

1990-B

REG. No. 083485809

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

---

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



"MICROORGANISMOS DEL SUELO Y SU INFLUENCIA BIOLÓGICA  
EN EL CONTROL DE FITOPATÓGENOS".

---

**TESIS PROFESIONAL**  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA  
P R E S E N T A  
JUANA LOPEZ NAVARRETE  
GUADALAJARA, JALISCO      JULIO 1994

---



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Expediente .....

Número .....

Sección .....

C. JUANA LOPEZ NAVARRETE  
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado el tema de Tesis "MICROORGANISMOS DEL SUELO Y SU INFLUENCIA BIOLÓGICA EN EL CONTROL DE FITOPATOGENOS" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis el M.en C. Gil Virgen Calleros.



FACULTAD DE  
CIENCIAS BIOLÓGICAS

A T E N T A M E N T E  
" PIENSA Y TRABAJA "  
Guadalajara, Jal., 5 Noviembre 1993.  
EL DIRECTOR

DR. EULOGIO PIMIENTA BARRIOS

EL SECRETARIO

M. EN C. MA. GEORGINA GUZMAN GODINEZ

c.c.p.- El M. en C. Gil Virgen Calleros; Director de tesis.-pte.  
c.c.p.- El expediente del alumno.

EPB>MGGG>Cg1r.

C. DR. FERNANDO ALFARO BUSTAMANTE

Director de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad  
de Guadalajara

P R E S E N T E.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a usted,  
que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó el (la)  
Pasante Juana López Navarrete  
código número 083485809 con el título  
MICROORGANISMOS DEL SUELO Y SU INFLUENCIA BIOLÓGICA EN EL CONTROL  
DE FITOPATOGENOS.

Consideramos que reúne los meritos necesarios para la impresion  
de la misma y la realizacion de los exámenes profesionales  
respectivos.

Comunicamos lo anterior para los fines a que haya lugar.

A T E N T A M E N T E

Guadalajara, Jal. a 25 de Mayo de 1994

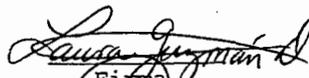
EL DIRECTOR DE TESIS



\_\_\_\_\_  
M.C. Gil Virgen Calleros

SINODALES

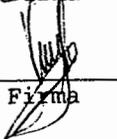
1. M.C. Laura Guzmán Davalos  
Nombre Completo
2. Dr. Eulogio Pimienta Barrios  
Nombre completo
3. Biol. Juana America Loza Llamas  
Nombre completo



\_\_\_\_\_  
Firma



\_\_\_\_\_  
Firma



\_\_\_\_\_  
Firma

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad de Guadalajara por haberme permitido realizar mis estudios de la Licenciatura en Ciencia Biológicas.

A mis maestros por haberme impartido sus conocimientos que de una u otra manera fueron parte de mi formación académica.

### **ESPECIALMENTE:**

Al maestro Gil Virgen por todo el apoyo desinteresado que me brindo durante la elaboración de éste trabajo.

Al Q.F.B. Angel Pérez Zamora por su apreciable colaboración en la revisión de éste trabajo.

A la Técnica Laboratorista Liliana Moreno Medina por darme la oportunidad de realizar éste trabajo en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Guadalajara.

A todo el personal del Laboratorio Bosque La Primavera por el apoyo que me brindaron durante la elaboración de éste trabajo.

Al Dr. Victor Olalde por su apreciable participación desinteresada durante la elaboración de éste trabajo realizado en el CINVESTAV- IPN Unidad Irapuato.

Al Químico Juan Vázquez Vázquez por su participación desinteresada en el presente trabajo.

A mis compañeros : Fátima, Juanita, Adriana, Carmen, Imelda, Jorge, Mario, con quienes pasé momentos agradables y por su participación durante la elaboración de éste trabajo.

A Martha Leticia Flores Montoya y Salvador Pérez Carbajal por el apoyo que me brindaron en la prestación de información para la elaboración de éste trabajo.

Al Sr. Jorge Hernández Everardo por la colaboración desinteresada que me brindo durante el presente trabajo.

Al Sr. Moisés Rivera Rivera Por el apoyo desinteresado que me brindo en la elaboración de éste trabajo.

Al Ing. Eduardo Salcedo Pérez, que me apoyó moralmente durante la elaboración del presente.

A José Pablo Cortés Torres por el apoyo que me brindó en la elaboración de éste trabajo.

## DEDICATORIAS

A mi padre: Antonio López Linares por la enseñanza y confianza que deposito siempre durante la culminación de mi carrera.

A mi Madre: Eloisa Navarrete Rodríguez por darme el don más preciado, la vida y por el apoyo moral que me ha brindado el transcurso de mi vida.

A mis hermanos: Pedro, Jesús, Alejandro, María, Mario, por el apoyo y la comprensión que me brindaron para seguir adelante siempre.

A mi sobrino: Eduardo López Vigerias

A mi cuñada: Luz Elena Vigerias.

A mis compañeros de la generación XIII

## INDICE DE CONTENIDO

	Página
INDICE DE FIGURAS. . . . .	III
INDICE DE CUADROS. . . . .	IV
RESUMEN. . . . .	1
INTRODUCCION . . . . .	2
OBJETIVO . . . . .	3
II. REVISION DE LITERATURA . . . . .	4
2.1. Importancia de las enfermedades causadas por:	
<i>Alternaria, Botrytis, Fusarium y Rhizoctonia solani</i> . . . . .	4
2.1.1. Enfermedades causadas por <i>Alternaria</i> . . . . .	4
2.1.2. Enfermedades causadas por <i>Botrytis</i> . . . . .	7
2.1.3. Enfermedades causadas por <i>Fusarium</i> . . . . .	10
2.1.4. Enfermedades causadas por <i>Rhizoctonia solani</i> . . . . .	14
2.2 Características taxonómicas del antagonista	
<i>Bacillus subtilis</i> . . . . .	16
2.3. Métodos de control . . . . .	17
2.3.1. Control químico . . . . .	17
2.3.2. Control genético . . . . .	18
2.3.3. Control cultural . . . . .	19
2.3.4. Control biológico . . . . .	20
2.3.4.1. Definición de control biológico . . . . .	21
2.3.4.2. Historia e importancia del control biológico . . . . .	21
2.3.4.3. Clasificación de los microorganismos de la rizósfera . . . . .	22
2.3.4.4. Agentes de control biológico . . . . .	23
2.3.4.5. Selección, formulación e inconsistencia de los agentes de control biológico . . . . .	26
2.3.4.6. Mecanismos de control biológico . . . . .	28

III. MATERIALES Y METODOS . . . . .	30
3.1. Materiales . . . . .	30
3.1.1. Material biológico . . . . .	30
3.1.2. Aparatos y cristalería. . . . .	30
3.1.3. Reactivos y medios de cultivo . . . . .	31
3.2. Métodos. . . . .	31
3.2.1. Aislamiento, selección e identificación de microorganismos antagonicos . . .	31
3.2.2. Aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos . . . . .	32
3.2.3. Prueba de antagonismo <i>in vitro</i> . . . . .	33
IV.- RESULTADOS . . . . .	34
V.- DISCUSION . . . . .	48
VI.- CONCLUSIONES . . . . .	50
VII.- LITERATURA CITADA . . . . .	51

## INDICE DE FIGURAS

### Figura No.

- 1.- Ciclo biológico de *Alternaria sp.*
- 2.- Ciclo biológico de *Botrytis sp.*
- 3.- Ciclo biológico de *Fusarium oxysporum*
- 4.- Ciclo biológico de *Rhizoctonia solani*.
- 5.- Efecto del antagonismo de *Bacillus subtilis* sobre *Alternaria*.
- 6.- Efecto del antagonismo de *Bacillus subtilis* sobre *Botrytis*.
- 7.- Efecto del antagonismo de *Bacillus subtilis* sobre *Fusarium*.
- 8.- Efecto del antagonismo de *Bacillus subtilis* sobre *Rhizoctonia solani*.

## INDICE DE CUADROS

### CUADRO No

- 1.- Registro del control de enfermedades de las plantas con *Bacillus subtilis*.
- 2.- Reacción de la bacteria identificada a las diferentes pruebas bioquímicas.
- 3.- Características diferenciales de algunas especies comunes de *Bacillus*.
- 4.- Resultados del antagonismo de *Bacillus subtilis* a *Alternaria*.
- 5.- Resultados del antagonismo de *Bacillus subtilis* a *Botrytis*.
- 6.- Resultados del antagonismo de *Bacillus subtilis* a *Fusarium*.
- 7.- Resultados del antagonismo de *Bacillus subtilis* a *Rhizoctonia solani*

## RESUMEN

*Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium* y *Rhizoctonia solani* causan enfermedades en diferentes cultivos agrícolas, originando con ello grandes pérdidas económicas en los mismos. La utilización del control químico de dichos fitopatógenos no ha sido del todo eficiente, de ahí la necesidad de buscar alternativas para el control de organismos fitopatógenos. Una alternativa prometedora es la utilización de microorganismos antagonistas del suelo, que actúan mediante la producción de sustancias tóxicas, como un medio de control de las enfermedades de las plantas.

El objetivo del presente trabajo fue, aislar bacterias antagonistas de suelo para el control biológico de *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium* y *Rhizoctonia solani*.

La bacteria antagonista, aislada de muestras de suelo, fué identificada como *Bacillus subtilis*. Los patógenos se aislaron en PDA a partir de plantas enfermas.

El efecto de *Bacillus subtilis* sobre el crecimiento de los hongos aislados, se evaluó mediante tres tipos diferentes de siembra de la bacteria con respecto al testigo.

De acuerdo con los resultados obtenidos, *Bacillus subtilis* ejerce una marcada antibiosis sobre *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium* y *Rhizoctonia solani*. Así mismo se observó que *Bacillus subtilis* tiene un mayor efecto inhibitorio sobre *Botrytis*.

## I.INTRODUCCION:

Las enfermedades de las plantas han estado presentes desde los inicios de la agricultura. La expansión y el crecimiento de la población han causado la necesidad de producir más alimento, incrementándose con ello la cantidad de tierras destinadas a la producción de cultivos.

Así mismo, las enfermedades de las plantas han provocado grandes pérdidas económicas, ya que han causado en todo el mundo pérdidas anuales en la producción del 13 al 20%, lo que representa una pérdida de 50,000'000,000 DLS.(James, 1981 citado por Lewis y Papavizas, 1991). Aún en los países más desarrollados y con muchos de los avances tecnológicos en el manejo de las enfermedades, las pérdidas son similares. Casi el 90% de las 2,000 enfermedades de los 31 cultivos principales son causadas por fitopatógenos del suelo.

Entre los principales fitopatógenos pueden considerarse a *Fusarium*, *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Botrytis* y *Alternaria*, ya que ellos están ampliamente distribuidos atacando a muchos cultivos; el control de dichos hongos ha sido en gran medida mediante la aplicación de fungicidas, lo cual representa una solución rápida a los problemas fitosanitarios, que incrementa los costos y no da resultados del todo satisfactorios, originando con ello además contaminación del medio ambiente y representando riesgo para la salud humana y animal, así como el favorecimiento de la resistencia a dichos agroquímicos.

Por ejemplo, se ha considerado que los plaguicidas utilizados en la agricultura han provocado cambios en los agroecosistemas. En un estudio del Instituto Mundial de Recursos ( WRI ) en 1984, se registró que en 1980 se conocían más de 150 especies de fitopatógenos resistentes a agroquímicos. Además, los plaguicidas pueden provocar 2 tipos de toxicidad; aguda y crónica, esta última caracterizada por 1) carcinogénesis, 2) mutagénesis, 3) teratogénesis y 4) trastornos del sistema nervioso. A pesar de ello, los plaguicidas son ampliamente utilizados; y para 1988, del 100% de los mismos, usados en el mundo, los fungicidas constituyeron un 20.5% ( Arnold, 1992 ).

Los microorganismos del suelo constituyen uno de los componentes esenciales del mismo. Intervienen en actividades biológicas, tales como fijación de nitrógeno, nitrificación, descomposición de materia orgánica y regulación de las poblaciones microbianas. Estas actividades contribuyen al crecimiento adecuado de las plantas, así como al control de enfermedades causadas por fitopatógenos. Así pues el control de enfermedades es esencial en los procesos de producción agrícola y en dicho control destaca la posibilidad de utilización de microorganismos del suelo, principalmente bacterias, capaces de suprimir el desarrollo de fitopatógenos.

Con base a lo anterior, para la presente investigación se planteó el siguiente:

### **OBJETIVO**

Aislar microorganismos del suelo, principalmente bacterias antagónicas a *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium* y *Rhizoctonia solani* Kuhn para su posible utilización en el control biológico.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Importancia de las enfermedades causadas por *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Rhizoctonia solani*

#### 2.1.1. Enfermedades causadas por *Alternaria*

Estas se encuentran entre las enfermedades más comunes de muchos tipos de plantas en todo el mundo. Afectan principalmente las hojas, tallos, flores y frutos de las plantas anuales, en particular de hortalizas y plantas de ornato, cítricos, manzano, etc. Las enfermedades causadas por *Alternaria* aparecen en forma de manchas y tizones foliares, causan el ahogamiento de plántulas, pudriciones del cuello, así como pudriciones de los frutos y tubérculos. Algunas de las enfermedades causadas por *Alternaria* incluyen al tizón temprano de la papa y del tomate; mancha foliar del frijol, tabaco y geranio; tizón del tallo de la zanahoria, clavel, crisantemo, petunia y zinnia; el tizón de las crucíferas; mancha púrpura de la cebolla; pudrición de los limones y naranjas y muchas otras más. Las infecciones graves en el campo se presentan cuando ha llovido intensamente más de un día (Agris, 1989).

Los daños que pueden provocar al hospedero dependen de la susceptibilidad y de las condiciones de humedad ambiental; así, en algunas regiones han ocasionado pérdidas hasta del 30% en condiciones favorables para su desarrollo. La enfermedad es más grave durante la fructificación (Mendoza y Pinto, 1983).

#### **Ciclo de la enfermedad**

Los conidios de *Alternaria* pueden sobrevivir por más de un año en los residuos de las plantas atacadas o en ocasiones sobre semillas, tubérculos y otros medios (Fig.1) es más probable que la infección primaria sea causada por el hongo que ésta en el suelo, contribuyendo a ella los días lluviosos o húmedos y la temperatura del aire de 24 C°. Es diseminado por las

corrientes de aire, agua de lluvia, herramientas, etc. y cuando las condiciones son favorables germinan sobre las plantas y penetran directamente o por aberturas, invaden los tejidos de las hojas, tallos y frutos formando un micelio intercelular, el cual origina los conidios sobre los tejidos que infectan las plantas. El hongo produce el ácido alternárico, una toxina causante de los efectos patológicos en el hospedante (Mendoza y Pinto, 1983).

Los factores que la favorecen son humedad relativa alta, lluvias frecuentes, temperatura de 20 a 28°C y baja fertilidad.

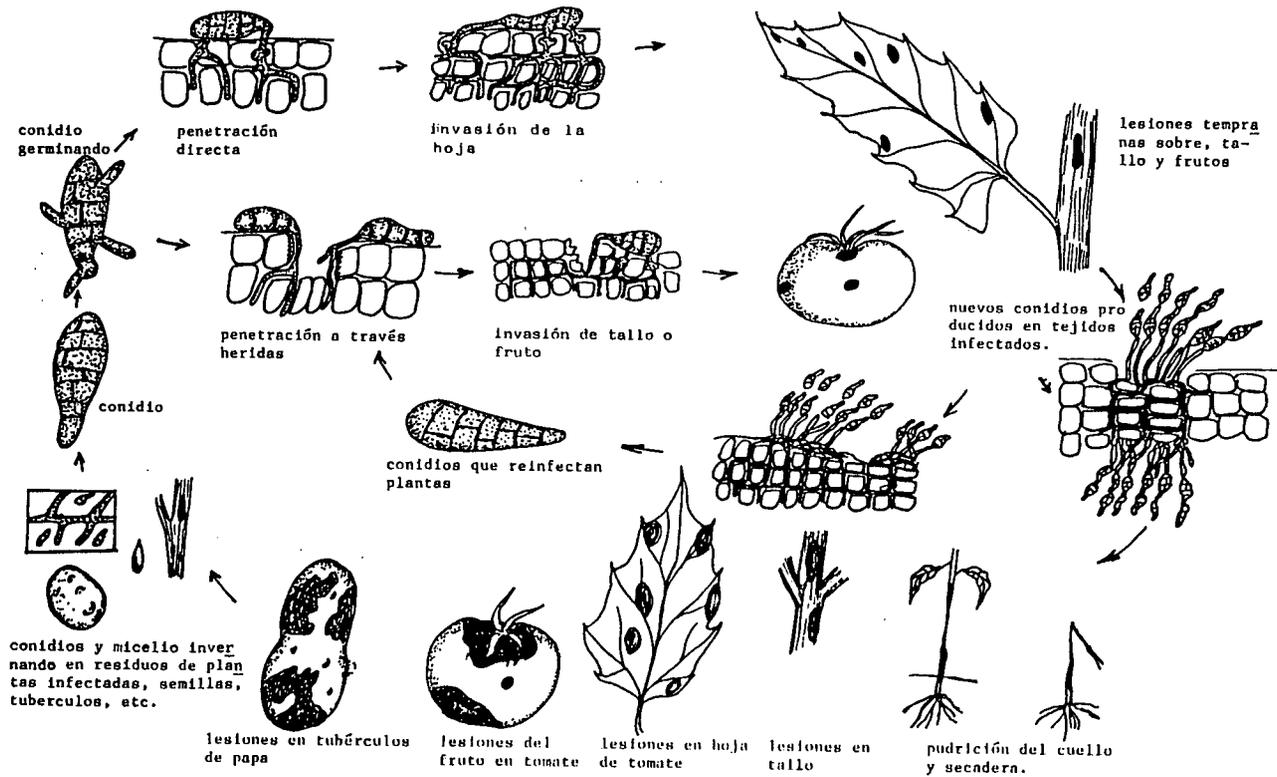


Figura 1.- Ciclo biológico de *Alternaria* sp. ( Agrios 1978)

## Ubicación taxonómica de *Alternaria*

Alexopoulos y Mims ( 1979 ) mencionaron que el hongo está clasificado de la siguiente manera.

Super-reino-----	<i>Eukarionta</i>
Reino -----	<i>Mycetae</i>
División-----	<i>Amastigomycota</i>
Subdivisión-----	<i>Deuteromycotina</i>
Clase-----	<i>Deuteromycetes</i>
Subclase-----	<i>Hyphomyetidae</i>
Orden -----	<i>Moniliales</i>
Familia-----	<i>Dematiaceae</i>
Género-----	<i>Alternaria</i>

### 2.1.2. Enfermedades causadas por *Botrytis*

Quizá sean las enfermedades más comunes y más ampliamente distribuidas en hortalizas, plantas de ornato, y frutales, aun de cultivos mayores en todo el mundo. Estas enfermedades se presentan con frecuencia en plantas cultivadas en los invernaderos. Las enfermedades causadas por *Botrytis* aparecen principalmente en forma de tizones de inflorescencias y pudriciones de fruto, cánceres o pudriciones del tallo, ahogamiento de plántulas, manchas foliares y pudriciones de los tubérculos, bulbos y raíces. Algunas de las enfermedades más importantes ocasionadas por *Botrytis* incluyen al moho gris de la fresa; la pudrición por el moho gris del frijol, remolacha, col, zanahoria, pepino y berenjena; pudrición del extremo de la punta de los plátanos, lechuga, pimiento, calabaza y tomate; tizón o moho gris de plantas de ornato como la violeta africana, begonia ciclámico, crisantemo, dalia, geranio jacinto, lirio, peonía, rosal, tulipán, y la mancha foliar y pudriciones de la gladiola y nochebuena, etc. *Botrytis* ocasiona también las pudriciones blandas secundarias en frutos y hortalizas cuando se almacenan, transportan y se venden en el mercado.

## **Ciclo de la enfermedad**

El hongo inverna como micelio y esclerocios sobre o dentro de los residuos de cosechas y en el suelo, éstos germinan y producen conidióforos, que a su vez forman conidios que, al ser liberados (Fig.3) pueden atacar plantitas al nivel del cuello [también infectan flores (pétalos), hojas y frutos], en donde los conidios germinan, penetran e invaden los tejidos, desintegrando las células a su alcance y ocasionando las pudriciones sobre las cuales se desarrollan los conidióforos y conidios que forman la capa o moho gris; de ahí se liberan de nuevo y atacan otras plantas.

Cuando las condiciones son desfavorables forman sobre las pudriciones los esclerocios, los cuales le sirven como estructuras de sobrevivencia.

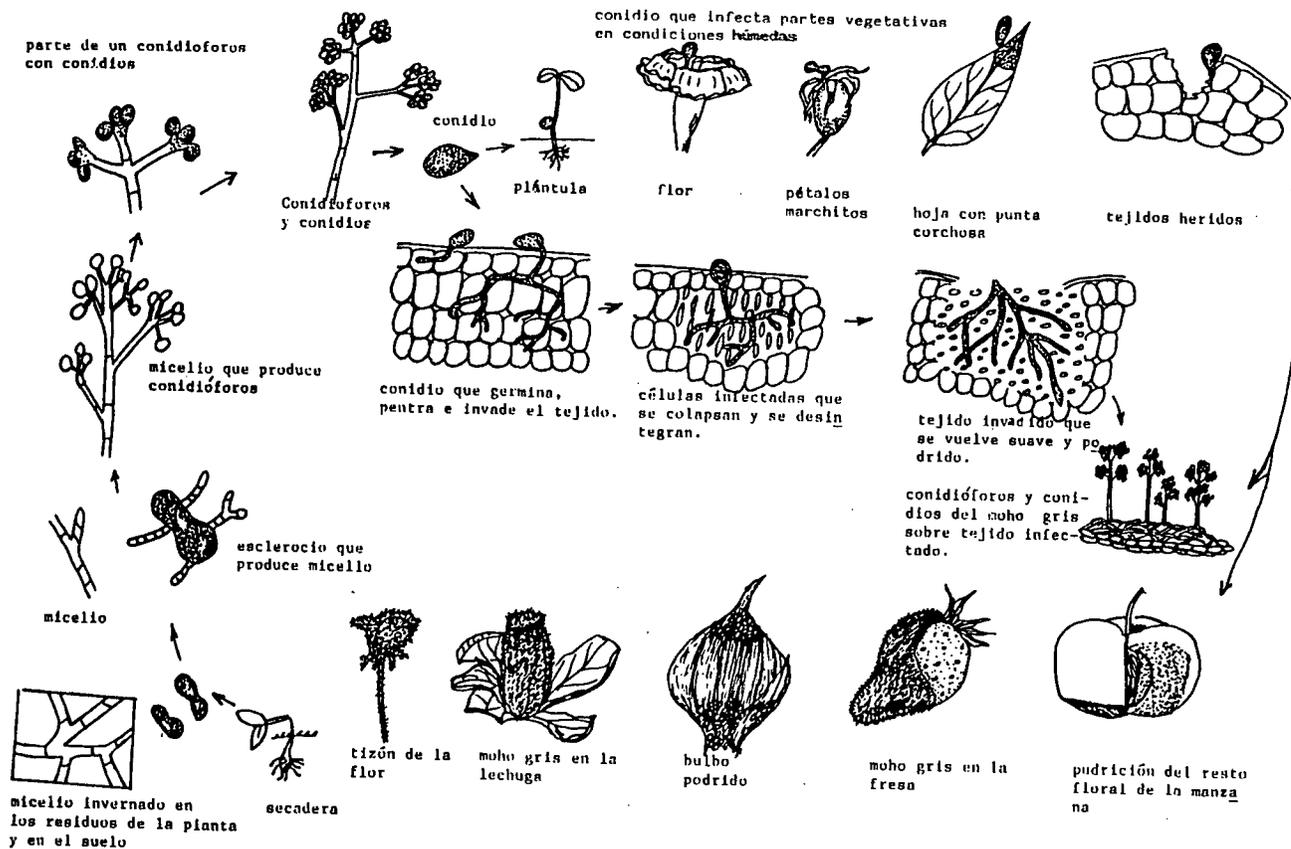


Figura 2.- Ciclo biológico de *Botrytis* sp. (Aerion 1978)

## Ubicación taxonómica de *Botrytis*

Alexopoulos y Mims (1979) mencionaron que el hongo ésta clasificado de la siguiente manera.

Super- reino-----	Eukaryonta
Reino-----	Mycetae
División-----	Amastigomycota
Subdivisión-----	Deuteromycotina
Clase-----	Deuteromycetes
Subclase-----	Hyphomytetidae
Orden-----	Moniliales
Familia-----	Mucedinaceae
Género-----	<i>Botrytis</i>

### 2.1.3. Enfermedades causadas por *Fusarium*

Estas enfermedades afectan y ocasionan pérdidas considerables en la mayoría de las flores y hortalizas, muchas plantas del campo como algodón y tabaco, plantaciones de plátano, llantén, café y caña de azúcar, así como en algunos árboles de sombra. La enfermedad es destructiva tanto en climas cálidos como templados.

#### Ciclo de la enfermedad

El daño es más intenso con temperatura del medio ambiente de 21 a 33°C; a temperatura superior a 33°C, el hongo se desarrolla más lentamente. Su crecimiento y reproducción son mayores con temperaturas del suelo alrededor de 27-29 °C; las plantas mueren de 2 a 4 semanas después de la infección.

Otras condiciones que la favorecen son la baja humedad del suelo, días cortos, alto contenido de nitrógeno combinado con bajo contenido de potasio. Sin embargo, un nivel bajo de nitrógeno combinado con alto contenido de potasio, reducen la enfermedad. El inóculo se disemina por suelo contaminado, agua de lluvia, implementos agrícolas, trasplantes y en ocasiones por la semilla.

Generalmente el ciclo (Fig.2) empieza con la presencia de macroconidios, microconidios, micelio y/o clamidosporas en el suelo infectado, los cuales germinan y penetran por heridas o aberturas naturales, atacando e invadiendo todo el xilema, con lo cual éste adquiere cierta tonalidad amarillo-ocre-café, que externamente se manifiesta como una clorosis. El micelio sigue desarrollándose y llega a invadir las células adyacentes al xilema; se presenta marchitez y la muerte de la planta. Las toxinas y la obstrucción mecánica de los tejidos son los responsables de la marchitez y muerte de la planta (Mendoza y Pinto 1983).

La formación de conidios se efectúa en las hojas de las plantas muertas y en el suelo.

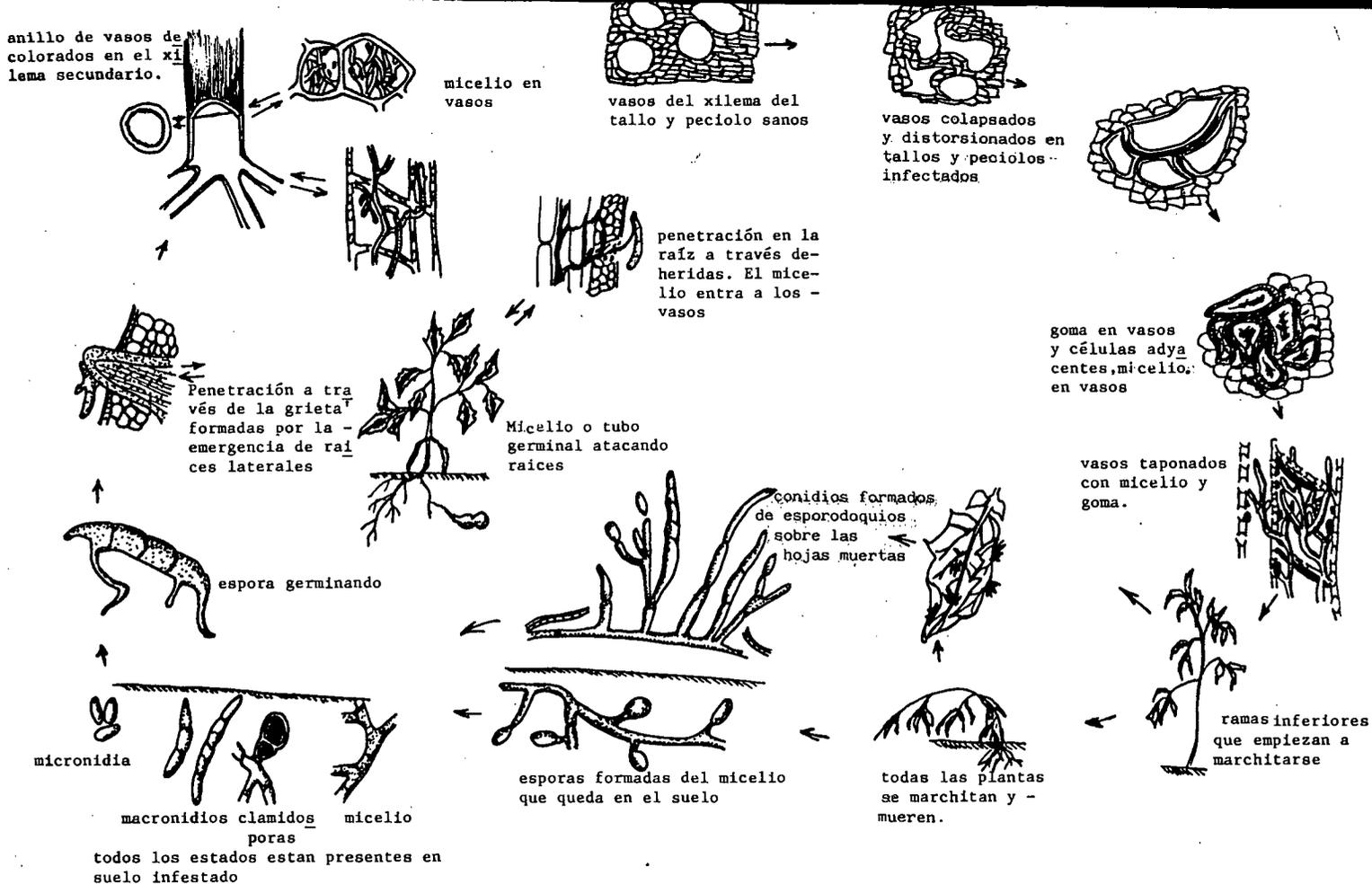


Figura 3.- Ciclo de la marchitez del tomate causado por Fusarium oxysporium f. lycopersici (Agríos 1978)

## Ubicación taxonómica de *Fusarium*

Alexopoulos y Mims ( 1979 ) mencionaron que el hongo del marchitamiento está clasificado de la siguiente manera:

Super-reino-----Eukaryonta  
Reino-----Mycetae  
División-----Amastygomycota  
Subdivisión-----Deuteromycotina  
Clase-----Deuteromycetes  
Subclase-----Hyphomycetidae  
Orden-----Moniliales  
Familia-----Tuberculariaceae  
Género-----*Fusarium*

#### **2.1.4. Enfermedades causadas por *Rhizoctonia solani* Kuhn**

Estas enfermedades ocurren en todo el mundo y producen pérdidas que van del 20 al 50% en siembra directa; además provocan diferencia en maduración y reducciones en rendimiento.

Ocasiona marchitez en : algodón, frijol, fresa, papa chícharo, crucíferas, tabaco, clavel, gladiola, cebolla, ajo, espárrago soya, berenjena, tomate, y chile.

En condiciones favorables ataca plántulas antes de que hayan emergido o poco después de la emergencia del suelo.

Los síntomas más comunes son el ahogamiento de las plántulas y la pudrición de la raíz, la pudrición de los órganos almacenados, así como los tizones o manchas del follaje, especialmente del follaje que se encuentra cerca del suelo.

Las lesiones son hundidas, de tamaño variable, con coloraciones de café canela a café rojizo. Las áreas oscuras y necróticas son más evidentes cuando el tejido atacado es grande; si las condiciones son favorables, las lesiones se extienden y adquieren un aspecto hundido y pueden llegar a cubrir todo el tallo y destruirlo, así como las raíces, debilitando la planta o causándole un acentuado color amarillento (Agrios, 1989 y Mendoza y Pinto, 1983)

#### **Ciclo de la enfermedad**

Las condiciones que favorecen la incidencia de la enfermedad son un exceso de humedad en el suelo y temperatura alrededor de 15 °C.

Este hongo produce estructuras de resistencia llamados microesclerocios semejantes a piedrecillas negras, las cuales quedan adheridas al tubérculo dando el aspecto de que estuviera impregnado de lodo. Se producen al inicio de las lluvias (Fig.4). En plantas suculentas como clavel, gladiola, etc., se puede observar el micelio como filamento de color café o ámbar a la altura del cuello de la raíz. Esto lo diferencia de *Fusarium*; además de que éste ocasiona estriaciones de color rosado en la raíz debido a que la epidermis se agrieta y se forman los conidios, *Rhizoctonia solani* sobrevive también en residuos de cosechas y en las semillas. Los esclerocios germinan entre 8-30 °C, con un óptimo de 21 a 25 °C.

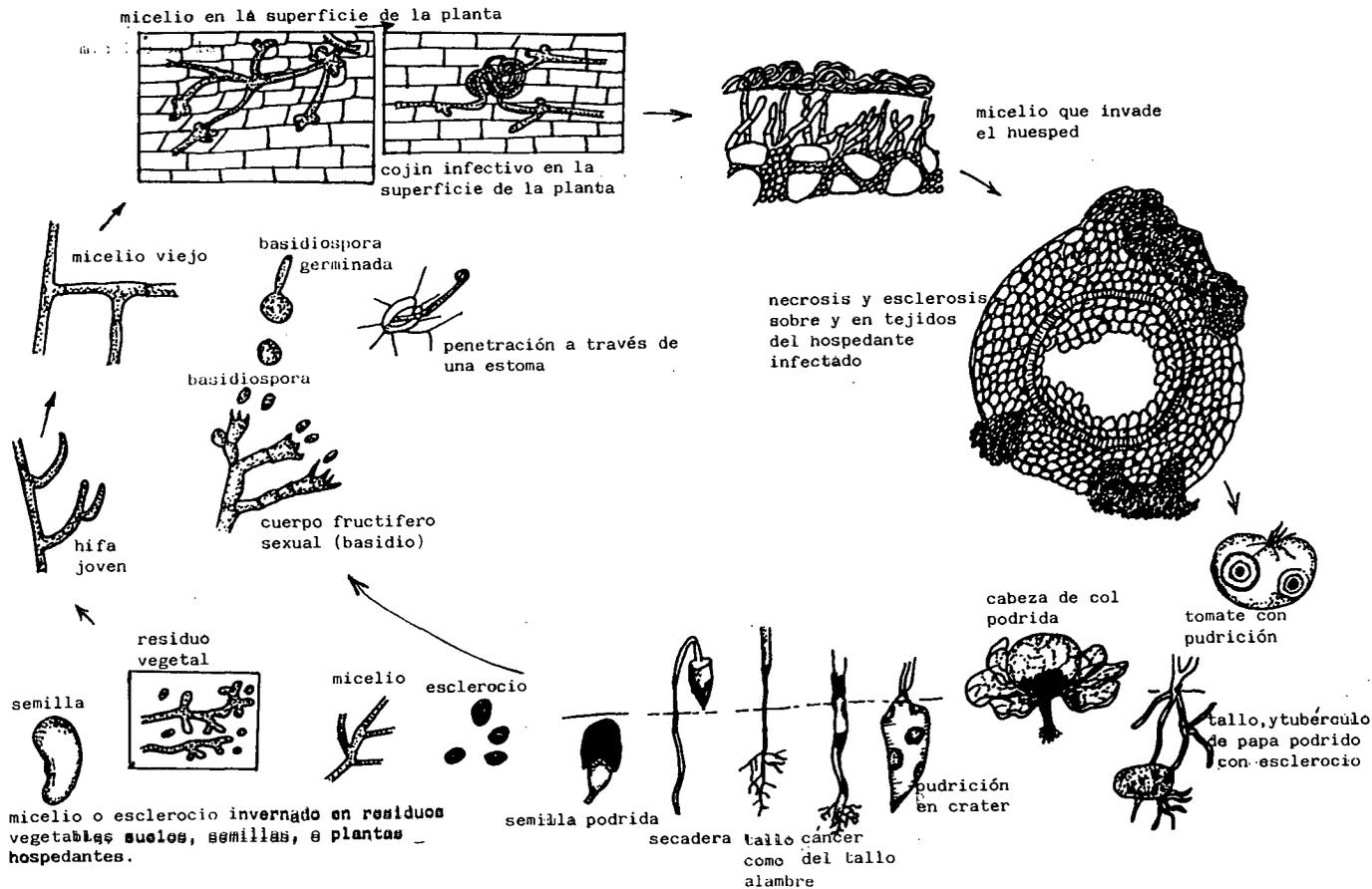


Figura 4.- Ciclo biológico de Rhizoctonia solani (Agrios 1978)

### Ubicación taxonómica de *Rhizoctonia solani*.

Alexopoulos y Mims (1979) mencionaron que el hongo ésta clasificado de la siguiente manera:

Super- reino-----	Eukaryonta	Reino-----	Mycetidae
División-----	Amastigomycota	Subdivisión-----	Deuteromycotina
Clase-----	Deuteromycetes	Subclase-----	Hyphomycetidae
Orden-----	Mycelia Sterilia	Familia-----	Stilbaceae
Género-----	<i>Rhizoctonia</i>	Especie-----	<i>solani</i>

### 2.2. Características taxonómicas del antagonista *Bacillus subtilis*

Las características taxonómicas de *Bacillus subtilis* Cohn según el Manual de Bacteriología de Bergey (Breed *et al.*, 1957) son:

- Bacilos de 0.8 por 2.0 a 3.0 micras, rectos o curvos con extremos redondeados.
- Aislados, raramente en cadena
- Endosporas de formas elipsoidales a cilíndricas de 0.8 por 1.5 a 1.8 micras.
- La superficie de las esporas se tiñe tenuemente con colorantes
- Colonias en agar opacas o blancas, redondas o irregulares.
- Superficie de la colonia redonda, espesa y opaca; puede ser arrugada.
- Color de la colonia crema o castaño.
- Gram positiva
- Aeróbica, excepto en medio de glucosa.
- Temperatura óptima del cultivo, 28 a 40 °C.
- Reduce NO<sub>3</sub> a NO<sub>2</sub>.
- Hidroliza almidón.
- Descompone caseína.
- Catalasa positiva.
- Desarrolla en pH de 5.0 a 8.6
- Gelatinasa positiva.
- Citrato positivo

## 2.3. Métodos de control

### 2.3.1 Control químico

#### *Alternaria*

Las enfermedades causadas por *Alternaria* se han controlado con aspersiones de fungicidas, tales como clorotalonil, maneb, captafol o una mezcla de maneb y zinc. Las aspersiones deben iniciarse tan pronto como las plántulas han emergido o han sido trasplantadas, o deben repetirse a intervalos de 1 a 2 semanas dependiendo de la prevalencia de la enfermedad y de la fuerza y frecuencia de las lluvias. Cuando aparezcan las primeras hojas verdaderas se recomienda aplicar manzate o daconil (Agríos, 1989 y Mendoza y Pinto, 1983 ).

#### *Botrytis*

El control de *Botrytis* en los terrenos de cultivo se ha realizado mediante aspersiones químicas; sin embargo, aún no ha tenido el éxito deseado, especialmente en climas húmedos y fríos. En el caso de la pudrición de la lechuga por *Botrytis* se recomienda llevar a cabo aspersiones con diclorán o zineb; otros fungicidas como difolatan, dryne, maneb- zinc, maneb o el clorotalonil, parecen proporcionar un control más eficaz en plantas de cultivo, tales como cebolla y tomate (Agríos,1989).

Noguchi *et al.* en 1968 observaron que el tiofanato metílico (cycosin 70) es un fungicida que controla eficientemente las enfermedades causadas por *Botrytis* (Bauer,1987).

#### *Fusarium*

El control químico no ha resultado muy efectivo, porque el hongo habita en el suelo, el cual constituye una barrera física entre el hongo y los fungicidas. No obstante, se han realizado algunos intentos por reducir el efecto del patógeno.

Noguchi *et al* en 1968 registraron que los fungicidas benomyl y tiabendazole dan resultados satisfactorios en el control de enfermedades inducidas por *Fusarium* (Bauer, 1987).

### ***Rhizoctonia solani***

Fumigar el suelo de los almácigos con bromuro de metilo o pentacloro nitrobenzeno (PCNB) al 75 % en dosis de 8 a 10 g/m<sup>2</sup> se ha considerado como eficiente aplicándolo en banda total ó 2.0 kg/100 litros de agua cuando se aplica en banda a lo largo del surco.

Es recomendable tratar las semillas con captan o PCNB; para tratamiento postemergente se recomienda asperjar las plántulas con captan o kocide y después a intervalos de 5 a 7 días.

En plantas grandes se recomienda aplicar captan o benlate, dirigido al cuello de la planta o mancazeb o daconil. Se pueden emplear otros protectores de semillas como captan, arasan y thiram; también es recomendable asperjar benomyl y tecto 60 al cuello de la planta cuando inicia la enfermedad, (Mendoza y Pinto, 1983).

### **2.3.2 Control genético**

Este tipo de control implica el uso de la resistencia heredada del hospedero al ataque de algún patógeno.

Las enfermedades causadas por *Alternaria* se controlan principalmente mediante el uso de variedades resistentes (Agris, 1989).

Orton en 1911 fue el primero en desarrollar una variedad de sandía resistente al ataque de *Fusarium oxysporum*. f. sp. *niveum* (E.F. Smith) Snyder y Hansen, al cual la llamó conqueror (Bauer, 1987).

León (1982) mencionó que las variedades dixie, queen, blacklee, garrisonian, charleston, gray, blue, ribbon, dixie, hybrid y otras más son resistentes al ataque del patógeno.

Hopkins *et al.* en 1987 concluyeron que solamente la variedad crimson sweet tiene moderada resistencia a *Fusarium* en invernadero y tiene una resistencia efectiva a lo largo de 7 años de monocultivo. Esta resistencia parece ser el resultado de una promoción de un factor de control biológico en el suelo (Virgen, 1990).

Sin embargo, el control genético ha sido efectivo sólo en cierta medida, ya que existen varias razas del hongo *Fusarium*, y algunas de ellas altamente virulentas, así como la encontrada en Israel por Netzer (1978) en donde todas las variedades de sandía han sido atacadas por esta raza del hongo, *F. oxysporum* f. sp. *niveum*. Además, muchas de las variedades resistentes no son muy aceptadas en el mercado (Dixon en 1881, citado por Díaz, 1990).

Por otro lado, hasta ahora no existe literatura sobre el control genético de *Botrytis* y *Rhizoctonia solani*.

### 2.3.3. Control cultural

El control cultural es aquel en que las prácticas normales de un cultivo pueden ser utilizadas para reducir la incidencia de la enfermedad. Las prácticas más usadas por su eficiencia para el control de fitopatógenos de suelo, son las aplicaciones de cosechas residuosy/o modificadores orgánicos. Al respecto se han planteado dos hipótesis para tratar de explicar la efectividad de los modificadores orgánicos en el control de fitopatógenos del suelo: 1) los productos que resultan de la descomposición tienen un efecto nocivo sobre los patógenos del suelo y 2) se incrementan las poblaciones de organismos antagónicos a fitopatógenos del suelo ( Zavaleta, 1987 ).

### *Alternaria*

La rotación de cultivos por un período de 3 años reduce la cantidad del inóculo; así mismo, la eliminación y quema de los restos de las plantas ( en caso de que estén infectados ) y la erradicación de las malas hierbas, ayudan a disminuir la cantidad del inóculo que pudiera infectar a las nuevas plantas susceptibles ( Agrios, 1989 ).

## ***Botrytis***

El control de las enfermedades causadas por *Botrytis* se logra mediante la eliminación de restos de plantas infestadas e infectadas y proporcionando las condiciones para que exista una ventilación adecuada y una rápida desecación, tanto de las plantas como de sus productos. En los invernaderos, el nivel de humedad debe reducirse mediante ventilación y calefacción. (Agrios, 1989).

## ***Fusarium***

La disponibilidad y el tipo de fuentes de nutrientes son importante en la incidencia de algunas enfermedades. Por ejemplo, las poblaciones del patógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* se redujeron un 25 a 30 % por la aplicación de urea más superfosfato de calcio, o nitrato de potasio, respectivamente, 15 días después de enriquecerlo, pero la población del patógeno se incrementó un 15.5 o 58.81 % cuando se incorporó 0.1 o 1 % de sulfato de amonio, respectivamente (Huang y Sun en 1982 citado por Díaz, 1990.)

## ***Rhizoctonia solani***

Debe evitarse cultivar las tierras húmedas y muy poco drenadas, por lo que tiene que mejorarse el drenaje; las semillas deben sembrarse en camas elevadas y en suelos que presenten las condiciones más adecuadas para que las plántulas se desarrollen con rapidez. Debe haber espacios amplios entre las plantas para que se permita una buena aireación de la superficie del suelo y de las plantas. Cuando se presenten razas específicas del patógeno, puede ser conveniente una rotación de cultivos cada tres años (Agrios, 1989).

### **2.3.4. Control biológico**

El control biológico de organismos fitopatógenos es un campo de investigación relativamente nuevo que promete ser una de las formas aceptables para el control de las enfermedades de las plantas, debido al poco desequilibrio ecológico que ocasiona.

#### **2.3.4.1. Definición de control biológico**

El control biológico de las enfermedades de las plantas puede definirse como; cualquier condición o práctica bajo la cual, la sobrevivencia o actividad de un patógeno se reduce debido a la acción de cualquier organismo viviente (excepto el hombre), resultando una reducción de la enfermedad causada por el patógeno. El control biológico puede lograrse mediante la introducción o aumento de una o más especies antagonicas. En otra definición, el control biológico comprende el uso de cualquier organismo para controlar un patógeno, incluyendo el uso de plantas superiores y la resistencia genética de plantas hospederas, que es un control biológico de los más efectivos. ( Cook, 1985 ).

Por años hubo controversia considerable entre los microbiólogos para establecer la significancia de la producción de antibióticos en la economía microbiana del suelo. El argumento de la actividad de los antibióticos en la naturaleza se debía a la dificultad para detectar cualquier cantidad significativa por los métodos más comunes de análisis del suelo (Garrett, 1965, citado por Virgen, 1990). Por otra parte, Merriman *et al.* (1975) probaron el efecto de siete organismos antagonicos en plantas de papa, en suelos estériles; entre estos organismos se encontró *Bacillus subtilis* Cohn, aislamientos 1-B3, 1-B68, 1-B77 y 1-B80. El aislamiento 1-B80 aumentó la producción, en suelo inoculado con *Rhizoctonia solani*, posiblemente debido a un efecto antagonico y porque parece que la bacteria produce sustancias similares a giberelinas.

#### **2.3.4.2. Historia e importancia del control biológico.**

El estudio del control biológico de los patógenos del suelo se remonta a inicios del siglo XX. Potter en 1908 demostró que la actividad de un patógeno puede inhibirse por acumulación de sus propios productos metabólicos. Sanford en 1926 sugirió que el control de la roña de la papa con *Streptomyces scabies* (Thaxtes), Waksman se realizaba por la adición de abonos verdes, constituyendo un control biológico, debido a un incremento de ciertas bacterias antagonicas que se multiplican sobre material orgánico. Este mismo autor integró dos hipótesis concisas de control biológico, como sigue: (1) los organismos saprófitos pueden controlar la actividad de los patógenos de las plantas y (2) el balance microbiológico del suelo puede

cambiarse por alteración de las condiciones del mismo, en particular adicionando material orgánico fresco, ya que promueve la actividad y multiplicación de saprófitos; mediante competición por nutrientes y por oxígeno, y por sus excreciones, los saprófitos suprimen la actividad y la multiplicación de los patógenos (Virgen, 1990).

A partir de entonces el número de escritos sobre control biológico se ha incrementado, especialmente después de 1965 (Baker, 1987). Aunque durante mucho tiempo el control biológico no se consideró económicamente factible (Weller, 1988), actualmente se piensa que este tipo de control puede tener un papel importante en la agricultura del futuro, por el hecho de que varias compañías tienen programas para desarrollar agentes de control biológico con esta clase de organismos como productos comerciales. Esto es una respuesta de interés, en lo concerniente al peligro del uso de pesticidas químicos (Weller, 1988).

#### **2.3.4.3 Clasificación de los microorganismos de la rizósfera.**

La rizósfera es la región profundamente poblada por diferentes microorganismos, incluyendo ambos benéficos y algunos perjudiciales, siendo ideales como agentes de control biológico, puesto que la rizósfera provee la línea frontal de defensa para las raíces al ataque de los patógenos (Weller, 1988).

#### **Microorganismos benéficos de la rizósfera ( MOBR ).**

En el amplio sentido incluye simbioses ( *Rhizobium*, ciertos actinomicetos y hongos micorrízicos ) y saprófitos de vida libre, que incrementan la disponibilidad de los nutrientes o sustancias necesarias para el desarrollo de las plantas y/o suprimen parásitos obligados y parásitos facultativos (Schippers, *et al.* 1987).

Son de gran interés, dentro de los microorganismos benéficos de la rizósfera, aquellos que además de tener un efecto antagónico también promueven el desarrollo de las plantas. Burr *et al.* (1978) registraron que cepas de *Pseudomonas fluorescens* Migula y *P. putida* (Trevisan), Migula aplicadas a trozos de semillas, incrementaron el crecimiento de papa como un resultado en la producción de resistencia y control de enfermedades.

Por otra parte, Savamani y Gnanamanickam en 1988 encontraron que, además de suprimir el marchitamiento del plátano causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Smith la bacteria *Pseudomonas fluorescens* promovió el desarrollo de raíces y de la planta, determinando que la promoción del desarrollo se debe a una colonización agresiva y al desplazamiento de componentes dañinos de la microflora de las raíces, como lo habían determinado Schroth y Hancock en 1982 (citado por Virgen, 1990).

#### 2.3.4.4. Agentes de control biológico

Los microorganismos del suelo han mostrado eficiencia en el control biológico de enfermedades; así *Bacillus* spp. se ha usado sobre una amplia variedad de especies de plantas (Weller, 1988).

*Bacillus subtilis* ha sido probada en una amplia variedad de especies de plantas por su capacidad en el control de enfermedades. Esta especie es una candidata ideal para el control biológico, porque es de las bacterias que producen endosporas, las cuales son tolerantes al calor y a la desecación; de gran interés es la cepa *B. subtilis* A13, que fue aislada por Broadbent *et al.* ( 1971 ) de micelio de *Sclerotium rolfsii* Sacc. ya que ha mostrado antagonismo a muchos patógenos de plantas y ayuda a mejorar el crecimiento de un gran número de especies de plantas bajo condiciones naturales del suelo. En tratamientos de semilla, incrementó la cosecha de zanahoria en un 48 % , la de avena en 33 % y la de cacahuete en más del 37 % .

Entre los agentes usados como control biológico de patógenos, se consideran principalmente a las rizobacterias, entre las cuales se incluyen los siguientes géneros:

*Actinoplanes*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Amorphosporangium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Cellulomanas*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Hafnia*, *Micromonospora*, *Pseudomonas*, *Pasteuria*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Serratia*, *Streptomyces* y *Xanthomonas* (Weller, 1988).

Herrera y Herrera ( 1963 ) encontraron que el antibiótico producido por *B. subtilis* es difundible en el medio de cultivo y es capaz de inhibir a *Alternaria* y potencialmente a *Colletotrichum* sp., además *B. subtilis* fue capaz de proteger a las plántulas de tomate contra el ataque de *R. solani*, *in vitro*.

Filippi *et al.* ( 1984 ;1987 ) encontraron que una cepa de *B. subtilis* designada como M51, es particularmente activa contra *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* , tanto *in vitro* como *in vivo*, y que fue inhibidora hacia otras tres especies de *F. oxysporum* por un período de dos meses después del tratamiento de las plantas con *B. subtilis* M51 y se sugirió que la protección de las plantas depende de la presencia física de la bacteria sobre las células de las raíces.

Filippi *et al.* ( 1985 ) observaron que *B. subtilis* M51 fue activa sobre *Alternaria solani* (Ell. G. Martín) L.R. Jones Grout. *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* y *Rhizoctonia solani*, mientras que Virgen ( 1990 ) registró que *B. subtilis* dió una protección de 74.6% contra el marchitamiento de la sandía causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*.

Casarrubias y Frías ( 1992 ) evaluaron la eficiencia de *B. subtilis* para el control de la marchitez de plántulas de chile en condiciones de invernadero y encontraron que la actividad antibiótica de *B. subtilis* es efectiva contra la marchitez de chile causada por *Fusarium* y *Rhizoctonia*.

Thirumalachar y O' Brien ( 1977 ) encontraron que una cepa de *B. subtilis* inhibió el desarrollo de *Macrophomina phaseoli* (Maubl.) Ashby y *Botrydiplodia solani-tuberosa* Thri. & O' Br. y en estudios de campo los tratamientos a semillas y tubérculos antes de sembrarse redujeron la frecuencia de la podredumbre carbonosa de la papa. Por otra parte, Mew y Rosales ( 1986 ) registraron que bacterias fluorescentes y no fluorescentes inhiben el desarrollo miceliano de *Rhizoctonia solani*, afectan la viabilidad del esclerocio y promueven ligeramente la germinación de semillas de arroz.

Tschen y Kuo ( 1985 ) estudiaron los efectos antagónicos de *B. subtilis* y encontraron que el filtrado de un cultivo de esta bacteria afectó la formación de esclerocios de *R. solani*. El "damping off" en plantas de frijol es causado por *R. solani*, enfermedad que puede ser controlada con la aplicación de *B. subtilis* en el suelo. También mencionaron que cubrir la semilla con *B. subtilis* es el método más simple y efectivo para el control biológico del "damping off" en frijol. Aplicaciones de sustancias antibióticas aisladas de filtrados de cultivos de *B. subtilis* mostraron una obvia inhibición del crecimiento de *R. solani* y sobre el desarrollo de lesiones tanto en las vainas, como en partes productoras de follaje.

Elis *et al.* en 1982 citaron que *Bacillus subtilis* tiene un efecto antagónico a *Phytophthora cactorum* (Leb. & Cohn) Schroet, que produce la pudrición de la corona, localizada cerca del cuello al nivel del suelo, en los árboles de manzano (Utkhede, 1984).

Schroth y Hancoch ( 1982 ) registraron que el grupo de bacterias designadas como *Pseudomonales fluorescens* incrementaron el rendimiento de papa del 5 al 33% ; el de remolacha de 4 a 8 toneladas/ha y la raíz del rábano del 60 al 144% . A esas cepas y a otras similares se les dió el nombre de "rhizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas".

Por otra parte, Juhnke *et al.* en 1987 comentaron que una cepa de *B. subtilis* se ha comercializado, como inoculante de semillas, con el nombre de Quantium 4,000, la cuál tiene potencial para producir plantas sanas e incrementar la producción; así mismo indicaron que por la colonización de las raíces, estas bacterias pueden desarrollarse como agentes de control para patógenos de suelo (Díaz, 1990).

Velázquez ( 1991 ) mencionó que inoculando la semilla de sandía con *B. subtilis* se obtienen de 73 a 79% de plantas sanas contra el testigo que tuvo de protección 25% ; indicó además, que la marchitez de la sandía se incrementó durante el ciclo del cultivo al disminuir la eficiencia de *B. subtilis* por factores no determinados.

#### **2.3.4.5. Selección, formulación e inconsistencia de los agentes de control biológico**

La selección y formulación del candidato como agente de control biológico es un factor importante, ya que debe de establecerse y mantenerse durante un largo período sobre el material colonizado y adaptarse a muchos factores edáficos del suelo, incluyendo temperatura, humedad, pH, contenido de arcilla y otros factores ambientales, como desechos de plaguicidas. Además, se debe considerar la dosis del candidato a emplear (Weller, 1988 ). De los organismos más fácilmente formulables están las bacterias que producen endosporas (Weller, 1988); una de estas es *Bacillus subtilis*, la cual posee un amplio espectro de control, ya sea por sustancias antibióticas secretadas o por la competencia física por factores comunes con patógenos. Así mismo también se ha utilizado en otros cultivos (Cuadro.1).

Cuadro 1. Registro del control de enfermedades de las plantas con *Bacillus subtilis*  
( Pusey,1989).

Patógeno	Planta
Manzano	<i>Nectria galligena</i> Brees. <i>Phytophthora cactorum</i> Leb.
Clavel	<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht.
Cerezo	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissker <i>Monilinia fructicola</i> (Wint) Honey
Cítricos	<i>Alternaria citri</i> Ellis & Pierce
Maíz	<i>Fusarium roseum</i> (L.K.) Snyder y Hansen
Cebolla	<i>Sclerotium cepivorum</i> Berk.
Frutos de hueso	<i>Monilinia fructicola</i> (Wint) Honey
Papa	<i>Macrophomina phaseolina</i> (Tassi) G. Goid. <i>Botryodiplodia solani- tuberosi</i> Thri & O' Br. Frijol <i>Uromyces appendiculatus</i> (Pers.) Lev.
Soya	<i>Phomopsis</i> sp. <i>Rhizoctonia solani</i> Khun.
Remolacha	<i>Rhizoctonia</i> spp.

#### **2.3.4.6. Mecanismos de control biológico.**

##### **Mecanismo de Antagonismo**

En 1960 se suscribió el uso del término antagonismo, para designar a todas aquellas interacciones en las cuales al menos una de las especies interactuantes es dañada.

Los mecanismos de supresión del patógeno por un agente de control biológico son competencia por sustrato, exclusión, antibiosis y explotación ( que incluye parasitismo y depredación ), sideróforos y resistencia inducida.

En la competencia por nutrientes proporcionados por los exudados de raíces y semillas, probablemente ocurren muchas interacciones entre las bacterias antagónicas y los patógenos. ( Weller, 1988 ). En concreto, antagonismo es cualquier interacción entre dos o más poblaciones de especies, que afectan su desarrollo y sobrevivencia. Los microorganismos benéficos, especialmente actinomicetos, se incrementan principalmente con el uso de aditamentos orgánicos y compiten por la raíz ( Sun y Huang, 1985 ).

##### **Antibiosis**

La antibiosis juega un papel importante en la supresión de enfermedades, mediante la producción de antibióticos de algunas bacterias. Un microorganismo se defiende de sus enemigos de diversos modos: puede producir metabolitos que alteren las condiciones de un medio, tales como pH, presión osmótica y tensión superficial, haciendo que el ambiente sea desfavorable para el desarrollo de microorganismos más exigentes. Así mismo, puede elaborar sustancias tóxicas específicas que perturben el metabolismo de otros gérmenes, hasta el punto de que mueran o sean incapaces de reproducirse. Estas sustancias se denominan antibióticos. (Salle, 1965).

La antibiosis se ha considerado como antagonismo mediado por metabolitos específicos y no específicos de origen microbiano, por agentes líticos, enzimas, compuestos volátiles y otras sustancias tóxicas ( Fravel, 1988 ). Puede considerarse como la relación en la cual una especie A produce una sustancia nociva a la especie B, sin que la especie A obtenga beneficio directo. La antibiosis es considerada como uno de los mecanismos más importantes.

Loeffler *et al.* (1986) registraron que el complejo de fengomicina, sustancia producida por *B. subtilis* reduce la infección de *R. solani*.

Tschen en 1987 estudió los efectos de *B. subtilis* F.29-3 sobre el crecimiento de *R. solani*, incluyendo la costra negra de la papa y el tizón del arroz. En papa dextrosa agar (PDA), *B. subtilis* induce a *R. solani* a formar engrosamiento de las hifas y acumular sustancias quitinosas de las mismas (Díaz, 1990).

Thomashow y Weller (1988) registraron que *Pseudomonas fluorescens* 2-72 inhibió totalmente la pudrición de la raíz causada por *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) Arx y Olivier

El parasitismo ocurre en nemátodos, como lo mencionaron Stirling y Wachtel (1980); una preparación de *B. penetrans*, incorporada al suelo en proporción de 100 mg/kg, ocasionó que en 24 hrs. el 99% de los juveniles de *Meloidogyne* fueron parasitados.

Kloepper *et al.* en 1980 fueron los primeros que demostraron la importancia de los sideróforos ( quelato con un bajo peso molecular y alta afinidad al  $Fe^{++}$ , que transporta hierro en las células de los microorganismo) como mecanismo de control biológico. Los sideróforos regulan la cantidad de hierro en la rizósfera, privando de éste a los patógenos y suprimiendo su desarrollo. Existen registros publicados acerca de la influencia de los sideróforos en el control de fitopatógenos ( Baker, *et al.* 1986).

### III. MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Guadalajara , ubicada en el Predio Las Agujas, Municipio de Zapopan, Jal. y en el Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Instituto Politecnico Nacional, Unidad Irapuato Gto. (CINVESTAV - IPN).

#### 3.1. MATERIALES.

##### 3.1.1. Material biológico

- Microorganismo antagonico: *Bacillus subtilis* se obtuvo de muestras de suelo.
- Microorganismos fitopatógenos: *Alternaria* se aisló de plantas de gerbera, *Fusarium* fue aislado de plantas de tomate, *Botrytis* sp. de nochebuena y *Rhizoctonia solani* de col.

##### 3.1.2. Aparatos y cristalería

- Balanza granataria
- Microscopio óptico
- Estufa de incubación
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Matraces erlenmeyer de 50, 500 y 1000 ml.
- Pipetas serológicas de 1,10 ml
- Cajas de petri

### 3.1.3. Reactivos y medios de cultivo

- Reactivos para la coloración de Gram
- Reactivo de Kovac
- Acido láctico
- Lactofenol
- Papa dextrosa agar (PDA)
- Agar nutritivo (AN)

## 3.2 METODOS

### 3.2.1. Aislamiento, selección e identificación de microorganismo antagonicos.

Se colectaron muestras de suelo del Bosque La Primavera, Municipio de Zapopan, Jal. y se trasladaron de inmediato al laboratorio para el aislamiento de microorganismos. Se tomó un gramo de suelo, el cual se diluyó en 9 ml de agua destilada estéril; esta operación se repitió hasta tener una dilución de  $10^{-4}$ . Del tubo que contenía la última dilución se tomó 0.1 ml y se sembró por el método de dispersión en placa, en medio papa dextrosa agar (PDA) y agar nutritivo (AN). Los medios fueron incubados de 22 a 24 C°, durante 72 hrs; posteriormente, al observar que una bacteria mostró antagonismo hacia los demás microorganismos presentes en la caja de petri, dicha bacteria fue aislada. La identificación se llevo a cabo en el CINVESTAV- IPN mediante la utilización de las pruebas pertinentes del Manual de

Laboratorio de Bacteriología Médica (Giano, *et al.* 1976), las cuales fueron: tinción de Gram y pruebas bioquímicas:

Fermentación de azúcares:

- Dextrosa
- Maltosa
- Glucosa
- Sacarosa
- Lactosa

Producción de indol

Reducción de nitratos

Utilización de citrato

Fermentación de manitol

Producción de ácido sulfhídrico.

### **3.2.2 Aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos.**

Se tomaron muestras de *Fusarium* partir de tomate, *Rhizoctonia solani* de papa, *Alternaria* a partir de gerbera, *Botrytis* de nochebuena. Las muestras de las plantas mostraban la presencia de la enfermedad. Los hongos se identificaron de acuerdo a las claves de Barnett y Hunter (1972), Finch (1981) Y Streets (1978). El procedimiento a que se sometieron dichas muestras fue el siguiente:

#### **Inducción de desarrollo vegetativo.**

El primer paso consistió en lavar el tejido infectado en agua, para separarlo de la materia orgánica extraña, posteriormente se esterilizó superficialmente el tejido con hipoclorito de sodio al 1% durante 1 minuto, después se lavaron dos veces con agua destilada estéril, para quitar el exceso de cloro, posteriormente se realizó la siembra en el medio PDA y se incubaron a una temperatura de 22 a 24 °C, para favorecer el desarrollo de los hongos.

Una vez que se obtuvieron las cepas de los hongos, se procedió a realizar la prueba de antagonismo. Para esta prueba se puso en una misma placa cada fitopatógeno junto con el organismo a probar, para observar su inhibición por competencia o antibiosis.

### **3.2.3. Prueba de antagonismo *in vitro***

La bacteria antagonica se sembró en PDA por estrías en tres formas diferentes: 1) en cruz, formando dos líneas que se cruzan en el centro de la caja, 2) en línea, atravesando el centro de las cajas y 3) en punto, inoculando en el centro de la caja. Estos tipos de siembra se han utilizado en estudios similares (Filippi *et al* 1987). Para cada forma de siembra se realizaron cuatro repeticiones.

El hongo se sembró un día después, cuando la bacteria ya estaba establecida, colocando un trozo de micelio de 0.6 mm de diámetro en los espacios libres de la caja, lo más alejado de la bacteria. También se sembró un testigo, que consistió en la siembra del hongo sólo en el centro de la caja. Las cajas se incubaron a una temperatura de 22 a 24 °C. El crecimiento del hongo se midió horizontalmente en centímetros, a partir del día siguiente a su siembra, durante cinco días consecutivos.

La evaluación se realizó desde el punto donde se colocó el fitopatógeno. El análisis de los resultados se realizó mediante el trazado de gráficas que permitieran ver el desarrollo de los hongos. Así mismo, se efectuaron observaciones microscópicas para observar el efecto inhibitorio en el micelio.

#### IV. RESULTADOS

Con base a los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de la bacteria, ésta se identificó como *Bacillus subtilis*, como se muestra en el cuadro 2. A diferencia de otras especies que tienen características similares, *Bacillus subtilis* como se observa en el cuadro 3, muestra hemólisis de sangre de borrego positiva, mientras que en *B. licheniformis* Weimann y *B. mycoides* la hemólisis es negativa; de la misma manera, se observa que *B. subtilis* es capaz de utilizar citrato; sin embargo, ni *B. circulans* Jordan, ni *B. sphaericus* Neide lo utilizan. Así mismo, se observó que *B. subtilis* reduce nitrato a nitrito, y *B. megaterium* Bary y *B. pumilus* Gottheil no lo reducen.

##### **Antibiosis de *Alternaria in vitro***

Los resultados del crecimiento de *Alternaria* en presencia de *Bacillus subtilis*, se muestran en el cuadro 4 y la figura 5. A partir del primer día de sembrado el hongo se observó inhibición por *B. subtilis* en la siembra en cruz (0.88 cm), en punto (0.73 cm) y en línea (0.71 cm), con respecto al testigo (1.02 cm). Del tercer al quinto día, el crecimiento de *Alternaria* en la siembra en cruz fue mínimo (1.52 a 1.59 cm), en el sexto día aumentó su crecimiento y en el séptimo día disminuyó. En los últimos días (sexto y séptimo) es poco el crecimiento micelial en la siembra en punto (2.54 a 2.6 cm) y en línea (2.18 a 2.25 cm) con respecto al testigo (6.5 cm).

En observaciones más detalladas en el microscopio se apreció que *Bacillus subtilis* provocó una marcada reducción en el diámetro de las hifas y una inhibición completa de la formación de los conidios de dicho hongo.

**Cuadro 2. REACCION DE LA BACTERIA IDENTIFICADA A LAS DIFERENTES PRUEBAS BIOQUIMICAS**

Análisis	Respuesta
<b>Movilidad</b>	+
<b>Licuefacción de gelatina</b>	+
<b>Utilización de citrato</b>	+
<b>Reducción de nitrato</b>	+
<b>Reacción de Voges Proskauer</b>	+
<b>Produccion de Indol</b>	-
* Glucosa	+
* Maltosa	+
<b>Acido de</b> * Sacarosa	+
* Lactosa	-
* Manitol	+
<b>Producción de ácido sulfhídrico</b>	-
<b>Hemólisis de sangre de borrego</b>	+

+ = Positivo

- = Negativo

CUADRO 3. CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DE ALGUNAS ESPECIES COMUNES DE BACILLUS

ESPECIES	MOVI- LIDAD	LICUEFAC- CION DE GELATINA	HIDROLISIS DE ALMIDON	HEMOLISIS DE SANGRE DE BORREGO	PEPTONIZA- CION DE LECHE	UTILIZA- CION DE CITRATO	REDUCCION DE NITRATO	REACCION DE VOGES PROSKAUER	ACIDO DE			
									ARABINOSA	GLUCOSA	MANITOL	SALICINA
B. ANTHRACIS	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
B. BOVIS	+	+	-	*	+	+/-	-	-	-	+	+	*
B. CEREUS	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+/-
B. CIRCULANS	+	+	+	*	ACIDO	-	+	-	+	+	+/-	*
B. LICHENIFORMIS	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
B. MEGATERIUM	+	+	+	*	+/-	+	-	-	+	+	+	*
B. MYCOIDES	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+/-
B. PUMILUS	+	+	-	*	+	+	+	+	+	+	-	*
B. SPHAERICUS	+	+	-	*	-	-	-	-	-	+	-	*
B. SUBTILIS	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	-	+	+/-

\* LA REACCION NO FUE ENCONTRADA EN LA LITERATURA CITADA

+/- ALGUNAS CEPAS FUERON POSITIVAS (+) OTRAS FUERON NEGATIVAS (-)  
TOMADA DE GIANO.1976

CUADRO 4. Resultado del Antagonismo de *Bacillus subtilis* a *Alternaria*

TIPO DE SIEMBRA	DIAS DESPUES DE SEMBRADO							
	1	2	3	4	5	6	7	%**
Cruz	0.88*	1.15	1.52	1.55	1.59	1.71	1.68	25.8
Punto	0.73	1.33	1.91	2.25	2.39	2.54	2.6	40.0
Línea	0.71	1.14	1.66	1.90	1.98	2.18	2.25	34.6
Testigo	1.02	1.78	2.65	3.5	4.16	5.53	6.5	100

\* Crecimiento micelial en cm.

\*\* Crecimiento con respecto al testigo (100%).

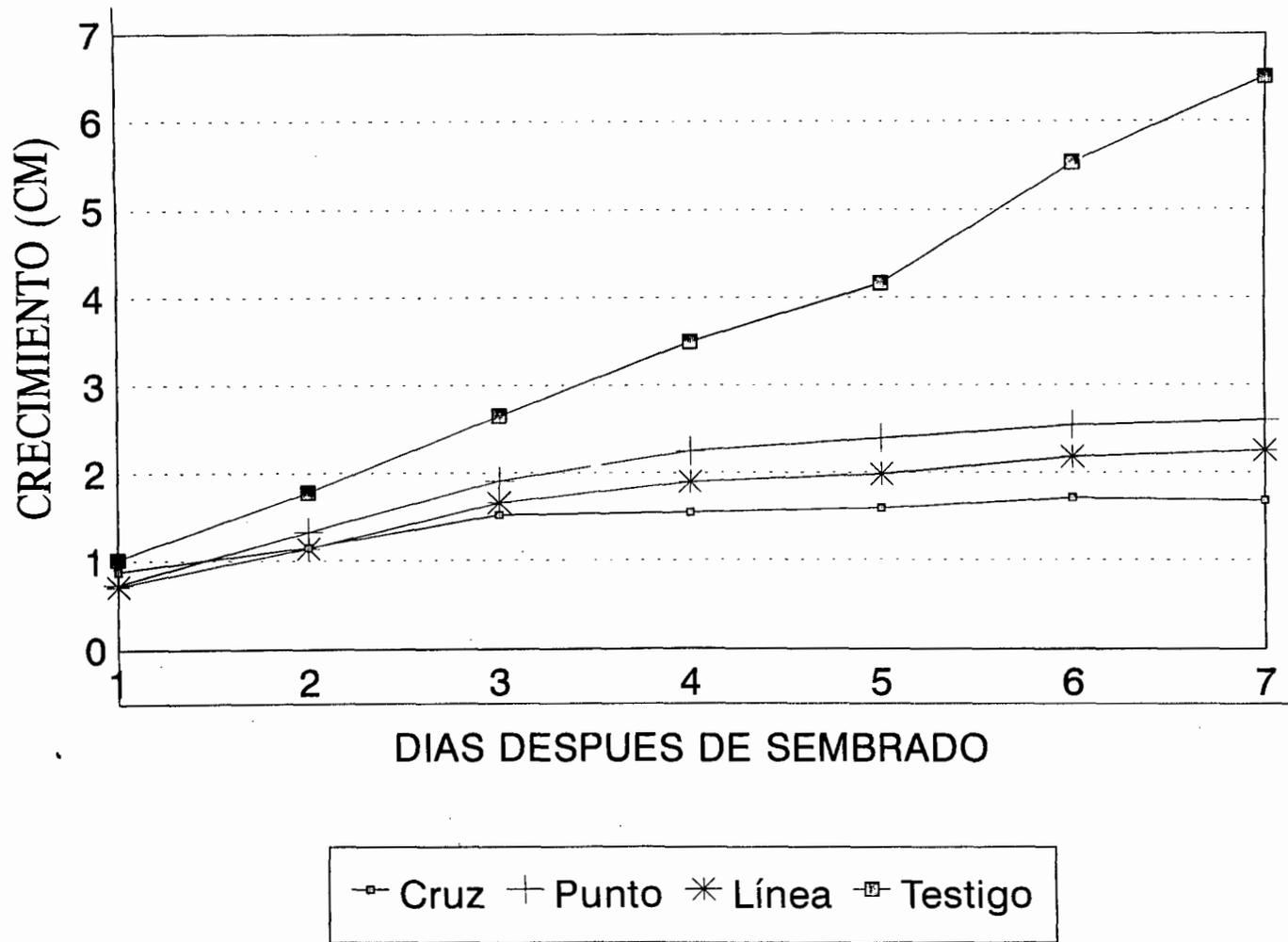


FIG. 5 Efecto del antagonismo de *Bacillus subtilis* sobre *Alternaria*.

### **Antibiosis *in vitro* sobre *Botrytis***

Los resultados del antagonismo de *Bacillus subtilis* sobre *Botrytis* se muestran en el cuadro 5 y la figura 6. Se observó el comportamiento del hongo durante cuatro días posteriores a su inoculación, de acuerdo a los diferentes tipos de siembra de la bacteria, obteniéndose para el testigo en el día uno un crecimiento de 3.3 cm, en la siembra en cruz 1.6 cm, en punto 2.39 cm y en línea 2.04 cm. En el día dos , el testigo mostró 5.5 cm; en comparación con la siembra en cruz que tuvo 1.77 cm, en punto 2.88 cm y en línea 3.89 cm. En el día tres , el testigo mostró 7.63 cm, el de cruz 1.78 cm, en punto 3.3 cm, en línea 5.35 cm . Y por último en el cuarto día el testigo cubrió completamente la caja (9.0 cm), en la siembra en cruz el crecimiento se detuvo (1.78 cm), lo mismo que en punto (3.33 cm), no así en la de línea que creció hasta los 6.26 cm, pero sin llegar a cubrir la caja .

El las observaciones microscópicas realizadas en el micelio de *Botrytis* afectado por *B. subtilis*, se mostró una reducción en el diámetro de las hifas en comparación con el testigo.

CUADRO 5. Resultado del Antagonismo de *Bacillus subtilis* a *Botritis*

TIPO DE SIEMBRA	DIAS DESPUES DE SEMBRADO				
	1	2	3	4	%**
Cruz	1.6*	1.77	1.78	1.78	19.7
Punto	2.39	2.88	3.3	3.33	37.0
Línea	2.04	3.89	5.35	6.26	69.5
Testigo	3.3	5.5	7.63	9.0	100

\* Crecimiento micelial en cm.

\*\* Crecimiento con respecto al testigo (100%).

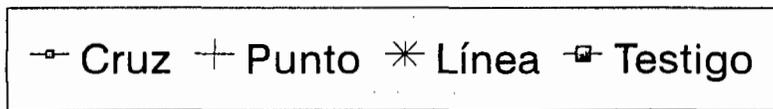
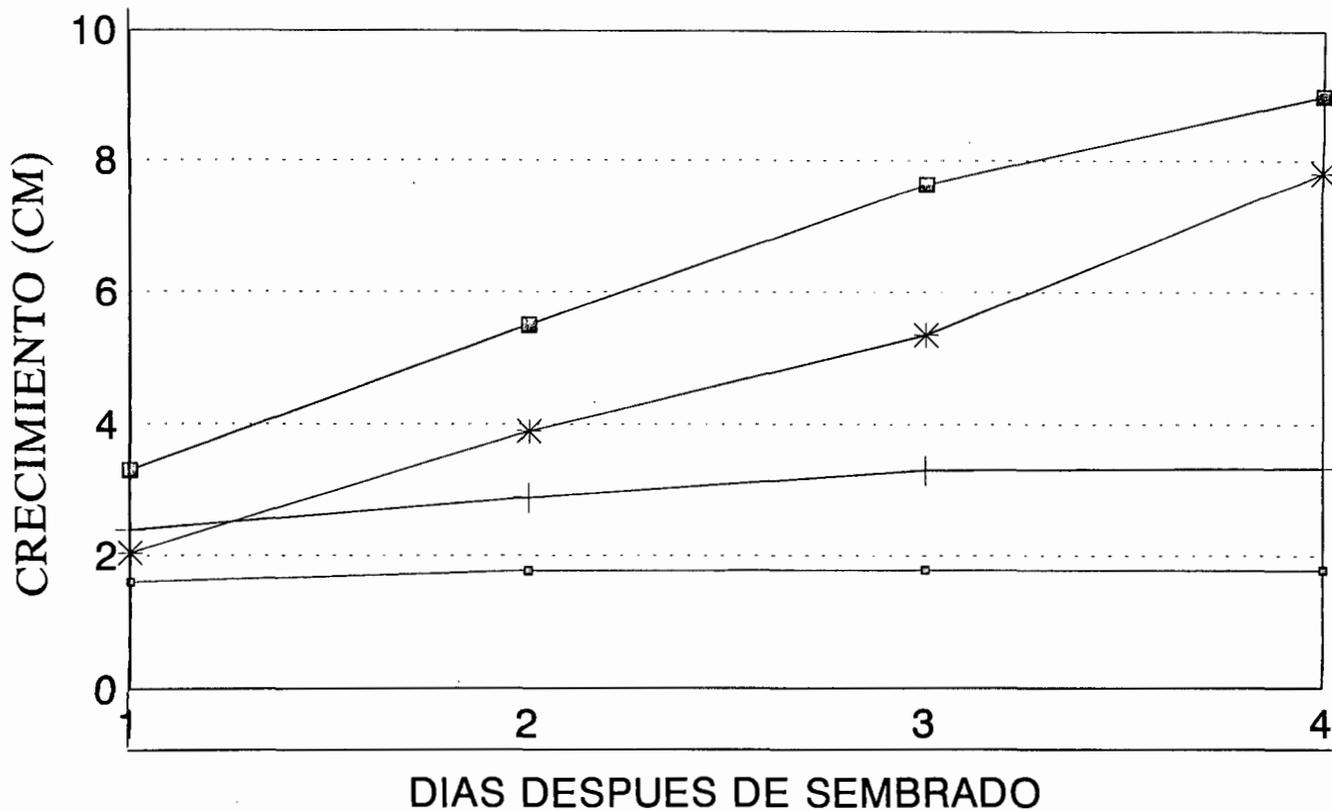


FIG. 6 Efecto del antagonismo de *Bacillus subtilis* sobre *Botrytis*.

### **Antibiosis *in vitro* sobre *Fusarium***

Los resultados obtenidos del crecimiento micelial de *Fusarium* en presencia de *Bacillus subtilis* se muestran en el cuadro 6 y en la fig. 7. El crecimiento micelial de *Fusarium* en los diferentes tipos de siembra de la bacteria se expresó en cm . Se observó el efecto antagónico de *B. subtilis* sobre *Fusarium* durante seis días consecutivos.

Para el testigo en el día uno tuvo un crecimiento micelial de 1.41 cm, en la siembra en cruz 1.03 cm, en punto 1.11 cm, y en línea 1.06 cm . Se observó que *Fusarium* tiene un crecimiento similar en la siembra en cruz durante los días cuatro, cinco y seis (2.78 cm, 2.85 cm, 2.93 cm). En el sexto día el testigo cubrió completamente la caja (9.0 cm); sin embargo, en cruz (2.93 cm), en punto (3.94 cm) y en línea (3.99 cm) no llegó a cubrir la caja, así mismo se observó que el efecto de inhibición del hongo en la siembra en punto (3.94 cm) es similar a la siembra en línea (3.99 cm).

En las observaciones microscópicas del micelio afectado por la bacteria, se mostró una reducción en la formación de los conidióforos del hongo.

CUADRO 6. Resultado del Antagonismo de *Bacillus subtilis* a *Fusarium*

TIPO DE SIEMBRA	DIAS DESPUES DE SEMBRADO						
	1	2	3	4	5	6	%**
Cruz	1.03*	2.23	2.49	2.78	2.85	2.93	32.5
Punto	1.11	2.12	2.93	3.65	3.84	3.94	43.7
Línea	1.06	2.41	2.81	3.43	3.72	3.99	44.3
Testigo	1.41	2.83	4.01	5.79	7.06	9.0	100

\* Crecimiento micelial en cm.

\*\* Crecimiento con respecto al testigo (100%).

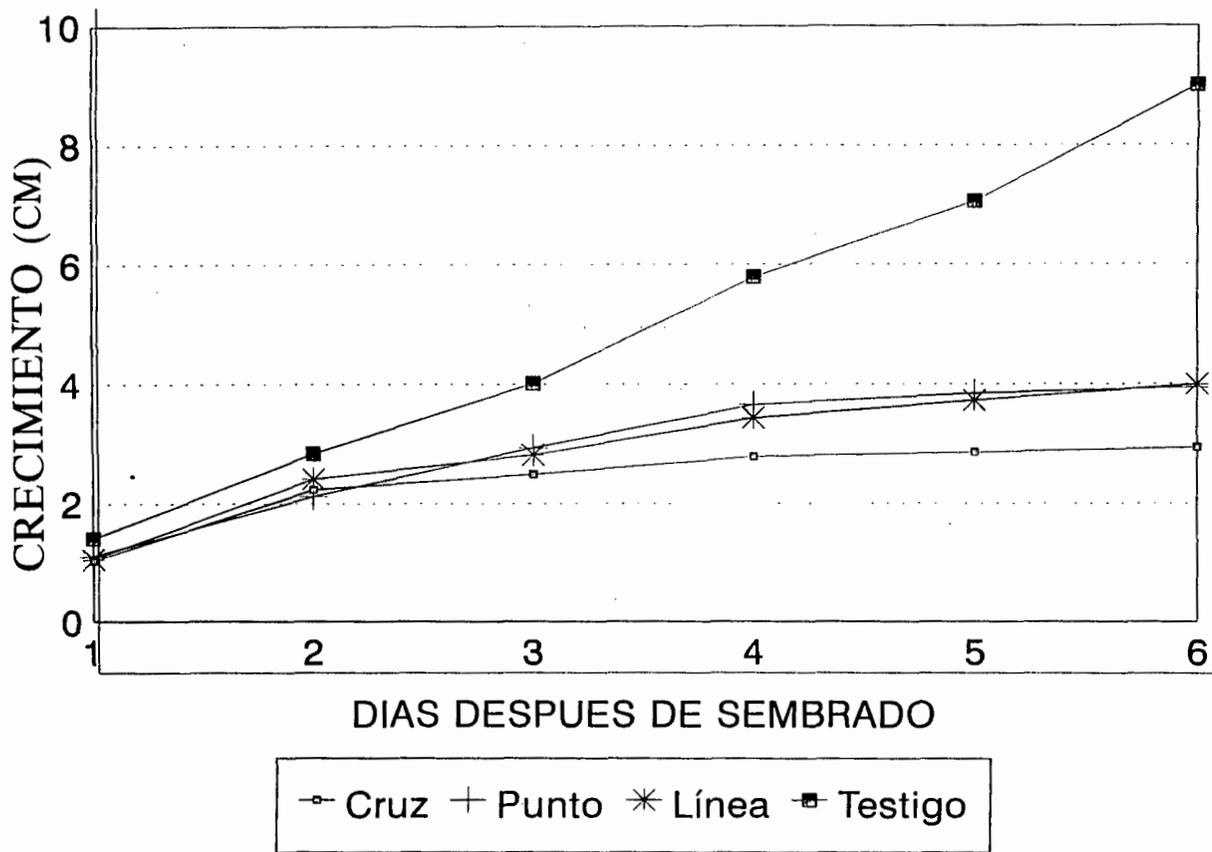


FIG. 7 Efecto del antagonismo de *Bacillus subtilis* sobre *Fusarium*

### ***Antibiosis in vitro sobre Rhizoctonia solani***

Los resultados sobre el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* en presencia de *Bacillus subtilis* se muestran en el cuadro 7 y en la fig. 8. Se puede observar que a partir del segundo día de sembrado el hongo, se mostró el efecto inhibitorio de *Bacillus subtilis*, en la siembra en cruz (1.24 cm), en línea (1.99 cm) y en punto (2.06 cm), en comparación con el testigo (2.3 cm). El día tres el crecimiento fue similar en la siembra en punto (2.65 cm) y en línea (2.67 cm). Del quinto al sexto día, el crecimiento de *Rhizoctonia solani* en la siembra en cruz fue mínimo (1.95 a 1.98 cm). y por último en el sexto día el hongo (testigo) cubrió totalmente la caja. mientras que en la siembra en cruz tuvo un crecimiento menor (1.98 cm), a diferencia de la siembra en punto (3.89 cm) y en línea (4.1 cm) que tuvieron un crecimiento mayor.

Las hifas de *R. solani*, afectadas probablemente por el antibiótico liberado de *B. subtilis*, mostraron reducción en el diámetro de las mismas, observación realizada también por Tschén en 1987. (Díaz, 1990).

CUADRO 7. Resultado del Antagonismo de *Bacillus subtilis* a *Rhizoctonia solani*

TIPO DE SIEMBRA	DIAS DESPUES DE SEMBRADO						%**
	1	2	3	4	5	6	
Cruz	0.8*	1.24	1.58	1.77	1.95	1.98	22.0
Punto	10.3	2.06	2.65	3.0	3.44	3.89	43.2
Línea	0.88	1.99	2.67	3.12	3.55	4.1	45.5
Testigo	0.86	2.3	3.72	5.33	7.33	9.0	100

\* Crecimiento micelial en cm.

\*\* Crecimiento con respecto al testigo (100%).

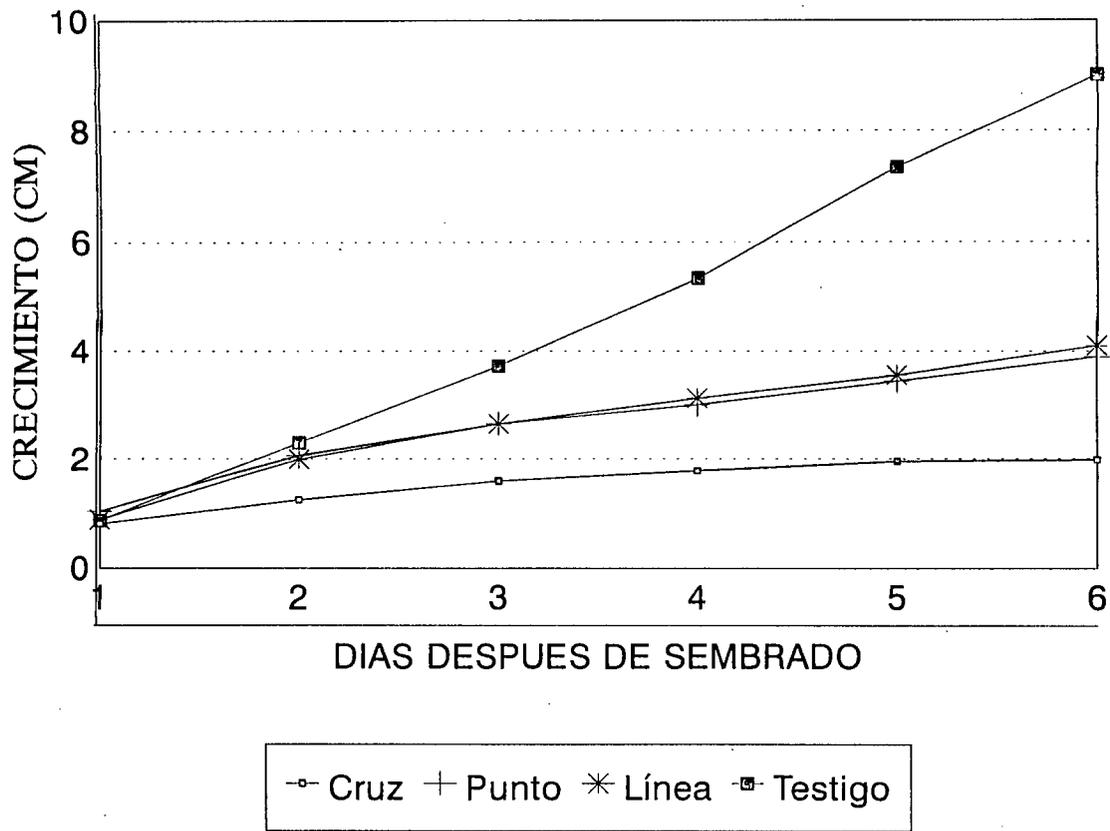


FIG.8 Efecto del antagonismo de *Bacillus subtilis* sobre *Rhizoctonia Solani*

## V. DISCUSION

Los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas mostradas en el cuadro 2, correspondieron con las características diferenciales de *Bacillus subtilis* (cuadro, 3).

Se observó que *B. subtilis* mostró acción antagónica sobre *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium*, y *Rhizoctonia solani*, misma observación hecha por Filippi (1985), quien encontró que *B. subtilis* fue activa *in vitro* sobre *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium* y *Rhizoctonia solani*. Así mismo, Herrera y Herrera (1983) encontraron que *Bacillus subtilis* inhibió *in vitro* a *Alternaria* y *Rhizoctonia*, mientras que Díaz, (1990) registró que *B. subtilis* inhibió moderadamente el crecimiento *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. El crecimiento de *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium* y *R. solani* en la siembra en cruz de *B. subtilis* fue menor que en la siembra en línea y en punto en el centro; esto puede ser debido a que en la siembra en cruz fue menor el espacio disponible para el desarrollo del hongo, mientras que en las otras siembras (línea y punto) el espacio es mayor y por lo tanto el crecimiento también, observación hecha también por Díaz (1990).

Así mismo se observó que *Botrytis* fue el hongo que presentó mayor inhibición, sin embargo, no se presentó en la siembra en línea, debido al mayor espacio que tiene para desarrollarse y el índice de crecimiento es mayor, en comparación con *Alternaria*, que tiene crecimiento lento. El halo de inhibición de los hongos aumenta probablemente cuando existe mayor producción de sustancias liberadas en el medio de cultivo por *Bacillus subtilis*, observación hecha también por Herrera y Herrera (1963) y Díaz (1990), éste último además encontró que la eficiencia de *B. subtilis* hacia *Fusarium oxysporum in vitro* es satisfactoria, no así en condiciones de invernadero en donde los resultados fueron variables. Sin embargo, el tamaño del halo de inhibición *in vitro*, puede no representar la eficiencia de inhibición *in vivo* Utkhedé, (1984).

Se observó una disminución en el diámetro de las hifas, lo que puede ser debido al efecto del antibiótico producido por la bacteria. Esta observación fue hecha también por Tschen (1987), quien además mencionó que la disminución se debe a una concentración de quitina en las hifas afectadas por el antibiótico.

## VI. CONCLUSIONES

- 1.- Se aisló e identificó *Bacillus subtilis* como antagonista a *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium*, y *Rhizoctonia solani* en pruebas de laboratorio.
- 2.- En la siembra en cruz fue menor el crecimiento micelial de los hongos mientras que en los otros tipos de siembra (línea y punto) fue mayor.
- 3.- *Botrytis* fue el hongo que presentó mayor inhibición en las pruebas de antagonismo, con respecto a los demás hongos.
- 4.- *Fusarium* fue el hongo que presentó menor inhibición con respecto a los demás hongos.
- 5.- Se necesita realizar trabajos de campo, con la finalidad de investigar si el antagonista es capaz de controlar las enfermedades ocasionadas por estos hongos.

## VII. LITERATURA CITADA

- Agrios, G.N., 1989. Fitopatología. Tercera edición. Limusa. México. 729 pp.
- Alexopoulos, J.C y C.W. Mims, 1979. Introductory Micology. Jonh Willey & Sons. Tercera edición. Nueva York. 632 pp.
- Arnold, E., 1992. The BMA guide to pesticides, chemicals and health. British Medical Association, Londres, 215 pp.
- Baker, R., Elad y B. Sneh, 1986. Physical, biological and host factors in iron competition in soils. In Iron, Siderophores and plant diseases. Ed. T R Swinburne. Nueva York. 77-84 pp.
- Barnett, L.H. y B.B. Hunter, 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Burges, Minneapolis. Tercera edición. 218 pp.
- Bauer, M.I., 1987. Fitopatología. Colegio de Postgraduados. Primera edición. Limusa. México. 345-346 pp.
- Breed, R.S., E.G.D. Murray, y N.S. Smith, 1957. Bergey's manual of determinative bacteriology. Baltimorte, the williams & wilkins company. Séptima edición. pp 620-622.
- Broadbent, P., K.F. Baker y Y. Waterworth, 1971. Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root phathogens in Australian soil. Austral. J. Biol. Sci. 24: 925-944.
- Burr, T.J., M.N. Schroth y T. Soslow, 1978. Increased potato yields by treatment of seed pieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. Phytopathology 68: 1377-1383.

- Casarrubias, U. y A.G. Frias, 1992. Evaluación de la eficiencia de *Bacillus subtilis* para el control de la marchitez de plántulas de Chile. Memorias del XIX Congreso Nacional de Fitopatología. Saltillo, Coah.
- Cook, J.R., 1985. Biological control of plant pathogens: Theory to application. *Phytopathology* 75: 25-29. Díaz, P.A., 1990. Antagonismo de *Bacillus subtilis* contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* y su eficiencia en el control del marchitamiento de la sandía en invernadero. Tesis Profesional. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coah. Méx. 34 pp.
- Filippi, C., G. Bagnoli, y G. Picci, 1985. Effetto antagonista di batteri terricoli su *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* Syd and Hans. II. Effetto antimicotico ad ampio spettro di un batterio del terreno nei reguardi di specie fitopatogene, oportunistiche e saprofite. *Agric. Ital.* 1/2: 27- 40.
- Filippi, C., G. Treggi y G. Picci, 1984. Antagonistic effects of soil bacteria on *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* Syd and Hans. I. *In vitro* experiments and preliminary assays on carnation (*Dianthus carioophyllus*) *Plant and Soil* 80: 119-125.
- Filippi, C., G. Bagnoli, M. Volterrani y G. Picci, 1987. Antagonistic effects of bacteria on *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* Syd and Hans. III. Relation between protection against *Fusarium*. Wilt in carnation and bacterial antagonistic colonization on roots. *Plant and Soil* 98: 161-167.
- Finch, H.C. y A.N. Finch, 1981. Los hongos comunes que atacan cultivos en América Latina. Segunda edición. Trillas. México. 188 pp.
- Fravel, R.T., 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Ann. Rev. Phytopathol* 26: 75- 91.
- Giano, C.S., R.E. García, S.G. Lugo, B.G. Felix, S.C. Aguin, A.E. Escamilla, L.A. Vega, 1976. Manual de Bacteriología Médica. Departamento de Bacteriología Médica y Veterinaria, Instituto Politecnico Nacional. Segunda edición. México. 100-105 pp.
- Herrera, C.M.A. y J.A. Herrera, 1963. Estudio de la actividad antibiótica del bacilo BHH frente a cepas de hongos patógenos de plantas cultivadas. *Fitófilo* 39: 37-47.

- León , G.H.M., 1982. Enfermedades de cultivos en el Estado de Sinaloa. Centro de Investigaciones Agrícolas del Pacífico Norte, INIA-SARH. México. 213 pp.
- Lewis, J.A y G.C. Papavizas, 1991. Biocontrol of plant diseases. The approach for tomorrow. *Crop protection* 10: 1304-1310.
- Loeffler, W., J.S.M. Tschen, N. Vanittanakom, M. Kugler, M. Knorp, T.G.Hesieh, y T.G., Wu., 1986. Antifungal effects of bacilysin and fengymycin from *B. subtilis* F.29-3. A comparasion with activities of other *Bacillus* antibiotics. *J. Phytopathol.* 115: 204-213.
- Mendoza, Z.C. y C.B. Pinto, 1983. Principios de fitopatología y enfermedades causadas por hongos. Universidad Autónoma de Chapingo. 240-286 pp.
- Merriman, P.R., R.D. Price, K.F. Baker, J.F. Kollmorgen, T. Piggot y E.H. Ridge, 1975. Effect of *Bacillus subtilis* and *Streptomyces* spp. applied to seed. *Aust. J. Agric. Res.* 25:219-26.
- Mew, W.T. y A.M. Rosales, 1986. Bacterization of rice plant for control sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 76: 1260-1264.
- Netzer, D., 1978. Physiological races and soil population level of *Fusarium* wilt of watermelon. *Physiological Parasitica* 4 (2): 131-136.
- Pusey, P.L. 1989. Use of *Bacillus subtilis* and related organisms as biofungicides. *Pestic. Sci.* 27: 133-140.
- Salle, A.J., 1965. Bacteriología. Segunda edición. Gustavo Gili. Barcelona. 497-500 pp.
- Schippers, B., A.W. Bakker y A.H. Bakker. 1987. Intractions of deleterius and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25: 339-312.
- Schroth, M.N y J.G. Hancock, 1982. Disease-suppressive soils and root colonizing bacteria. *Science* 21: 1376-13781.

- Stirling, G.R. y M.F. Wachtel, 1980. Mass production of *Bacillus penetrans* for the biological control of root knot nematodes. *Nematologica* 26: 308- 312
- Streets, B.R. 1978. The diagnosis of plant diseases. Univ. Arizona Press. Tucson Arizona. 11 pp.
- Sun, S.K. y J.W. Huang, 1985. Mechanism of control *Fusarium* Wilt diseases by amendment of soil with S-H mixture. *Plant. Prot. Bull.* 27: 159-169.
- Thirumalachar, M.J. y M.J O" Brien. 1977. Suppression of charcoal rot in potato with a bacterial antagonistic. *Plant Dis. Repr.* 61: 543-546.
- Thomashow, L.S. y D.M. Weller, 1988. Role a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biocontrol *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *J.Bacteri* 170: 3499-3500.
- Tschen, S.M. y W.L. Kuo. 1985. Antibiotic inhibition and control of *Rhizoctonia solani* by *Bacillus subtilis*. *Plan. Prot Bull.* 27: 95-103.
- Tschen, S.M. 1987. Control of *Rhizoctonia solani* by *Bacillus subtilis*. *Trans. Micol. Soc. Japan.* 28: 483-493.
- Utkhede. R.S., 1984. Antagonism of isolates of *Bacillus subtilis* to *Phytophthora cactorum*. *Can. Bot.* 62: 1032-1035.
- Velázquez, M.J.J.1991. Validación del control de la marchitez en sandía con *Bacillus subtilis* inoculada a la semilla. Cuarta Reunión Científica Forestal Agropecuaria. CIPAC. Jal. México.
- Virgen. C.G.1990. Control biológico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* ( E. F. smith ) Snyder & Hansen, con *Bacillus subtilis* en sandía bajo condiciones de campo. Tesis. Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coah. Xii + 63 pp.

Weller, D.M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 26: 379-407.

Zavaleta, M.E. 1987. Modificadores orgánicos en el manejo de enfermedades radicales. *Rev. Méx. Fitopatología* 5: 159-168.