, 2007). Besides it can attack by nutrient competition, exclusion and infection sites, parasitism and resistance induction (Strobel and Rodríguez, 2005; Chatterjee *et al.*, 2007; Carreras *et al.*, 2008), reducing harmful effects of pathogens. This inhibitory effect of *Bacillus* species on fungi that cause plant disease can be associated with the production of enzymes acting in the degradation of cell wall as chitinases (Aktuganov *et al.*, 2007; Rhodes *et al.*, 2009). Also, Basha and Ulaganathan (2002) reported the

el crecimiento de patógenos *in vitro* o *in situ* (Pal y Gardener, 2006; Cazorla y romero, 2007). Además pueden atacar por competencia por nutrientes, sitios de exclusión e infección, parasitismo y inducción de resistencia (Strobel y Rodríguez, 2005; Chatterjee *et al.*, 2007; Carreras *et al.*, 2008), disminuyendo el efecto dañino de los fitopatógenos. Este efecto inhibitorio de las especies de *Bacillus* sobre hongos que causan enfermedades en las plantas puede estar asociado a la producción de enzimas que actúan en la degradación de la pared celular como las quitinasas (Aktuganov *et al.*, 2007; Rodas *et al.*, 2009). Asimismo, Basha y Ulaganathan (2002) reportan el mismo efecto al encontrar que *Bacillus* sp. produjo en *Curvularia lunata*, la presencia anormal de hifas, condensación, deformación y ocurrencia de malformaciones extensivas y daños al micelio.

Emmert y Handelsman, (1999) reportan que la especie *Bacillus cereus* modificó la composición iónica del medio de cultivo en el que fue cultivado, aumentó el pH, secuestro calcio y la secreción de amonio, concluyendo que esta combinación es altamente tóxica a las zoosporas de Oomycetes patógenos, causando un rápido ensanchamiento y expulsión de la vacuola, seguido de lisis de las zoosporas.

same effect, finding that *Bacillus* sp. produced abnormal presence of hyphae, condensation, deformation and occurrence of extensive malformation and damage to mycelia on *Curvularia lunata*.

Emmert and Handelsman (1999) report that *Bacillus cereus* species alter the ionic composition of the medium in which were grown, increasing pH, kidnapping calcium and secretion of ammonia, concluding that this combination is highly toxic to zoospores form Oomycetes pathogens, causing rapid widening and expulsion of vacuole, followed by lysis of zoospores

Characterization of *Bacillus* spp., for 16S ribosomal sequencing. 16S ribosomal gene is frequently used for phylogenetic studies because it is a highly conserved sequence among different species of bacteria; The gene is located in the small ribosomal subunit (30S), coupled to this, the 16S ribosomal gene is a hyper variable region which foretell species specificity, which is useful for the identification of bacterial species. The amplified region by FGPS and FGPL primers from 7 strains under study was approximately 350 bp.

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

Table 2. Effect of antagonistic strains of *Bacillus* sp., isolated from the rhizosphere of plants from the Chihuahuan semi desert on mycelial inhibition of *Rhizoctonia solani*.

Origen	Aislamiento	Mean	Std dev	Grupo
Gobernadora	5.3F	67.27	3.98	A
Gobernadora	5.1F	63.65	2.05	AB
Nopal	6.1F	62.95	2.47	AB
Mezquite	1.2F	61.75	2.11	ABC
Gobernadora	1.1	61.25	2.34	ABCD
Gobernadora	1.3	59.44	1.66	ABCDE
Gobernadora	1.4	58.33	2.9	ABCDE F
Lechuguilla	4.3	57.15	3.85	ABCDE F
Maguey	B2.1	57.03	7.63	BCDE F
Gobernadora	5.4F	56.83	5.41	BCDE F
Lechuguilla	4.4	51.8	1.59	CDE F
Lechuguilla	4.2	51.31	4.32	DE FG
Comercial	BCC1	49.4	0.60	E FGH
Lechuguilla	4.1	48.19	2.27	FGH
Yuca	5.4	41.56	1.05	GH
Yuca	5.1	40.76	5.26	H
Fito patógeno	<i>R. solani</i>	0	0	I

Caracterización de *Bacillus* spp., por secuenciación de genes 16S ribosomales. El gen ribosomal 16S es frecuentemente empleado para estudios filogenéticos debido a que es una secuencia altamente conservada entre las diferentes especies de bacterias; el gen se encuentra ubicado en la subunidad pequeña del ribosoma (30S), aunado a esto, el gen ribosomal 16S es una región hiper variable lo que prevé especificidad de especie, lo que resulta muy útil para la identificación de especies bacterianas. La región amplificada por los iniciadores FGPS y FGPL de siete cepas en estudio fue de 350 bp aproximadamente.

En el Cuadro 3 se enlistan las especies identificadas de bacterias aisladas de la rizosfera de plantas del desierto con efecto antagónico sobre la especie del fitopatógeno *R. solani*, pertenecientes al género *Bacillus* mediante la amplificación del gen 16S ribosomal. Cada especie bacteriana (cepa) confirma su identidad en su mayoría en 100% con las secuencias contenidas en el Genbank, con coberturas que van desde 99-100% de la secuencia total con la que se comparó. El género *Bacillus* es un grupo heterogéneo y puede ser re-clasificado en varios grupos en base a características bioquímicas, metabólicas, y en homología fenotípica y genotípica de secuencias de ADNr 16S.

Table 3 shows the species of bacteria isolated from the rhizosphere of desert plants with antagonistic effect on plant pathogen *R. solani*, belonging to the genus *Bacillus* by 16S ribosomal gene amplification. Each bacterial species (strain) confirms their identity in its majority in 100% with sequences contained in the Genbank, with coverage ranging from 99-100% of the total sequence, with which it was compared. The genus *Bacillus* is a heterogeneous group and may be re-classified into several groups based on biochemical, metabolic, and phenotypic and genotypic homology characteristics from 16S rDNA sequences.

According to specific classification by *B. pumilus* DNA analysis is reported as a bio fungicide with effect in a variety of pathogens, in preventive and curative applications, especially in leaf spots, blights, downy mildew, powdery mildew, *Rhizoctonia* and *Fusarium* (EPA, 2011; Anith *et al.*, 2004; Schisler *et al.*, 2004). *B. atrophaeus* is reported as a control agent on *Erwinia amylovora* with an antagonism index of 0.53 (Pusey *et al.*, 2009).

B. subtilis is the most studied microorganism and reported as growth promoter and antagonistic to a variety of pathogens such as *Phytophthora cactorum*, *Sclerotium cepivorum*,

Cuadro 3. Especies bacterianas identificadas por comparación con secuencias contenidas en GenBank.

Table 3. Bacterial species identified by comparison with sequences contained in GenBank.

Clave	Organismo	Descripción			
		Score total	Cobertura (%)	Valor E	Identidad (%)
B201	<i>Bacillus subtilis</i>	564	100	1.00E-157	100
1302	<i>Bacillus atrophaeus</i>	564	100	1.00E-157	100
1403	<i>Bacillus pumilus</i>	564	100	1.00E-157	100
4304	<i>Bacillus subtilis</i>	556	100	2.00E-155	99
51F5	<i>Bacillus subtilis</i>	556	99	2.00E-155	99
53F6	<i>Bacillus subtilis</i>	564	100	1.00E-157	100
61F7	<i>Bacillus subtilis</i>	562	99	5.00E-157	100

De acuerdo a la clasificación específica por análisis de ADN *B. pumilus* está reportado como un biofungicida con efecto en una variedad de fitopatógenos, en aplicaciones preventivas y curativas especialmente en manchas foliares, tizones, mildiú, oídio, *Rhizoctonia* y *Fusarium* (EPA, 2011; Anith *et al.*, 2004; Schisler *et al.*, 2004). *B. atrophaeus* está reportado como agente de control sobre *Erwinia amylovora* con un índice de antagonismo de 0.53 (Pusey *et al.*, 2009).

Fusarium oxysporum, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria carthami*, *Phytophthora capsici*, *Fusarium solani*, among others, in different crops and evaluated *in vitro*, in greenhouse and field (Chowdhury, 1997; Yuen *et al.*, 1985; Guillen *et al.*, 2006; Suarez *et al.*, 2011). The expression of these results indicate that it is possible to consider that the strains studied in this paper can be used as an alternative in biological control of *R. solani* with fungicide resistance by individual application or a mixture of strains to streamline their control.

B. subtilis es de los microorganismos más estudiados y reportado como promotor de crecimiento y antagonico a una gran variedad de fitopatógenos como *Phytophthora cactorum*, *Sclerotium cepivorum*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria carthami*, *Phytophthora capsici*, *Fusarium solani*, entre otros, en distintos cultivos y evaluados *in vitro*, en invernadero y campo (Chowdhury, 1997; Yuen *et al.*, 1985; Guillen *et al.*, 2006; Suárez *et al.*, 2011). La expresión de estos resultados indican que es posible considerar que las cepas estudiadas en este ensayo pueden ser utilizados como una alternativa en el control biológico de *R. solani* con resistencia a fungicidas, mediante la aplicación individual o en mezcla de cepas para eficientar su control.

Efecto de polifenoles

Efecto del solvente en la extracción de polifenoles. La cantidad total de polifenoles obtenida con el solvente empleado entre especies vegetales fue altamente variable (Cuadro 4). La especie con mayor contenido de polifenoles totales fue la *Y. filifera*, seguida de la *Larrea tridentata* con 5.27×10^4 ppm y 1.76×10^4 ppm, la especie menos productiva es *Opuntia ficus-indica* y *Agave lechuguilla* con 2.14×10^3 ppm y 2.84×10^3 ppm respectivamente. Cabe mencionar, que ya se han evaluado extractos etanolicos tanto de *L. tridentata* y *F. cernua* (Jasso de Rodríguez *et al.*, 2006) pero en forma de resina, y no se cuenta con una unidad de medida de referencia, que en nuestro caso es el equivalente a ppm de polifenoles totales equivalentes de ácido gálico y catequina.

Cuadro 4. Concentración de polifenoles totales, presentes en cada extracto vegetal en ppm obtenidos con etanol, equivalente a ácido gálico (TH) y catequina (TC).

Table 4. Concentration of total polyphenols present in each plant extract in ppm obtained with ethanol, equivalents of gallic acid (TH) and catechin (TC).

Extracto etanolico	Polifenoles (ppm)		
	Hidrolizables	Condensados	Totales
<i>Larrea tridentata</i>	1.57×10^4	1.94×10^3	1.76×10^4
<i>Flourensia cernua</i>	1.15×10^3	2.68×10^3	3.83×10^3
<i>Opuntia ficus-indica</i>	1.35×10^2	2.00×10^3	2.14×10^3
<i>Agave lechuguilla</i>	4.03×10^2	2.44×10^3	2.84×10^3
<i>Yucca filifera</i>	3.11×10^4	2.17×10^4	5.28×10^4

Efecto de los poli fenoles en la inhibición micelial. El efecto de los diferentes extractos etanolicos sobre *R. solani* fue altamente significativo ($p= 0.05$) a las 72 h. En la Figura 1 se observa que conforme se aumenta la concentración de polifenoles totales, se reduce significativamente el

Effect of polyphenols

Effect of solvent in the extraction of polyphenols. The total amount of polyphenols obtained with solvent used between plant species was highly variable (Table 4). The species with highest content of total polyphenols was *Y. filifera*, followed by *Larrea tridentata* with 5.27×10^4 ppm and 1.76×10^4 ppm respectively; the less productive species was *Opuntia ficus-indica* and *Agave lechuguilla* with 2.14×10^3 ppm and 2.84×10^3 ppm respectively. It is noteworthy that ethanolic extracts have already been assessed, both in *L. tridentata* and *F. cernua* (Jasso de Rodríguez *et al.*, 2006) but in resin form, and does not count with a measurement unit of reference; in our case is equivalent to ppm of total polyphenols equivalents of gallic acid and catechin.

Effect of polyphenols in mycelial inhibition. The effect of different ethanol extracts on *R. solani* was highly significant ($p= 0.05$) at 72 h. Figure 1 shows that as concentration of total polyphenols increases, mycelium growth from *R. solani* significantly decreases. The extracts of the species under study showed a high effect on fungal growth by inhibiting mycelium growth, the majority of extracts inhibited mycelium growth of *R. solani* at 100% except for *Y. filifera* that only had 46% with the highest dose tested (3 000 ppm). The inhibitory effects with *L. tridentata* were 93.13% in the highest dose tested (1 000 ppm) (Figure 1a).

These results contrast with those obtained by Almanza (2004), finding an inhibition of 59.60% at a concentration of 10% extract at 96 h of growth, and with those reported by Gamboa-Alvarado *et al.* (2003b), with water-soluble methanol extracts from gobernadora obtained from Sonoran

crecimiento micelial de *R. solani*, Los extractos de las especies en estudio mostraron un alto efecto en el desarrollo del hongo al inhibir el crecimiento del micelio, en su mayoría todos los extractos inhibieron el crecimiento del micelio de *R. solani* al 100% excepto el extracto de *Y. filifera* que solo tuvo 46% con la dosis más alta evaluada (3 000 ppm). Los efectos de inhibición con *L. tridentata* se observaron en 93.13% a la mayor dosis evaluada (1 000 ppm) (Figura 1a).

Estos resultados contrastan con los obtenidos por Almanza (2004), al encontrar una inhibición del 59.60%, a una concentración de 10% de extracto a las 96 h de crecimiento, y con los reportados por Gamboa-Alvarado *et al.* (2003b), con extractos metanólicos hidrosolubles de gobernadora obtenida de los desiertos Sonorense (DS) y Chihuahuense (DCh); a 500 ppm el extracto obtenido de DS inhibió a *R. solani* por 53.86%, mientras que el extracto obtenido de DCh redujo el crecimiento del mismo hongo por 35.52%; y a 1 000 ppm, el extracto obtenido de DS inhibió a *R. solani* por 75.73%, el extracto obtenido de ChD lo afectó 51.81%.

Asimismo, estos resultados presentan un efecto similar y superiores a los obtenidos con otros solventes que pudieran ser aptos para su uso en un sistema de producción orgánica al encontrarse en promedio de inhibición 94.7 con lanolina, 69% con manteca de cacao y con menor efecto la extracción en agua con 35.4% de inhibición del crecimiento del hongo. La mayor inhibición observada con gobernadora en agua fue de 72,76% a una concentración de 8 000 ppm (Castillo *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos *F. cernua* en etanol (Figura 1b) muestran que a 160 ppm de polifenoles totales se inhibe completamente a *R. solani*. Estos resultados difieren con los obtenidos por Jasso de Rodríguez *et al.* (2007) quienes muestran que los extractos etanólicos de *Flourensia* spp., a 1 000 $\mu\text{l l}^{-1}$ inhiben 100% el crecimiento del hongo. Asimismo, nuestros resultados son mejores a los reportados por Gamboa-Alvarado *et al.* (2003a), dado que dichos autores encontraron una inhibición de 84.7 % a las 96 h usando extractos metanólicos a una concentración de 20 000 ppm. Lo anterior hace suponer que el etanol tiene un mejor efecto para extraer los fitoquímicos que inhiben el crecimiento de *R. solani*. Los efectos obtenidos con *O. ficus-indica* sobre la inhibición total de *R. solani* se alcanzaron a la concentración de 200 ppm (Figura 1c).

No se cuenta con mucha información del uso de extractos de esta especie. Castillo *et al.* (2010) reporta un pobre efecto en la inhibición micelial con extractos obtenidos con los

(DS) and Chihuahuan (DCh) deserts; at 500 ppm of the extract obtained from DS inhibited *R. solani* in 53.86%, while the extract obtained from DCh reduced growth of the same fungus in 35.52%; and at 1000 ppm, of the extract obtained from DS inhibited *R. solani* by 75.73% and the extract obtained from DCh by 51.81%.

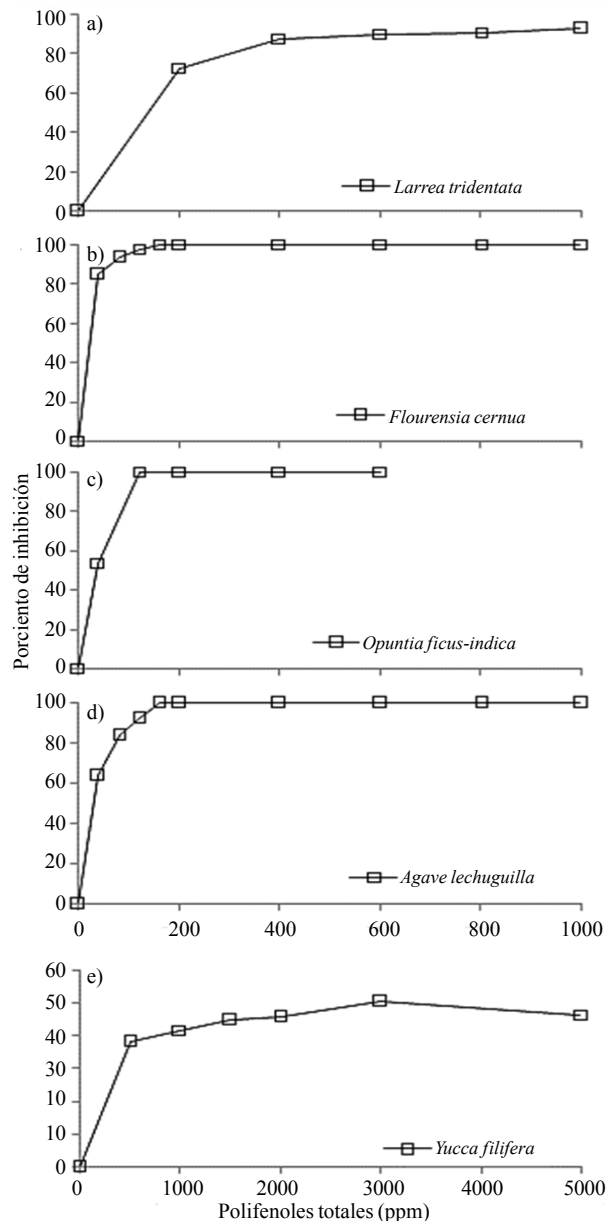


Figura 1. Efecto en la inhibición micelial de *Rhizoctonia solani* con extractos de *Larrea tridentata* (a), *Flourensia cernua*; (b) *Opuntia ficus-indica*; (c) *Agave lechuguilla*; (d); y *Yucca filifera* (e).

Figure 1. Effect of mycelium inhibition of *Rhizoctonia solani* with *Larrea tridentata* (a), *Flourensia cernua*; (b) *Opuntia ficus-indica*; (c) *Agave lechuguilla*; (d); and *Yucca filifera* (e).

solventes agua, manteca de cacao y lanolina con 20.79, 16.8, 11.7% en promedio, respectivamente. *A. lechuguilla* mostró un efecto de 100% sobre la inhibición del micelio de *R. solani* a 200 ppm de polifenoles totales (Figura 1d). Estos resultados difieren de los obtenidos por Almanza (2004), quien obtuvo una inhibición de 75.76% de *R. solani* al trabajar con extracto de *A. lechuguilla* utilizando como solvente agua a una concentración de 10%, y de los reportados por Castillo *et al.* (2010) con 31.8 y 10.7% en promedio con lanolina y manteca de cacao y ningún efecto con extractos en agua sobre la inhibición micelial del hongo respectivamente.

Y. filifera tuvo poco efecto en la inhibición del crecimiento micelial de *R. solani* (Figura 1e) ya que los valores no superaron 50% de inhibición a una concentración máxima de 3 000 ppm. No se encontró información de su uso al respecto, sin embargo Castillo *et al.* (2010) reporta también bajo efecto de extractos de Yuca obtenidos con los solventes agua, lanolina y manteca de cacao que mostraron 26.5, 32.3 y 28.6% de inhibición, respectivamente.

Concentraciones inhibitorias al 50% (CI₅₀) en *R. solani* con Polifenoles totales en ppm. De acuerdo al análisis Probit realizado, la CI₅₀ de los extractos evaluados fue muy variable. La CI₅₀ más baja se obtuvo con *F. cernua* a 16.3 ppm y la más alta con *Y. filifera* a 54.46 x 10² ppm (Cuadro 5). Las CI₅₀ en Polifenoles totales (ppm) obtenidas con extractos etanolicos difieren y son menores de las obtenidas con agua, manteca de cacao y lanolina (Castillo *et al.*, 2010; Hernández *et al.*, 2010).

These results also show similar and higher effects than those obtained with other solvents that may be suitable for use in organic production system by being on inhibition average, lanolin with 94.7%, with cocoa butter 69% and with lesser effect, water extraction with 35.4% inhibition of fungal growth. The extract with higher inhibition was gobernadora in water with 72.76% at a concentration of 8 000 ppm (Castillo *et al.*, 2010).

The results obtained with *F. Cernua* in ethanol (Figure 1b) shows that 160 ppm of total polyphenols, completely inhibited *R. solani*. These results differ from those obtained by Jasso de Rodríguez *et al.* (2007) who show that ethanol extracts of *Flourensia* spp., at 1 000 µl l⁻¹ inhibit fungal growth by 100%. Furthermore, our results are better than those reported by Gamboa-Alvarado *et al.* (2003a), since these authors found an inhibition of 84.7% at 96 h using methanol extracts at a concentration of 20 000 ppm. This suggests that ethanol has a better effect to extract phytochemicals that inhibit the growth of *R. solani*. The effects obtained with *O. ficus-indica* on total inhibition of *R. solani* were achieved at a concentration of 200 ppm (Figure 1c).

There is not much information on the use of extracts from this species. Castillo *et al.* (2010) reports a poor effect on mycelium inhibition with extracts obtained with water, cocoa butter and lanolin solvents with 20.79, 16.8 and 11.7% on average, respectively. *A. lechuguilla* showed an effect of 100% on mycelium inhibition of *R. solani* at 200 ppm of total polyphenols (Figure 1d). These results differ from those obtained by Almanza (2004), who obtained an inhibition of 75.76% of *R. solani* when working with extracts from

Cuadro 5. Valores CI₅₀ sobre la inhibición del crecimiento micelial de *R. solani*, con diferentes extractos vegetales obtenidos con el solvente etanol.

Table 5. IC₅₀ values on mycelial growth inhibition of *R. solani*, with different plant extracts obtained with ethanol.

Extracto	CI ₅₀ (ppm)	Límites fiduciales 95%		CI ₉₀ (ppm)
		Inferior	Superior	
<i>Larrea tridentata</i>	58.4	31.8	86.4	631.9
<i>Flourensia cernua</i>	16.3	11.8	20.5	54.7
<i>Agave lechuguilla</i>	32.5	22.9	40.4	88.6
<i>Yucca filifera</i>	5446	3098	33338	364865250
<i>Opuntia ficus-indica</i>	39.4	*	*	48.2

*= valores no determinados.

Conclusiones

Los aislamientos de *Bacillus* obtenidos de la rizosfera de plantas del desierto chihuahuense presentan un efecto antagonista sobre el hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. Las especie más común encontrada es *Bacillus subtilis*, y en menor presencia las especies *B. pumilus* y *B. atrophaeus*. *Rhizoctonia solani* fue altamente sensible a los extractos evaluados, que mostraron actividad fungicida a bajas concentraciones. Los extractos mas significativos para el control *in vitro* de *R. solani* fue *Opuntia ficus-indica*, *Flourensia cernua* y *Agave lechuguilla*.

Literatura citada

- Aktuganov, G. E.; Galimzyanova, N. F.; Melentev, A. I. and Kuzmina, L. Y. 2007. Extracellular hydrolases of strain *Bacillus* sp. 739 and their involvement in lysis of micromycetes cell walls. *Mikrobiologiya*. 76(4):413-420.
- Almanza, P. F. J. 2004. Efecto inhibitorio de extractos vegetales acuosos sobre *Rhizoctonia solani* creciendo "*in vitro*" y sobre la germinación y desarrollo en plantas de frijol. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). 76p/27 cm.
- Anith, K. N.; Momol, M. T.; Kloepper, J. W.; Marois, J. J.; Olson, S. M. and Jones, J. B. 2004. Efficacy of plant growth-promoting rhizobacteria, acibenzolar-*S*-methyl, and soil amendment for integrated management of bacterial wilt on tomato. *Plant Dis*. 88:669-673.
- Basha, S. and Ulaganathan, K. 2002. Antagonism of *Bacillus* species (strain BC121) towards *Curvularia lunata*. *Current Sci*. 82:1457-1463.
- Calvo-Araya, J. A.; Rivera-Coto, G.; Orozco-Cayasso, S. y Orozco-Rodríguez, R. 2012. Aislamiento y evaluación *in vitro* de la antagonistas de *Botrytis cinerea* en mora. *Agron. Mesoam*. 23(2):225-231.
- Carreras, B.; Fernández-Larrea, O.; Rodríguez, D.; Piedra, F.; Escobar, M. y López, O. 2008. Aislamiento y caracterización de cepas autóctonas de *Bacillus thuringiensis* berliner con potencialidades para el control de plagas. *Fitosanidad*. 12(3):187.
- Castillo, F.; Hernández, D.; Gallegos, G.; Méndez, M.; Rodríguez, R.; Reyes, A. and Aguilar, C. N. 2010. *In vitro* antifungal activity of plant extracts obtained with alternative organic solvents against *Rhizoctonia solani* Kühn. *Industrial Crops and Products*. 32:324-328.
- Cazorla, F y Romero, D. 2007. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. *J. Appl. Microbial*. 103(5):1950-1959.
- Chatterjee, S. N.; Bhattacharya, T.; Danger, T. K. and Chandra, G. 2007. Ecology and diversity of *Bacillus thuringiensis* in soil environment. *Afr. J. Biotechnol*. 6(13):1587-1591.
- A. lechuguilla* using as solvent water at a concentration of 10%, and from those reported by Castillo *et al.* (2010) with 31.8 and 10.7% on average with lanolin and cocoa butter and no effect with water extracts on mycelium inhibition respectively.
- Y. filiferera* had little effect on mycelium inhibition of *R. solani* (Figure 1e) since the values did not exceed 50% inhibition at a maximum concentration of 3 000 ppm. No information was found about its use; however Castillo *et al.* (2010) also reported low effect of *Yucca* extracts obtained with water, lanolin and cocoa butter showing inhibitions of 26.5, 32.3 and 28.6% respectively.
- Inhibitory concentration 50% (IC₅₀) on *R. solani* with total polyphenols in ppm. According to Probit analysis, IC₅₀ from tested extracts was very variable. The lowest IC₅₀ was obtained with *F. cernua* at 16.3 ppm and the highest with *Y. filiferera* at 54.46 x 10² ppm (Table 5). IC₅₀ total polyphenols (ppm) obtained with ethanol extracts differ and are lower than those obtained with water, cocoa butter and lanolin (Castillo *et al.*, 2010; Hernández *et al.*, 2010).

Conclusions

Bacillus isolates obtained from the rhizosphere of plants from the Chihuahuan Desert exhibit an antagonistic effect on plant pathogen *Rhizoctonia solani*. The most common species is *Bacillus subtilis*, and with lesser presence *B. atrophaeus* and *B. pumilus*. *Rhizoctonia solani* was highly sensitive to the extracts tested, which showed fungicidal activity at low concentrations. The most significant extracts for *in vitro* control of *R. solani* were *Opuntia ficus-indica*, *Flourensia cernua* and *Agave lechuguilla*.

End of the English version



- Choi, K. C.; Young, C.; An, S. H. and Yook, B. 1999. Effects of antagonistic bacteria and soil borne pathogenic fungi on growth of pasture plant seedlings. *Kor. J. Dairy Sci*. 21:41-48.
- Emmert, E. A. B. and Handelsman, J. 1999. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology Letters*. 171:1-9.
- Gamboa, A. R.; Hernández, C. F. D.; Guerrero, R. E. and Sánchez, A. A. 2003a. Mycelia inhibition of *Rhizoctonia solani* Kuhn and *Phytophthora infestans* Mont (De Bary) with methanolic vegetal extracts from tarbush (*Flourensia cernua* D.C.), Mejorana (*Origanum majorana* L.) and trompetilla [*Bouvardia ternifolia* (Ca.) Schlecht]. *Rev. Mex. Fitopatol*. 21(1):13-18.

- Gamboa-Alvarado, R.; Hernández, F. D.; Guerrero, E.; Sánchez, A.; Villarreal, L. A.; López, R. G.; Jiménez, F. and Lira-Saldívar, R. H. 2003b. Antifungal effect of *Larrea tridentata* extracts on *Rhizoctonia solani* Kühn and *Phytophthora infestans* Mont. (De Bary). *Int. J. Exp. Bot.* 119-126.
- Guetsky, R.; Shtienberg, D.; Elad, Y. and Dinooor, A. 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathology* 91:621-627.
- Hernández, C. F. D.; Cepeda, S. M.; García, C. J. and Pérez, Ch. A. 2001. Grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* de la región papera de Toluca estado de México y susceptibilidad in vitro a fungicidas de diferente grupo toxicológico. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). 17(2):59-67.
- Hernández, F. D.; Carvajal, C. R.; Guerrero, E.; Sánchez, A.; Gallegos, G. y Lira, R. H. 2005. Susceptibilidad a fungicidas de grupos de anastomosis del hongo de *Rhizoctonia solani* Kühn colectados en zonas paperas de Chihuahua, México. *Rev. Int. Bot. Exp.* 259-269.
- Hernández-Castillo, F. D.; Castillo-Reyes, F.; Gallegos-Morales, G.; Rodríguez-Herrera, R. and Aguilar-González, C. N. 2010. *Lippia graveolens* and *Carya illinoensis* organic extracts and there *in vitro* effect against *Rhizoctonia Solani* Kuhn. *Am. J. Agric. Biol. Sci.* 5:380-384.
- Hernández-Castillo, F. D.; Lira-Saldívar, R. H.; Cruz-Chávez, L.; Gallegos-Morales, G.; Galindo-Cepeda, M. E.; Padrón-Corral, E. y Hernández-Suárez, M. 2008. Potencial antifúngico de cepas de *Bacillus* spp. y extracto de *Larrea tridentata* contra *Rhizoctonia solani* en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). *Rev. Int. Bot. Exp.* 77:241-252.
- Hoyos-Carvajal, I.; Duque, G. y Orduz P. S. 2008. Antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. sobre aislamientos de *Sclerotinia* spp. y *Rhizoctonia* spp. *Rev. Colomb. Cienc. Hort.* 2(1):76-86.
- Jasso de Rodríguez, D.; Hernández-Castillo, F. D.; Angulo-Sánchez, J. L.; Rodríguez-García, R.; Villarreal-Quintanilla, J. A. and Lira-Saldívar, R. H. 2007. Antifungal Activity *in vitro* of *Flourensia cernua* and *Fusarium oxysporum*. *Industrial Crops and Products.* 25:111-116.
- López, B. J.; Campos, C. J. C.; Hernández, C. E.; Velásquez, B. C.; Farias, R. R.; Macías, R. L. I. and Valencia, C. E. 2007. *Bacillus megaterium* Rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin- and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *The American Phytopathological Society.* MPMI 20(2):207-217.
- Makkar, H. P. S. 1999. Quantification of tannins in tree foliage: a laboratory manual for FAO/IAEA. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Vienna, Austria. 5-7.
- Mojica-Marin, V.; Luna-Olvera, H. A.; Sandoval-Coronado, C. F.; Pereyra-Alferez, B.; Morales-Ramos, L. H.; González-Aguilar, N. A.; Hernández-Luna, C. E. y Alvarado-Gómez, O. G. 2009. Control biológico de la marchitez del chile (*Capsicum annum* L.) por *Bacillus thuringiensis*. *Rev. Int. Bot. Exp.* 78:105-110.
- Pal, K. K. and Gardener, B. M. 2006. *The plant health Instructor in biological control of plant pathogens*, Constable, London, English, 206 p.
- Pusey, P. L.; Stockwell, V. O. and Mazzola, M. 2009. Epiphytic bacteria and yeasts on apple blossoms and their potential as antagonists of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 99:571-581.
- Rodas, J. B. A.; Quero, B. M.; Magaña, S. H. F. y Reyes, R. 2009. Selección de cepas nativas con actividad Quitino-Proteolítica de *Bacillus* sp. aisladas de suelos tropicales. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 11(1):107-113.
- Schisler, D. A.; Slininger, P. J.; Behle, R. W. and Jackson, M. A. 2004. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. *Phytopathology* 94:1267-1271.
- SidAhmed, A.; Ezziyyani, M.; Pérez Sánchez, C. and Candela, M. E. 2003. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. And *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annum*) plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 109:633-637.
- Strobel, G. A. y Rodríguez, M. 2005. Pseudomicinas utilizadas contra las enfermedades de las plantas. Patente 2243539. bozeman, mt: the research and development Institute.
- Swain, T. and Hillis, W. E. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica* L. the quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* 10:63-68.
- Yuen, G. Y.; Schroth, M. N. and McCain, A. H. 1985. Reduction of *Fusarium* wilt of carnation with suppressive and antagonistic bacteria. *Plant Dis.* 69:1071-107.