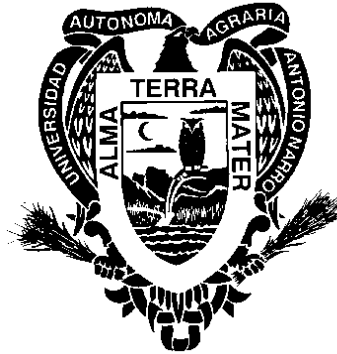


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA – DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



Efectividad biológica *in vitro* de *Bacillus sp* contra cenicilla polvorienta (*Erysiphe cichoracearum* D. C.) en calabacita (*Cucurbita pepo* L.) var. Zucchini Grey

POR:

MELCHOR PADILLA MEZA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Noviembre de 2010

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA – DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

Efectividad biológica *in vitro* de *Bacillus sp* contra cenicilla polvorienta (*Erysiphe cichoracearum* D. C.) en calabacita (*Cucurbita pepo* L.) var. Zucchini Grey

TESIS

POR:

MELCHOR PADILLA MEZA

QUE SOMETE A CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

ING. EN AGROBIOLOGÍA


A P R O B A D A

PRESIDENTE DEL JURADO


Dr. Gabriel Gallegos Morales

SINODAL

ASESOR PRINCIPAL EXTERNO
(Biorganix Mexicana S.A. de C.V.)


Ing. Efraín López Villarreal

SINODAL


M.C. Sofia Comparan Sánchez


Biol. María T. Ruiz De León

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE AGRONOMÍA


Dr. Mario Ernesto Vázquez Badillo



Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Noviembre de 2010

Agradecimientos

A Dios por permitirme estar aquí y ahora, por no dejarme nunca de su mano.

A la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro" por ser una institución humanitaria y maternal, por hacernos sentir sus hijos en nuestro paso por sus instalaciones. Por permitirme realizar mis estudios y ser un mejor mexicano. Por seguir siendo "El Alma Terra Mater" de todos aquellos que quieren superarse.

A la empresa BIORGANIX MEXICANA S.A. de C.V., por aceptarme dentro de su gran equipo de trabajo y permitirme realizar mi tesis de licenciatura dentro de sus instalaciones y brindarme la confianza y conocimientos que llevare siempre conmigo.

Al Dr. Gabriel Gallegos Morales, por brindarme su apoyo, disposición y asesoría en este trabajo. Por su paciencia, tiempo, comprensión y conocimientos brindados durante toda mi formación profesional.

Al Ing. Efraín López Villarreal, por haberme brindado su confianza, por la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo. Por sus conocimientos, tiempo y paciencia en su atenta labor como asesor en la realización de este trabajo.

A la M.C. Sofía Comparan Sánchez, por su valiosa participación como asesor de mi trabajo de tesis. Por su valioso tiempo y paciencia, por los conocimientos brindados durante mi formación profesional.

*A la Biol. **María T. Ruiz De León** por su valiosa participación como asesor de mi trabajo de tesis. Por su valioso tiempo y paciencia, por los conocimientos brindados durante mi formación profesional.*

A todos mis maestros que de una y mil maneras sembraron en mí sus conocimientos, se los agradeceré por siempre, buscare transmitirlos a los demás para que permanezcan y se sirvan de ellos como lo hice yo.

Dedicatoria

Dedicada a mis padres, Hilda Meza Nulutahua y Baltazar Padilla Lara, por ser ellos quienes me brindaron su confianza y confiaron en mi. Por brindarme lo mejor de ellos durante toda mi vida, por permanecer junto a mi en mis triunfos y fracasos, por ser ellos mis PADRES.

A la fuente de toda mi inspiración, mi familia, mi esposa Elizabet Ramírez Cano y a mi hija Meliza Yire Padilla Ramírez, por ser el motivo por el cual luchar cada día. Porque son el motor de mi vida, los que me impulsan a ser mejor, porque me brindan paz y la felicidad en este mundo donde todo es una competencia.

A mis hermanos Adriana Gandy Padilla Meza, Baltazar, Gabriel, Gloria Elena, y Jorge Emilio Padilla García, por ser pilares en mi vida, por su ayuda emocional, económica y de cualquier índole durante todo este tiempo.

A mis amigos Francisco A. Esquivel Sánchez, Virgilio de Jesús Velasco Ozuna, Ing. Roberto Canales Ruiz, Edwin, Eduardo, Jorge, Andrea, Pepe, Llym, Ariosto, Jorge Antonio, Sergio, Armando, por llenarme de gratos momentos al brindarme su apoyo confianza y conocimientos, durante toda mi formación profesional y porque seguirán formando parte de mi vida por siempre. A todos aquellos que en parte me regalaron su amistad y apoyo, los llevo en mi mente y corazón.

Dedicada a todas y cada una de las personas que me apoyaron y confiaron en mí...Gracias.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVO	3
3. HIPOTESIS	3
4. REVISIÓN DE LITERATURA	4
4.1. Descripción Botánica del cultivo	4
4.2. Importancia del cultivo	4
4.3. Enfermedades del cultivo	5
4.3.1 La cenicilla polvorienta (<i>Eryshiphe cichoracearum</i>)	5
4.3.2 Condiciones favorables para cenicilla polvorienta	6
4.3.3 Síntomas y daños	6
4.3.4 Manejo	7
4.3.5 Control químico	7
4.3.6 Agentes de control biológico para cenicilla polvorienta	8
4.3.7 Antecedentes del control biológico con <i>Bacillus</i>	9
5. MATERIALES Y MÉTODOS	12
5.1. Colecta del inóculo de cenicilla (<i>Eryshiphe cichoracearun</i>)	12
5.2. Metodología fase uno cultivo de los aislados de <i>Bacillus sp</i>	13
5.3. Medio nutritivo para hojas de calabacita	14
5.4. Bioensayo curativo de antagonismo a <i>Eryshiphe cichoracearun</i>	15
5.5. Bioensayo preventivo de antagonismo a <i>Eryshiphe cichoracearun</i>	16
5.6. Descripción de tratamientos	17
5.7. Variables evaluadas	18
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
6.1. Efecto curativo de <i>Bacillus sp</i> sobre <i>Eryshiphe cichoracearum</i> en hojas de calabacita	19
6.1.1. Incidencia	19
6.1.2. Numero de colonias	20
6.1.3. Diámetro de crecimiento colonial del patógeno	20
6.2. Efecto preventivo de <i>Bacillus sp</i> sobre <i>Eryshiphe cichoracearum</i> en hojas de calabacita.	23
6.2.1. Incidencia	23

6.2.2. Numero de colonias	24
6.2.3. Diámetro de crecimiento colonial del patógeno	25
7. CONCLUSIONES	28
8. ANEXOS	29
9. LITERATURA CITADA	35

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Control químico de cenicilla polvorienta	7
Cuadro 2. Soluciones modificadas de Hoagland	14
Cuadro 3. Tratamiento, prueba y producto	17
Cuadro 4. Incidencia de cenicilla polvorienta en la prueba curativa	29
Cuadro 5. Numero de colonias de cenicilla polvorienta al inicio de la prueba curativa	29
Cuadro 6. Numero de colonias de cenicilla polvorienta al final de la prueba curativa	29
Cuadro 7. Diámetro inicial del crecimiento colonial de cenicilla polvorienta para la prueba curativa	30
Cuadro 8. Diámetro final del crecimiento colonial de cenicilla polvorienta para la prueba curativa	30
Cuadro 9. Incidencia final de cenicilla polvorienta en la prueba preventiva	31
Cuadro 10. Numero final de colonias de cenicilla polvorienta para la prueba preventiva	31
Cuadro 11. Diámetro final del crecimiento colonial de cenicilla polvorienta para la prueba preventiva	31
Cuadro 12. Anova del diámetro final del crecimiento colonial de cenicilla polvorienta para la prueba curativa	32
Cuadro 13. Agrupamiento Tukey para diámetro final del crecimiento colonial de cenicilla polvorienta para la prueba curativa	32
Cuadro 14. Anova del diámetro inicial del crecimiento colonial de cenicilla polvorienta para la prueba curativa	32
Cuadro 15. Agrupamiento Tukey para diámetro inicial del crecimiento colonial de cenicilla polvorienta para la prueba curativa	32
Cuadro 16. Anova para número de colonias inicial de cenicilla polvorienta prueba curativa	33
Cuadro 17. Agrupamiento Tukey para número de colonias inicial de cenicilla polvorienta prueba curativa	33
Cuadro 18. Anova para número de colonias final de cenicilla polvorienta prueba curativa	33
Cuadro 19. Agrupamiento Tukey para número de colonias final de cenicilla polvorienta prueba curativa	33
Cuadro 20. Anova del diámetro inicial del crecimiento colonial de cenicilla polvorienta para la prueba preventiva	34
Cuadro 21. Agrupamiento Tukey para diámetro inicial del crecimiento colonial del patógeno para la prueba preventiva	34

Cuadro 22. Anova para número de colonias final de cenicilla polvorienta para la prueba preventiva 34

Cuadro 23. Agrupamiento Tukey para número de colonias final de cenicilla polvorienta para la prueba preventiva 34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Erysiphe cichoracearum</i>	6
Figura 2. Cultivos de <i>Bacillus</i> empleados en la investigación.	13
Figura 3. Cámaras de ensayo invitro para cenicilla polvorienta.	14
Figura 4. Cámara experimental de bioensayo para cenicilla polvorienta	17
Figura 5. Efecto de aislados de <i>Bacillus sp</i> sobre la incidencia de <i>Erysiphe cichoracearum</i> en hojas de calabacita	19
Figura 6. Control de cenicilla polvorienta por aislados de <i>Bacillus sp</i> en hojas de calabacita	20
Figura 7. Efecto de <i>Bacillus sp</i> sobre el crecimiento colonial de <i>Erysiphe cichoracearum</i> en hojas de calabacita	21
Figura 8. Testigo positivo para cenicilla polvorienta	22
Figura 9. Testigo negativo para cenicilla polvorienta	22
Figura 10. Control de cenicilla polvorienta por <i>Bacillus sp</i> aislado 23	22
Figura 11. Control de cenicilla polvorienta por <i>Bacillus sp</i> aislado 33	22
Figura 12. Control de cenicilla polvorienta por <i>Bacillus sp</i> aislado 72	23
Figura 13. Control de cenicilla polvorienta por <i>Bacillus sp</i> aislado 86	23
Figura 14. Control de cenicilla polvorienta por <i>Bacillus sp</i> aislado 22	23
Figura 15. Control de cenicilla polvorienta por <i>Bacillus sp</i> aislado 60	23
Figura 16. Comportamiento de aislados de <i>Bacillus sp</i> sobre la incidencia de <i>Erysiphe cichoracearum</i> en hojas de calabacita	24
Figura 17. Control de cenicilla polvorienta por aislados de <i>Bacillus sp</i> en hojas de calabacita	24
Figura 18. Efecto de <i>Bacillus sp</i> sobre el crecimiento colonial de <i>Erysiphe cichoracearum</i> en hojas de calabacita	25
Figura 19. Testigo negativo para cenicilla polvorienta	26
Figura 20. Testigo positivo para cenicilla polvorienta	26
Figura 21. Control de cenicilla polvorienta por <i>Bacillus sp</i> aislado 23	26
Figura 22. Control de cenicilla polvorienta por <i>Bacillus sp</i> aislado 33	26
Figura 23. Control de cenicilla polvorienta por <i>Bacillus sp</i> aislado 72	27

Figura 24. Control de cenicilla polvorienta por <i>Bacillus sp</i> aislado 86	27
Figura 25. Control de cenicilla polvorienta por <i>Bacillus sp</i> aislado 22	27
Figura 26. Control de cenicilla polvorienta por <i>Bacillus sp</i> aislado 60	27

RESUMEN

En México los cultivos de calabaza, melón, pepino y sandía, están dentro de los 20 principales por nivel de producción anual, en más de 2.5 millones de toneladas. La calabacita se encuentra en el lugar número 16 con una superficie sembrada de 31,738.24 has representando el 1.03 % del PIB agrícola para 2009. Sin embargo estos cultivos pueden presentar enfermedades como la denominada cenicilla polvorienta de las cucurbitáceas, una de las más importantes en campo. La familia más importante de estos hongos es: Erysiphaceae, donde se incluye a los géneros *Eryshiphe*, *Microsphaera*, *Phyllactinia*, *Podosphaera*, *Bremia*, *Peronospora*, *phaerotheca*, *Oidium* y *Uncinula*, entre otros. En el caso de la cenilla polvorienta *Erysiphe cichoracearum*, aparece como un polvo blanco en los tallos y en las hojas de las plantas. Este hongo ha adquirido resistencia a fungicidas químicos como benzimidazoles y hidroxipirimidinas, entre otros; se han desarrollado nuevas alternativas de control basadas en compuestos químicos, como: el bicarbonato de potasio, silicato de potasio, “cola de caballo”, extracto de semilla de neem, extracto de cascarilla de arroz, aceite de girasol aceite de oliva y aceite mineral, horticola además los fungicidas biológicos, como: *Tilletiopsis spp.*, *Ampelomyces quisqualis*, *Cladosporium sp.*, *Verticillium lecanii*, y *Acremonium alternatum*, entre otros. Este trabajo evaluó el efecto de seis aislados de *Bacillus sp* obtenidos de suelos del sureste de Coahuila, con el objetivo de encontrar antagonismo contra *Erysiphe cichoracearum*. Para evaluar los efectos se diseñaron dos bioensayos en modalidad de preventivo y curativo, para ello se colocaron hojas de calabacita (*Cucurbita pepo* Var. zucchini grey) sanas e infectadas con cenicilla en cámaras aisladas, con luz y temperatura controlada. El diseño experimental fue completamente al azar con 14 tratamientos y con tres repeticiones para cada uno. Las variables evaluadas fueron: incidencia, número de colonias y diámetro del crecimiento colonial del patógeno, expresado en porcentaje. Los aislados identificados como 23 y 33 para la variable incidencia fueron los que presentaron mayor control del hongo, en la modalidad curativa, con un 33.33%, para la variable número de colonias el aislado 33 fue el que presentó mayor control de la enfermedad 45%, respecto a la variable diámetro del crecimiento colonial del patógeno, el aislado 33 presentó un 63.9% de control de la enfermedad en comparación con el testigo absoluto. Para la modalidad preventivo, los aislados de *Bacillus* identificados como 23, 33 y 60, presentaron un control del 66.7% del patógeno para la variable incidencia, la variable número de colonias, el aislado 33 presentó el valor más alto en cuanto a control de la enfermedad con un 95.2% en comparación con el testigo absoluto, el aislado 23 obtuvo 92.1%, siendo este el que mejor control del patógeno presentó, para el caso de la variable crecimiento colonial del patógeno, el aislado 33 presentó una disminución del 80.3% siendo este el mejor resultado, el aislado 23 controló en un 76.0%, los aislados 60, 72 y 86 presentaron resultados del 71.6, 35.5 y 38.8% de control del patógeno en comparación con el testigo absoluto respectivamente. Shishkoff, McGrath. (2002) presentaron resultados similares donde aplicaron un biofungicida AQ10, el cual es un formulado de conidias de *Ampelomyces quisqualis*, no redujo significativamente el número de colonias de cenicilla (*Podosphaera xanthii*) pero si redujo la cantidad de inóculo producido en cada colonia. El mejor efecto curativo de los seis aislados probados en esta investigación fue presentado por el aislado 33. Por su parte el aislado 23 presentó disminución en cuanto a incidencia, número de colonias y diámetro del crecimiento colonial del patógeno cenicilla polvorienta, siendo este el segundo mejor aislado con efecto antagonista sobre *Erysiphe cichoracearum*. En cuanto al efecto preventivo el aislado 33 es el que mejor control presentó, superando al resto de los aislados evaluados.

Palabras clave: *Erysiphe cichoracearum*, *Bacillus*, incidencia, número de colonias, crecimiento colonial.

1. INTRODUCCIÓN

En México los cultivos de calabaza, melón, pepino y sandía, están dentro de los 20 principales por nivel de producción anual, más de 2.5 millones de toneladas. La calabacita se encuentra en el lugar número 16 con una superficie sembrada de 31,738.24 has representando el 1.03 % del PIB agrícola (SIAP, 2009). Sin embargo estos cultivos pueden presentar enfermedades como la denominada cenicilla polvorienta de las cucurbitáceas, una de las más importantes en campo. La cenicilla polvorienta es una plaga que afecta principalmente plantas de la familia de las cucurbitáceas. Provocando grandes pérdidas económicas cuando hay una infección masiva (Productores de hortalizas, 2005).

La familia de éste hongo más importante es: Erysiphaceae e incluye varios géneros: como los son *Eryshiphe*, *Microsphaera*, *Phyllactinia*, *Podosphaera*, *Bremia*, *Peronospora*, *Phaerotheca*, *Oidium* y *Uncinula* entre otros (Martínez, 2004). La cenilla polvorienta *Erysiphe cichoracearum*, es un hongo que aparece como un polvo blanco en los tallos y en las hojas de las plantas. El patógeno puede ser introducido por el viento en zonas de clima relativamente cálido donde pasa el invierno. El desarrollo de esta enfermedad es muy rápido, en condiciones de días cálidos y secos con noches frescas y húmedas. Este patógeno ataca el follaje y la superficie inferior de las hojas (Pohronezny y Stall, 1994). Provoca grandes pérdidas económicas cuando hay una infección masiva lo que ocasiona que los frutos maduren antes de tiempo (Productores de hortalizas, 2005).

Este hongo ha desarrollado resistencia a diferentes fungicidas químicos como benzimidazoles y hidroxipirimidinas, entre otros, por lo que se han desarrollado nuevas alternativas de control, como son, el bicarbonato de potasio, silicato de potasio, extracto de semilla de neem, extracto de cascarilla de arroz, aceite de girasol aceite de oliva y aceite

mineral hortícola son algunas alternativas orgánicas que actualmente son probados para el control de la cenicilla ya que son productos de origen natural (Sicarios, 2003). El biocontrol se considera también como una alternativa o suplemento para reducir el uso de agroquímicos. Éste se define como el empleo de microorganismos vivos para el tratamiento de las enfermedades de las plantas y se basa en el antagonismo que muchos microbios exhiben contra los patógenos (Shishkoff y McGrath, 2002), entre estos últimos se han descrito los más importantes: *Tilletiopsis spp.*, *Ampelomyces quisqualis*, *Cladosporium sp.*, *Verticillium lecanii*, y *Acremonium alternatum* (Bettiol *et al.*, 1997).

El presente trabajo evaluara el efecto de seis aislados de *Bacillus sp.* obtenidos a partir de suelos colectados del sureste de Coahuila con el objetivo de encontrar antagonismo contra *Erysiphe cichoracearum*. El efecto antagonista se debe principalmente a la producción de metabolitos de estos microorganismos (Bettiol *et al.*, 1997).

2. OBJETIVO

Evaluar el efecto antagónico in vitro de seis aislados de *Bacillus sp.* sobre la cenicilla polvorienta (*Erysiphe cichoracearun*)

3. HIPOTESIS

Al menos uno de los seis aislados de *Bacillus sp.* presentara efecto antagónico sobre la cenicilla polvorienta (*Erysiphe cichoracearun*)

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Descripción Botánica del cultivo

La calabacita pertenece a la familia Cucurbitaceae, que incluye cerca de 118 géneros y 825 especies (Lira *et al.*, 1998). Es un grupo de plantas rastreras o trepadoras, anuales o perennes y de flores unisexuales (con unos cuantos casos de bisexualidad) con ovario infero.

A nivel mundial esta familia es sumamente relevante, por ejemplo, muchas de sus especies están entre las plantas domesticas de mayor interés para el hombre ya que varias de ellas han sido parte fundamental de la dieta y otras facetas de la vida humana en todo el mundo; otras son especies silvestres de distribución muy restringida y algunas de ellas además están cercanamente relacionadas con las plantas cultivadas de importancia económica.

4.2. Importancia del cultivo

En México los cultivos de calabacita, melón, pepino y sandía, están dentro de los 20 principales por nivel de producción anual, más de 2.5 millones de toneladas cosechadas anualmente. La calabacita se encuentra en el lugar número 16 con una superficie sembrada de 31,738.24 has, representando el 1.03 % del PIB agrícola (SIAP, 2009). Sin embargo se pueden presentar enfermedades como las denominadas cenicillas, estas provocan grandes pérdidas económicas cuando hay una infección masiva lo que ocasiona que los frutos maduren antes de tiempo (Productores de hortalizas, 2005).

4.3. Enfermedades del cultivo

Sin embargo se pueden presentar enfermedades como las denominadas cenicillas, entre otras, estas afectan principalmente a plantas de la familia de las cucurbitáceas como melón, sandía, calabaza y pepino; es causada por hongos. La familia de éstos hongos más importantes es: Erysiphaceae e incluye varios géneros, entre otros *Eryshiphe*, *Microsphaera*, *Phyllactinia*, *Podosphaera*, *Bremia*, *Peronospora*, *phaerotheca*, *Oidium* y *Uncinula* (Martinez, 2004).

Este tipo de hongos se caracterizan por la formación de de manchas constituidas por masas de hifas polvorientas, mohosas y de un color que va del blanco al grisáceo, presentes en los tallos y en las hojas de las plantas. El patógeno puede ser introducido por el viento en zonas de clima relativamente cálido donde pasa el invierno. El desarrollo de la enfermedad es muy rápido, en una sucesión de tres días cálidos y secos con noches frescas y húmedas. Los patógenos primero infectan el follaje y la superficie inferior de las hojas (Pohronezny y Stall, 1994).

4.3.1 La cenicilla polvorienta (*Eryshiphe cichoracearum*)

El término “cenicilla polvorienta” se utiliza para una serie de enfermedades con síntomas similares causados por diferentes especies de hongos. Los más importantes son *Eryshiphe cichoracearum* y *Sphaerotheca fuliginea* (Bettiol *et al.*, 1997). Es una enfermedad ampliamente distribuida donde se cultivan cucurbitáceas. El hongo causante es parásito obligado (necesita del hospedero para desarrollarse) y el micelio se desarrolla sobre la superficie de los tejidos de la planta. Infecta directamente a través de la epidermis formando haustorios (órganos de alimentación) los cuales penetran hacia las células epidérmicas de los órganos de la planta, utilizando los nutrientes de las células como fuente de alimentación, disminuyendo la fotosíntesis, aumentando la respiración y transpiración de la planta, disminuyen su

crecimiento y reducen su productividad en ocasiones de un 20 a un 40 % (Agrios, 1999).

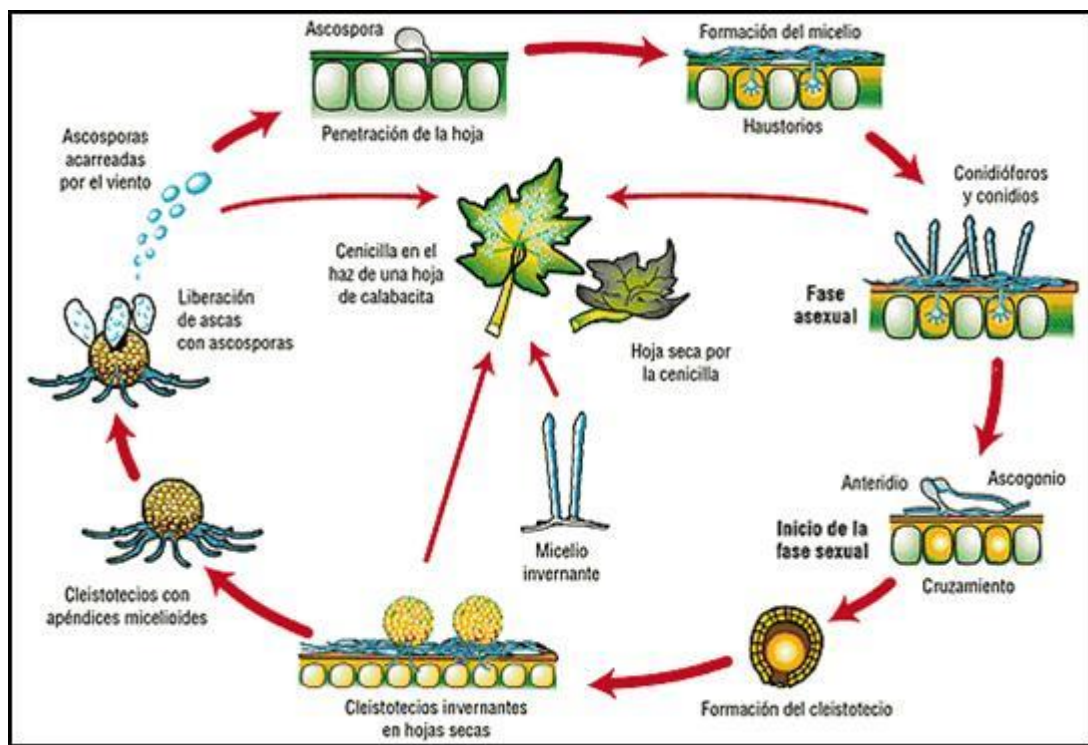


Figura 1. Ciclo biológico de *Erysiphe cichoracearum* (Glawe, 2008)

4.3.2 Condiciones favorables para cenicilla polvorienta

- Denso crecimiento de follaje en las plantas.
- Alta humedad relativa es favorable para la infección y sobrevivencia de conidias, pero la infección puede ocurrir a menos de 50 % de humedad relativa.
- La temperatura óptima es de 20-27 °C, en un rango de 10 a 32 °C.

(Productores de hortalizas. 2005)

4.3.3 Síntomas y daños

Inicialmente se observan en el envés de las hojas manchas cloróticas muy tenues y posteriormente colonias de aspecto polvoso (conidias y conidioforos). Las estructuras pueden cubrir haz y envés,

extendiéndose a pecíolos y tallos. Las hojas con infección severa se tornan amarillentas al avanzar la enfermedad y sobreviene la defoliación. La apariencia polvosa la proporciona el micelio y las esporas presentes en la superficie de las áreas afectadas. Las plantas con tallos dañados se tornan cloróticas y achaparradas. Los frutos presentan daños por quemadura de sol debido a la falta de follaje. Considerando la capacidad reproductiva del patógeno, puede cubrir completamente el follaje en una semana, afectando así el proceso de fotosíntesis (productores de hortalizas. 2005).

4.3.4 Manejo

La primera recomendación es el uso de variedades con tolerancia a esta enfermedad (Boiteux *et al.*, 1995). Evitar condiciones que promuevan un crecimiento succulento, como sería una excesiva fertilización. La aplicación repetida de soluciones de azufre en el cultivo reduce el desarrollo de hongos fitopatógenos (Kimati *et al.*, 1980). Asimismo la utilización de funguicidas preventivos y curativos (Kimati *et al.*, 1986), sería otra recomendación necesaria para evitar daños graves al cultivo.

4.3.5 Control químico

Los principales compuestos activos registrados para el control de cenicienta polvorosa se muestran en el siguiente cuadro:

Cuadro 1. Control químico de cenicienta polvorosa

Control	Dosis	Nombre comercial
Azufre elemental	2.0-3.0 L/ha	AZUFRE-71. AGR. NAL. JALISCO
Sulfato de cobre pentahidratado	3-5 kg/ha	COMET ^{MR} DERMET

Hidróxido cúprico	2.0-2.5 L/ha	Cuperhidro GBM
Oxicloruro de cobre	2-3 kg/ha	CUPERQUIMM SUPER ^R QUIMICA DE COBRE
Sulfato tribásico de cobre	3.0-4.0 kg/ha	Cuperquimm/Trioxil ^R QUIMICA DE COBRE
Clorotalonil	1.75-2.5 kg/ha	BLANCO 750. MEZFER
Myclobutanil	114-228 g/ha	RALLY 40W. DOW AGROSCIENCES
Fosetil-al	2.5 kg/ha 2.0-3.0 kg/ha	ALIETTE ^{MR} WDG PH BAYER ALLEATO ^R . HELM
Azoxistrobin	200 a 300 g/ha	AMISTAR ^R SYNGENTA
Benomilo	0.3-0.5 kg/ha	ANAMILO 50% PH. AGR. NAL. JALISCO
Benomilo	400-600 g/ha	ANTRAK 500 PH. AGR. TRIDENTE
Bupirimato	0.4-0.8 L/ha	Nimrod 25 ec. KOOR
Triadimefon	0.35 a 0.5 kg/ha	BAYLETON ^R 25% PH BAYER CROPSCIENCE

(Thomson. 2004)

4.3.6 Agentes de control biológico para cenicilla polvorienta

Uno de los métodos para el control de esta enfermedad es el biocontrol, ya que es una alternativa para reducir el uso de agroquímicos. Éste se define como el uso de microorganismos vivos para el tratamiento de las enfermedades de las plantas y se basa en el antagonismo que muchos microbios exhiben contra los patógenos (Shishkoff y McGrath, 2002).

Dentro de este control, se manejan dos tipos: El control por medio de extractos vegetales y control microbial.

El control por medio de extractos vegetales según, Goel, *et al.* 2003; menciona dos alcaloides (alpha-hydrastina y beta-hydrastina), aislados de *Corydalis longipes*, presentan efecto de inhibición sobre el

desarrollo y germinación de conidias del hongo causante de cenicilla *Erysiphe pisi* sobre hojas de chicharo, la mayor inhibición es a una concentración de 200 ppm de alpha-hydrastina.

Shishkoff y McGrath. (2002) aplicaron un biofungicida AQ10 el cual es un formulado de conidias de *Ampelomyces quisqualis*, no redujo significativamente el numero de colonias de cenicilla (*Podosphaera xanthii*) pero si redujo la cantidad de inóculo producido en cada colonia. Dentro de este tipo de control también se mencionan otros por ejemplo *Tilletiopsis spp.* (Hijwegen, 1992; Urquhart *et al.*, 1994), *Ampelomyces quisqualis* (Falk *et al.*, 1995), *Cladosporium sp.* (Minuto *et al.*, 1991), *Verticillium lecanii* (Verhaar y Hijwegen, 1993), y *Acremonium alternatum* (Malathrakis, 1985).

Mecanismos de acción de los microorganismos antagonicos (Agrios, 1999).

1. Parasitismo directo y muerte del patógeno
2. Competencia con el patógeno por el alimento
3. Efectos tóxicos directos sobre el patógeno por medio de sustancias antibióticas liberadas por el antagonista
4. Efectos tóxicos indirectos sobre el patógeno por sustancias volátiles, como el etileno, liberadas por actividades metabólicas del organismo antagonista

El control biológico tiene la ventaja sobre otros métodos, de no causar contaminación ni disturbios ecológicos, tener un bajo costo, ser de fácil aplicación, no ser toxico para el hombre y tener un efecto prolongado de protección.

4.3.7 Antecedentes del control biológico con *Bacillus*

De la Garza (1996) menciona que a una concentración de 1014 bact/ml disminuye en un 50.74% el daño ocasionado por *Rhizoctonia solani* en papa.

Bettiol *et al.*, (1997) reportaron que la Aplicación de la concentración de metabolitos de *Bacillus subtilis* (CMBS) (5.000 mg / mL) 24 h antes o después de la inoculación de *Sphaerotheca fuliginea* (3 x 10⁴ conidias / ml) redujo el número de lesiones en las hojas de pepino en un 90-99%.

Shishkoff y McGrath (2002), determinaron que el biofungicida AQ10 (una formulación de conidias de *Ampelomyces quisqualis*), no reducen significativamente el tamaño de las colonias de cenicilla polvoriento (*Podosphaera xanthii*), pero reducen la cantidad de inóculo producida por cada colonia.

Romero *et al.*, (2003) evaluaron las posibilidades de explotación de varios hongos micoparásitos, en el biocontrol de moho polvoriento de las cucurbitáceas (*Sphaerotheca fusca*) en invernaderos de melón. Resultados muestran que, bajo condiciones ambientales controladas, *Acremonium alternatum*, *Ampelomyces quisqualis*, *Lecanicillium lecanii* cuando se aplican en las primeras etapas de la infección, fueron capaces de reducir significativamente los síntomas y el desarrollo de *S. fusca* en hojas de melón. Estos resultados indican que estos micoparásitos, son candidatos prometedores para el control biológico del moho polvoriento en melón bajo condiciones de invernadero.

De la Garza (2004) al evaluar la efectividad biológica in Vitro de 57 cepas del género *Bacillus* contra los hongos *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* (patógenos asociados a la marchitez del chile) obtuvo resultados de inhibición de 25.46% (B-13) a 41.1% (B-1) contra *P. capsici*, de 19.56% (B-8) a 38.31% (B-5) contra *R. solani* y de 14.47% (B-11) a 31.83% (B-12) contra *F. oxysporum*.

Romero *et al.*, (2004) evaluaron la posibilidad de explotar bacterias antagónicas en el control biológico del moho polvoriento de las cucurbitáceas *Podosphaera fusca*. Entre una colección de cepas bacterianas aisladas de distintas plantas enfermas y de los suelos, se seleccionaron cuatro cepas, por medio de un método de detección

basado en la producción de antibióticos, e identificados como *Bacillus* spp. Estas cepas han demostrado ser eficaz en el control del moho polvoriento de las cucurbitáceas en hojas de plántulas separadas *in vitro*, ensayos de biocontrol mostraron reducción de la gravedad de la enfermedad hasta en un 80%.

Guillén *et al.*, (2006) analizaron el potencial de biocontrol en campo de cuatro aislados de *Bacillus* y la mezcla de éstos (B1, B3, B9 y B13) sobre los patógenos causantes de pudriciones de raíz, así como su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de chile. La aplicación de las bacterias incrementó la altura de la planta en 20% y el rendimiento al final del cultivo en 270%; también, se redujo la incidencia en 80% y severidad de pudrición de raíz en 39% respecto al testigo.

Romero *et al.*, (2007) estudiaron; Iturin y Fengycin familias de Lipopeptidos como factores clave en el antagonismo de *Bacillus subtilis* hacia *Podosphaera fusca*, concluyeron que el iturin y fengycin familias de lipopeptidos tienen un papel importante en el antagonismo de *B. subtilis* hacia *P. fusca*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

La prueba fue establecida en el laboratorio de físicoquímicos de la empresa Biorganix Mexicana S. A. de C. V., ubicado en la ciudad de Ramos Arizpe, Coahuila, México, a 1400 msnm.

5.1. Colecta del inóculo de cenicilla (*Erysiphe cichoracearun*)

La primera parte del método experimental consistió en colectar el inóculo de cenicilla que se realizó durante el mes de agosto de 2008, se colectaron hojas de melón en los municipios de Paila y Matamoros Coahuila, Mexico. Las hojas mostraban lesiones de la enfermedad y sirvieron para identificar las estructuras fúngicas presentes.

Una vez colectadas las hojas infestadas con la enfermedad, se tomaron muestras de estas hojas y se inocularon en plantas sanas adultas de melón, pepino y calabacita, las cuales se encontraban en el área experimental de la empresa Biorganix Mexicana S.A. de C.V. Esto con la finalidad de propagar el hongo *Erysiphe cichoracearun* y poder tener una mayor fuente de inóculo (hojas enfermas).

De las lesiones donde se obtuvo esporulación se realizaron montajes para registrar la morfología y realizar mediciones de las conidias presentes.

Para el ensayo *in vitro* se diseñaron dos pruebas una curativa y una preventiva.

5.2. Metodología fase uno cultivo de los aislados de *Bacillus sp*

Se siguieron dos pruebas: el tratamiento curativo y preventivo, en las que se emplearon los aislados 22, 23, 33, 60, 72 y 86 de *Bacillus sp* con que cuenta la empresa BIORGANIX MEXICANA SA de CV y que demostraron resultados positivos sobre el control de otros hongos fitopatógenos como *Fusarium* y *Alternaria*.



Figura 2. Cultivos de *Bacillus* empleados en la investigación.

Antes de realizar los bioensayos preventivo y curativo se prepararon los aislados: Primero de los cultivos en caja Petri con agar nutritivo; se tomaron tres asadas y se pasaron a un tubo con 5 ml del medio "T8 de la empresa", se incubaron en agitación (150 rpm) a 30-33°C durante 24 horas y al final de este periodo se transfirieron los 5 ml a matraces Erlenmeyer de 125 ml con 50 ml del medio de cultivo y se incubaron en las mismas condiciones.

Paralelamente a las pruebas curativa y preventiva se realizó una conteo y calculo de esporas por mililitro (esp/mL) mediante la metodología de la técnica de dilución seriada y plaqueo en cajas con agar nutritivo (Demian *et al.*, 1986), para obtener una suspensión de 1×10^8 esp/mL de cada uno de los aislados. Todas las pruebas se realizaron en el laboratorio de microbiología de dicha empresa, bajo condiciones estériles en campana de flujo laminar.

5.3. Medio nutritivo para hojas de calabacita

Para el desarrollo de estas pruebas se utilizó el mismo diseño de cámaras de Shishkoff y McGrath, 2002, se utilizó una solución acuosa a base de nutrientes esenciales para hidroponía compuesta de la siguiente manera:

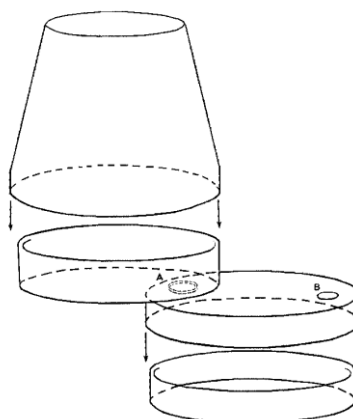


Figura 3. Cámaras de ensayo invitro para cenicienta polvorienta.

Cuadro 2. Soluciones modificadas de Hoagland

Macronutrientes					
Compuesto	Peso molecular gr / litro Vol en cm ³ /litro Elemento				Conc final en ppm
KNO ₃	101.1	101.1	6	N	224
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	236.16	236.16	4	K	235
NH ₄ H ₂ PO ₄	115.08	115.08	2	Ca	160
MgSO ₄ .7H ₂ O	246.49	246.49	1	P	62
				S	32
				Mg	24
Micronutrientes					
Compuesto	Peso molecular gr/litro Vol en cm ³ /litro Elemento				Conc final en ppm
KCl	74.55	3.728		Cl	1.77
H ₃ BO ₃	61.84	1.546		B	0.27
MnSO ₄ .H ₂ O	169.01	0.338	1	Mn	0.11
ZnSO ₄ .7H ₂ O	287.55	0.575		Zn	0.131
CuSO ₄ .5H ₂ O	249.71	0.125		Cu	0.032
H ₂ MoO ₄ (85% MoO ₃)	161.97	0.081		Mo	0.05
Fe-Quelato	346.08	6.922	1	Fe	1.12

(Llanos, 2001)

Con esto se logró mantener a la hoja por más de 7 días viva.

5.4. Bioensayo curativo de antagonismo a *Erysiphe cichoracearum*

Se llevo acabo de la siguiente manera:

1. Se sembraron semillas de calabacita variedad zucchini grey en macetas de 1.7 litros con una mezcla de sustrato de peat most (20%), perlita (20%), sustrato de jardín (20%), arena de río (20%) y lumbricomposta (20%).
2. Se mantuvieron en invernadero con riegos constantes con agua de la llave (la temperatura promedio del invernadero de 18 – 38°C).
3. Después de 20-25 días las plantas se inocularon con esporas de cenicilla.
4. Se mantuvieron las condiciones de humedad y altas temperaturas en el invernadero para que al término de 5 días se presenten síntomas del contagio de la enfermedad (halos de micelio blanco).
5. Se cortaron 3 hojas de calabacita por tratamiento, tomando 3 cm desde la base del pecíolo, los criterios de selección fueron: presencia del desarrollo de la enfermedad (Nº de colonias y diámetro de crecimiento del micelio) para tener tratamientos homogéneos.
6. Se prepararon los materiales para las cámaras de tratamiento, a base de, tapas de cajas Petri, recipientes para gelatinas y vasos de plástico transparentes. Todos sanitizados por medio de luz UV.
7. Cada cámara de tratamiento contó con aproximadamente 90 ml de líquido (Soluciones modificadas de Hoagland).
8. Antes de colocar las hojas en las cámaras se aplicaron, mediante aspersión, los tratamientos de las bacterias a evaluar.
9. Se colocó la hoja en la cámara de tratamiento.
10. Se colocó el vaso de plástico transparente.
11. Se selló con cinta adhesiva.
12. Por último se dejó incubando a temperatura ambiente con fotoperiodos de 16 horas de luz por 8 de oscuridad en una campana de flujo laminar (Shishkoff y McGrath, 2002).
13. Se colocaron testigos negativos (sin tratamiento, sin inóculo) y testigos positivos (sin tratamiento, pero con presencia de la enfermedad).

5.5. Bioensayo preventivo de antagonismo a *Erysiphe cichoracearum*

1. Se sembraron semillas de calabacita variedad zucchini grey en macetas de 1.7 litros con una mezcla de sustrato de peat most (20%), perlita (20%), sustrato de jardín (20%), arena de río (20%) y lumbricomposta (20%).
2. Se mantuvieron en invernadero con riegos constantes con agua de la llave (la temperatura promedio del invernadero de 18 – 38°C).
3. Después de 20-25 días aproximadamente las plantas contaban con mínimo 4 hojas verdaderas para realizar el ensayo.
4. Se cortaron 3 hojas de calabacita por tratamiento, tomando 3 cm desde la base del pecíolo, los criterios de selección fueron: tamaño (5 cm de largo por 5 cm de ancho aproximadamente), el color y apariencia más vigorosos de las hojas.
5. En la campana de flujo laminar se lavaron las hojas con agua estéril para eliminar por arrastre las partículas superficiales.
6. Se prepararon los materiales para las cámaras de tratamiento, a base de, tapas de cajas Petri, recipientes para gelatinas y vasos de plástico transparentes. Todos sanitizados por medio de luz UV.
7. Cada cámara de tratamiento contó con aproximadamente 90 ml de líquido (Soluciones modificadas de Hoagland).
8. Antes de colocar las hojas en las cámaras se aplicaron, mediante aspersión, los tratamientos de las bacterias a evaluar.
9. Se colocó la hoja en la cámara de tratamiento.
10. Se inocularon las hojas de calabacita con esporas de cenicilla provenientes de una hoja enferma. La inoculación con cenicilla fue colocando un pequeño número de conidias (15 a 20) en seis sitios utilizando un pequeño pincel de pelo de camello.
11. Se colocó el vaso de plástico transparente.
12. Se selló con cinta adhesiva.
13. Se dejó incubando a temperatura ambiente con fotoperiodos de 16 horas de luz por 8 de oscuridad en una campana de flujo laminar (Shishkoff y McGrath, 2002).

14. Se colocaron testigos negativos (sin tratamiento, sin inóculo) y controles positivos (sin tratamiento, pero con inóculo).



Figura 4. Cámara experimental de bioensayo para cencilla polvorienta

5.6. Descripción de tratamientos

Los tratamientos se establecieron de la siguiente manera:

Cuadro 3. Tratamiento, prueba y producto

Tratamiento	Prueba	Producto
T ₁	Preventivo	Aislado 22
T ₂	Curativo	Aislado 22
T ₃	Preventivo	Aislado 23
T ₄	Curativo	Aislado 23
T ₅	Preventivo	Aislado 33
T ₆	Curativo	Aislado 33
T ₇	Preventivo	Aislado 60
T ₈	Curativo	Aislado 60
T ₉	Preventivo	Aislado 72
T ₁₀	Curativo	Aislado 72
T ₁₁	Preventivo	Aislado 86
T ₁₂	Curativo	Aislado 86
T ₁₃	Testigo negativo	Sin aplicación de producto y sin aplicación de inóculo
T ₁₄	Testigo positivo	Sin aplicación de producto y con aplicación de inóculo

5.7. Variables evaluadas

- **Incidencia:** se contaron las hojas que presentaban síntomas de la enfermedad. Para la prueba curativa todas las hojas estaban enfermas en el tiempo inicial y para la prueba preventiva las hojas estaban libres de la enfermedad al inicio de la prueba.
- **Numero de colonias:** para el caso de la prueba curativa se contaron el número de colonias por hoja, al inicio de la prueba y al final; para el caso de la prueba preventiva nada más se contaron las colonias presentes de cenicilla la final de la prueba.
- **Diámetro del crecimiento colonial del patógeno:** se midieron con la ayuda de un vernier, 5 colonias por repetición, un total de 15 colonias por tratamiento, y se promedió para obtener un valor más homogéneo de los diámetros del halo de crecimiento colonial. Para el caso de la prueba curativa; para el caso de la prueba preventiva el diámetro de crecimiento de las colonias se midió al final de la prueba de la misma manera. Midiendo el halo de las colonias por sus polos, con estos datos se promedió el tamaño del alo del micelio.

Para el análisis estadístico se utilizó un diseño completamente al azar, ya que al desarrollar el experimento en el laboratorio las condiciones eran homogéneas para cada unidad experimental. El experimento consto de 14 tratamientos y tres repeticiones por tratamiento dando un total de 42 unidades experimentales.

Las variables que se ajustaron a una distribución normal, fueron sometidas a un análisis de varianza para determinar si al menos un tratamiento fue diferente de los demás (ANOVA, $\alpha = 0.05$). Posteriormente los datos se sometieron a una prueba de comparación múltiple de medias para determinar diferencias significativas entre ellas utilizando la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$), con el paquete estadístico statistical analysis system (SAS).

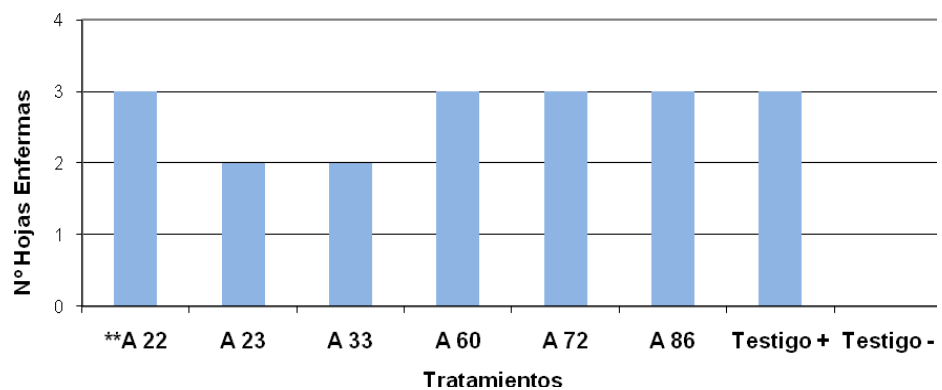
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos se presentan por separado para cada modalidad de bioensayo (curativa y preventiva).

6.1. Efecto curativo de *Bacillus* sp sobre *Erysiphe cichoracearum* en hojas de calabacita

6.1.1. Incidencia

La evaluación de los aislados 23 y 33 de *Bacillus* sp, presentaron, en comparación con el testigo positivo (enfermo) una reducción de un 33.33% de cenicienta polvorienta (*Erysiphe cichoracearum*), y destacar que el testigo negativo (libre de la enfermedad) la incidencia de cenicienta es nula (figura 5).

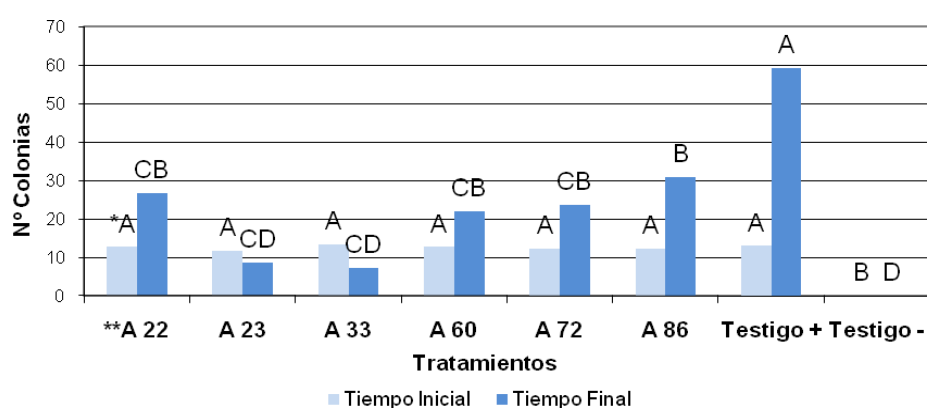


**Aislados de *Bacillus* sp

Figura 5. Efecto de aislados de *Bacillus* sp sobre la incidencia de *Erysiphe cichoracearum* en hojas de calabacita

6.1.2. Numero de colonias

Por su parte el aislado 23 mostró un control del 85 % en comparación con el testigo, para el aislado 33 el control fue de 88 % siendo este el que mejor control de la enfermedad presentó comparándolo con el testigo. Estadísticamente los aislados 22, 23, 33, 60 y 72 no presentaron diferencias significativas entre tratamientos, mas sin embargo si presentaron diferencias significativas en comparación con el testigo (figura 6).



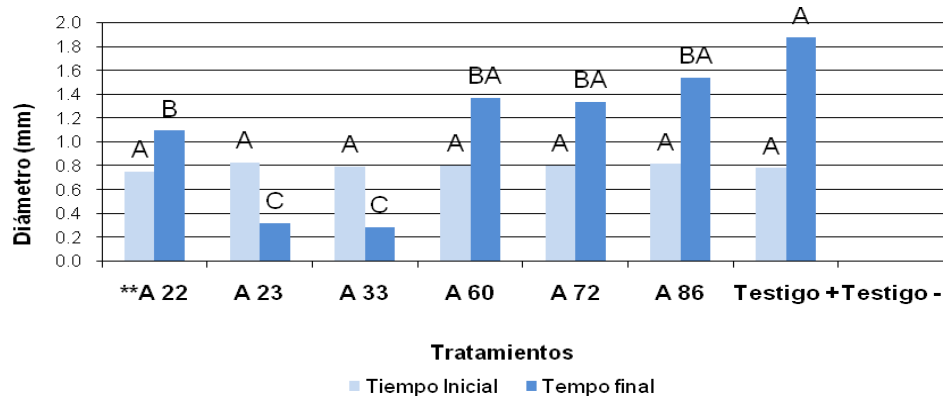
*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

**Aislados de *Bacillus* sp

Figura 6. Control de cenicilla polvorienta por aislados de *Bacillus* sp en hojas de calabacita

6.1.3. Diámetro de crecimiento colonial del patógeno

El diámetro promedio general del crecimiento colonial del patógeno para los tratamientos evaluados en el T₀ fue de 0.8 mm, estadísticamente no presentaban diferencias entre los tratamientos (figura 7). Por su parte el aislado 33 presentó un control del 84.7%, para el caso del aislado 23 el control fué del 82.9%, en comparación con el testigo, siendo estos los tratamientos que presentaron diferencias estadísticas significativas para el control de este patógeno. Estos dos aislados mencionados anteriormente fueron los únicos que presentaron disminución en el crecimiento de la cenicilla polvorienta (*Erysiphe cichoracearum*).



*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.
 **Aislados de *Bacillus sp*

Figura 7. Efecto de *Bacillus sp* sobre el crecimiento colonial de *Erysiphe cichoracearum* en hojas de calabacita

Romero *et al.*, (2004) evaluaron cuatro cepas, por medio de un método de detección basado en la producción de antibióticos, e identificados como *Bacillus spp*. Estas cepas demostraron ser eficaces en el control del moho polvoriento de las cucurbitáceas *Podospaera fusca*, reduciendo en un 80% la gravedad de la enfermedad.

Por su parte en el testigo positivo (figura 8), se logra que la infección persista durante el tiempo de incubación, las hojas mostraron deterioro, además de una alta infección del patógeno. Posteriormente al periodo de incubación el testigo negativo permaneció sano, presentó buena coloración y turgencia de las hojas (figura 9). El aislado 23 controló el desarrollo del patógeno, existió presencia de clorosis y necrosis pero en comparación al testigo positivo las condiciones de la hoja y la presencia del patógeno fué baja (figura 10). Para el caso del aislado 33 las hojas son más turgentes, con menor grado de clorosis y necrosis, el control del patógeno fué mayor en comparación con el resto de los tratamientos (figura 11).

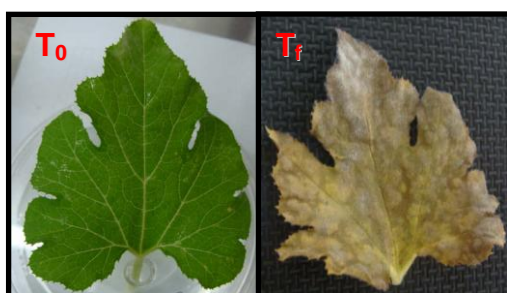


Figura 8. Testigo positivo para cenicilla polvorienta

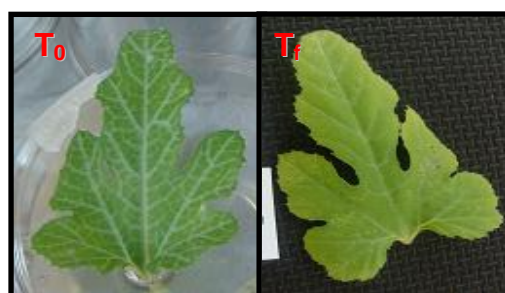


Figura 9. Testigo negativo para cenicilla polvorienta

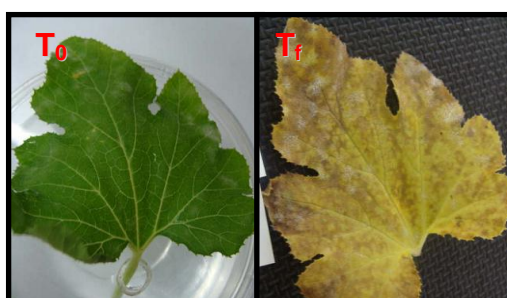


Figura 10. Control de cenicilla polvorienta por *Bacillus sp* aislado 23

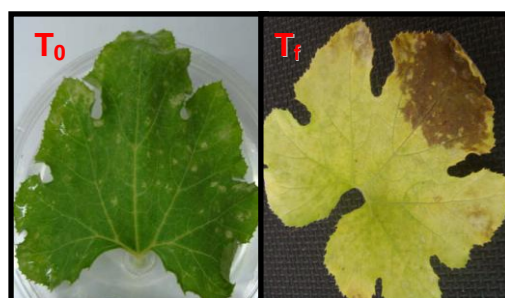


Figura 11. Control de cenicilla polvorienta por *Bacillus sp* aislado 33

Los aislados 72, 86, 22 y 60, para el T_f presentaron un índice de infección del patógeno alto además, de que las hojas mostraron grados altos de clorosis y necrosis parecidos a los del testigo (figuras 12 a la 15).

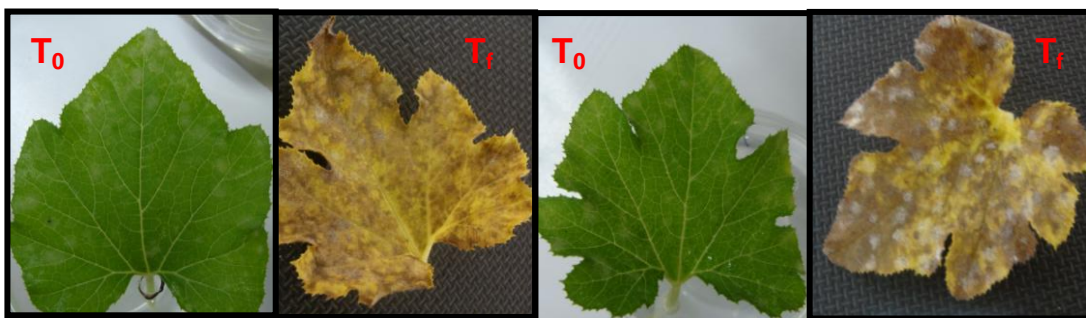


Figura 12. Control de cenicilla polvorienta por *Bacillus sp* aislado 72

Figura 13. Control de cenicilla polvorienta por *Bacillus sp* aislado 86

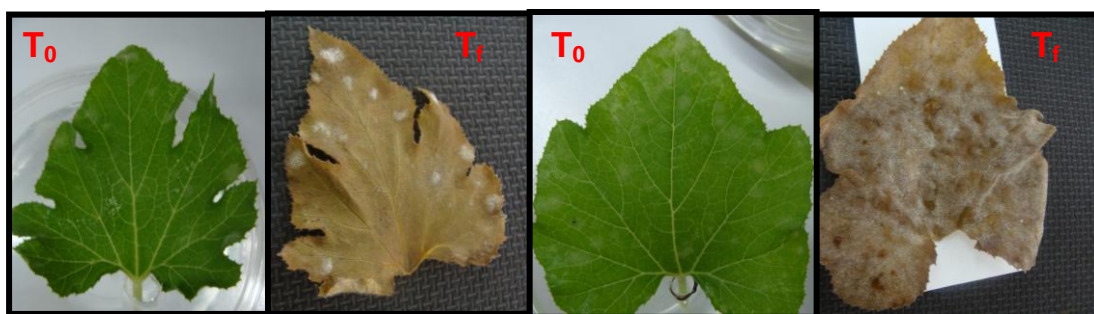


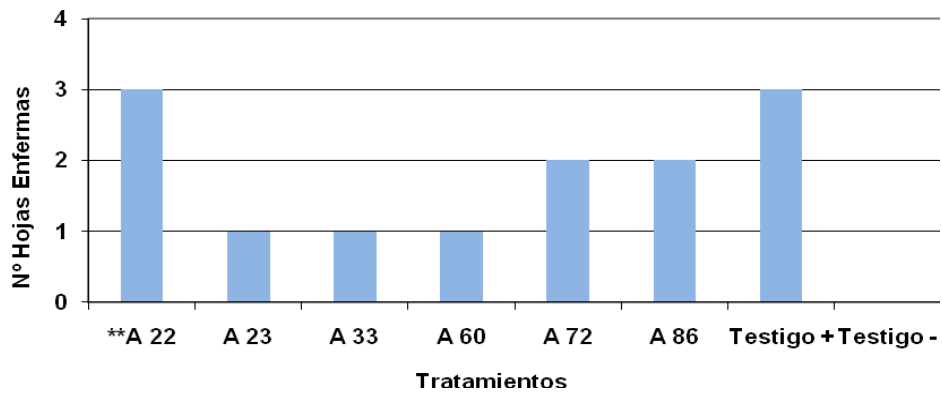
Figura 14. Control de cenicilla polvorienta por *Bacillus sp* aislado 22

Figura 15. Control de cenicilla polvorienta por *Bacillus sp* aislado 60

6.2. Efecto preventivo de *Bacillus sp* sobre *Erysiphe cichoracearum* en hojas de calabacita.

6.2.1. Incidencia

En comparación con el testigo, los aislados 23, 33 y 60 de *Bacillus sp.*, presentaron un control del 66.7%, siendo estos los mejores tratamientos; los aislados 72 y 86 presentan un control del 33.3%, para el caso del aislado 22 la enfermedad no se controló además presentó una incidencia igual al tratamiento testigo (figura 16).

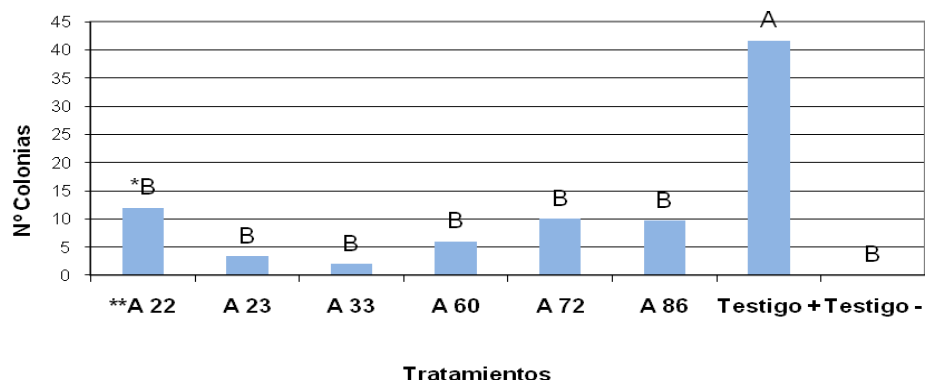


**Aislados de *Bacillus* sp

Figura 16. Comportamiento de aislados de *Bacillus* sp sobre la incidencia de *Erysiphe cichoracearum* en hojas de calabacita

6.2.2. Numero de colonias

Por su parte el aislado 33 presentó un control del 95.2%, en comparación con el testigo positivo, para el caso del aislado 23 el control fue de 92.1%, el control que presentó el aislado 60 fué del 85.6%, los aislados 86 y 72 presentaron 76.9 y 76.1% de control y el aislado 22 fue el que presento el resultado más bajo para el control de la enfermedad con un valor del 71.4% estadísticamente presentan diferencias significativas para el control de este patógeno en comparación al testigo positivo (figura 17).



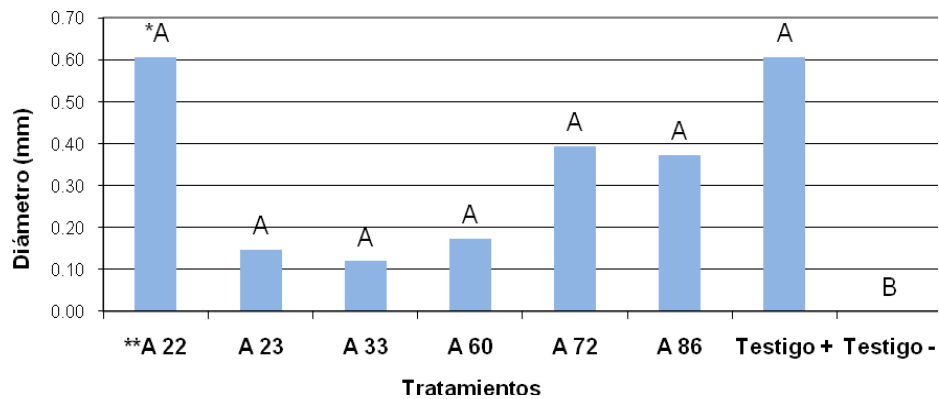
*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

**Aislados de *Bacillus* sp

Figura 17. Control de cenicilla polvorienta por aislados de *Bacillus* sp en hojas de calabacita

6.2.3. Diámetro de crecimiento colonial del patógeno

Para el caso del aislado 33, presentó una disminución del 80.3% siendo este el que mejor resultado numéricamente presentó, para el aislado 23 la disminución fue del 76.0%, los aislados 60, 72 y 86 presentaron resultados del 71.6, 35.5 y 38.8% respectivamente. Cabe resaltar que, el aislado 22 no presentó reducción alguna respecto al tratamiento testigo positivo (figura 18), estadísticamente todos los tratamientos se agruparon en el mismo grupo, sin presentar diferencias significativas entre tratamientos.



*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.
**Aislados de *Bacillus* sp

Figura 18. Efecto de *Bacillus* sp sobre el crecimiento colonial de *Erysiphe cichoracearum* en hojas de calabacita

Posteriormente al periodo de incubación el tratamiento testigo negativo permaneció sano, además de presentar buena coloración y turgencia en la hoja (figura 19). Para el tratamiento testigo positivo (figura 20), se logra que la infección se exprese, las hojas muestran un crecimiento colonial marcado. El mejor resultado fue presentado por el aislado 33 ya que este mantiene las hojas turgentes, el control del patógeno es mayor que el resto de los tratamientos (figura 21). El aislado 23 presentó un buen control, las condiciones de la hoja y la presencia del patógeno es baja (figura 22).

Resultados similares presentaron Shishkoff y McGrath (2002), donde aplicaron un biofungicida AQ10 el cual es un formulado de conidias de *Ampelomyces quisqualis*, no redujo significativamente el numero de colonias de cenicilla (*Podosphaera xantii*) pero si redujo la cantidad de inoculo producido en cada colonia.

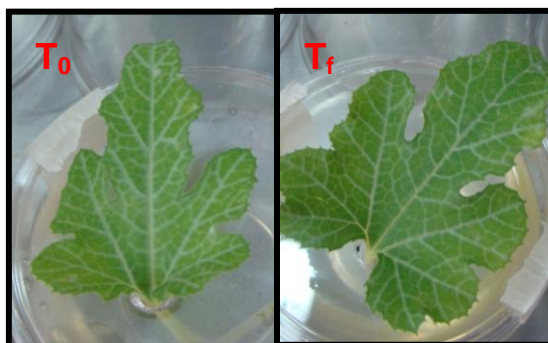


Figura 19. Testigo negativo para cenicilla polvorienta

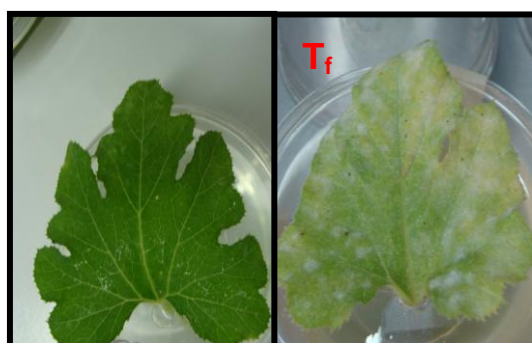


Figura 20. Testigo positivo para cenicilla polvorienta



Figura 21. Control de cenicilla polvorienta por *Bacillus sp* aislado 23

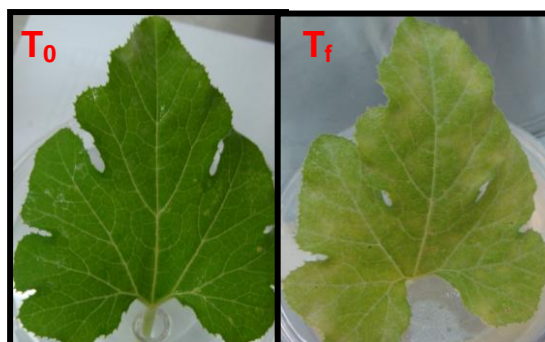


Figura 22. Control de cenicilla polvorienta por *Bacillus sp* aislado 33

Los aislados 72, 86, y 60, presentaron un mayor índice de infección del patógeno (figuras 23, 24 y 26), el aislado 22 (figura 25) mostró alta infección causada por el patógeno, la presencia de la enfermedad es similar a la del tratamiento testigo positivo, siendo de esta forma la cepa que menor controló la enfermedad.

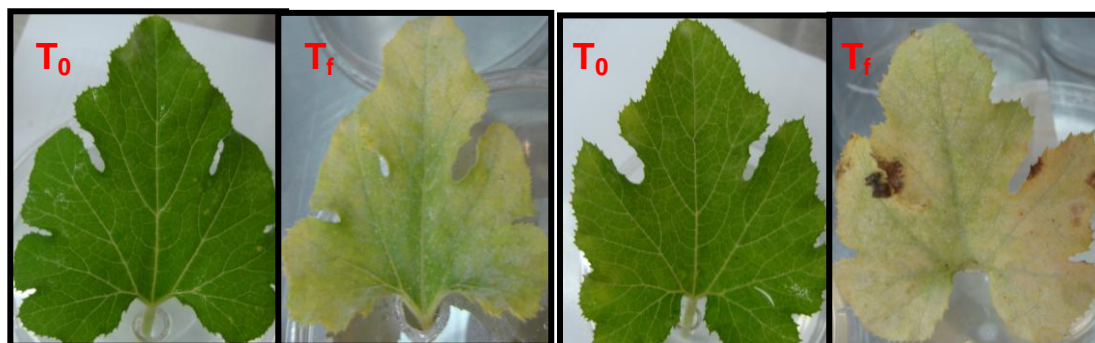


Figura 23. Control de cenicilla polvorienta por *Bacillus sp* aislado 72

Figura 24. Control de cenicilla polvorienta por *Bacillus sp* aislado 86

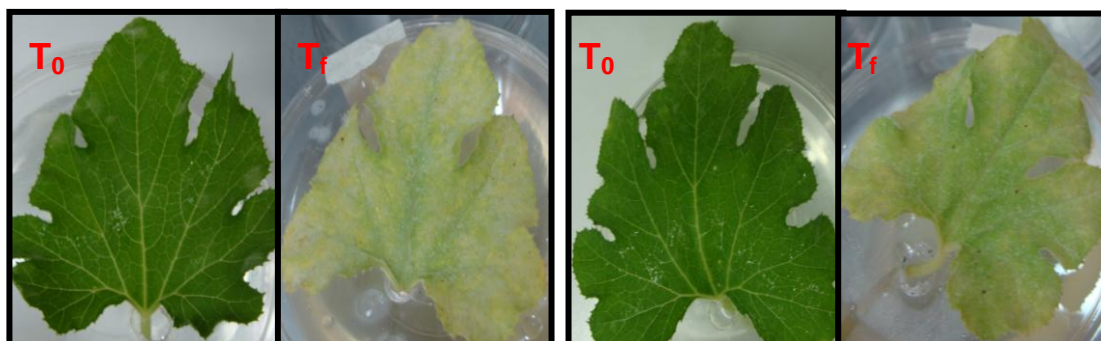


Figura 25. Control de cenicilla polvorienta por *Bacillus sp* aislado 22

Figura 26. Control de cenicilla polvorienta por *Bacillus sp* aislado 60

7. CONCLUSIONES

El mejor efecto curativo de los seis aislados probados en esta investigación fue presentado por el aislado 33 de *Bacillus sp* presentó mejores resultados en comparación con el testigo. El aislado 23 también presentó disminución en cuanto a incidencia, número de colonias y crecimiento colonial de cenicilla polvorienta, siendo este el segundo mejor aislado con efecto antagónico sobre *Erysiphe cichoracearum*.

En cuanto al efecto preventivo también el aislado 33 presentó mejor resultado antagónico, de igual manera el aislado 23 mostró resultados de control del crecimiento de *Erysiphe cichoracearum*, es importante destacar que el aislado de *Bacillus* 60 presenta una disminución en el crecimiento de este patógeno.

8. ANEXOS

Cuadro 4. Incidencia de cenicilla polvorienta (Nº de hojas enfermas) para la prueba curativa

Tratamiento	Nº Hojas enfermas
Aislado 22	3
Aislado 23	2
Aislado 33	2
Aislado 60	3
Aislado 72	3
Aislado 86	3
Testigo +	3
Testigo -	0

Cuadro 5. Numero de colonias de cenicilla polvorienta al inicio de la prueba curativa

Tratamiento	Nº de Colonias tiempo inicial			
	Repetición Nº 1	Repetición Nº 2	Repetición Nº 3	Promedio
Aislado 22	12	13	13	13
Aislado 23	12	11	12	12
Aislado 33	13	14	13	13
Aislado 60	15	11	12	13
Aislado 72	14	12	11	12
Aislado 86	12	13	12	12
Testigo +	14	12	13	13
Testigo -	0	0	0	0

Cuadro 6. Numero de colonias de cenicilla polvorienta al final de la prueba curativa

Tratamiento	Nº de Colonias tiempo final			
	Repetición Nº 1	Repetición Nº 2	Repetición Nº 3	Promedio
Aislado 22	18	24	38	27
Aislado 23	16	0	10	9
Aislado 33	14	8	0	7
Aislado 60	19	18	29	22
Aislado 72	18	22	31	24
Aislado 86	33	35	25	31
Testigo +	50	60	68	59
Testigo -	0	0	0	0

Cuadro 7. Diámetro inicial del crecimiento colonial de cenicilla polvorienta para la prueba curativa

Tratamiento	Diámetro del halo de crecimiento por colonia del patógeno tiempo inicial (mm)															
	Repetición Nº 1					Repetición Nº 2					Repetición Nº 3					Promedio
Aislado 22	0.6	0.6	0.5	0.8	1.0	0.6	0.7	1.1	0.8	0.7	1.1	1.0	0.5	0.6	0.7	0.8
Aislado 23	0.6	0.5	0.8	0.8	1.1	1.1	1.0	1.0	0.6	0.6	0.9	0.7	0.7	0.9	1.1	0.8
Aislado 33	1.0	0.8	0.8	0.9	0.7	0.7	1.1	1.1	0.5	0.5	1.0	1.1	0.5	0.7	0.5	0.8
Aislado 60	0.8	0.8	0.7	0.9	0.6	1.0	1.0	1.1	0.5	0.9	0.5	0.7	0.7	0.9	0.9	0.8
Aislado 72	1.1	1.0	0.6	0.6	0.5	0.9	0.9	0.8	0.5	0.7	0.7	0.8	0.8	1.0	1.1	0.8
Aislado 86	0.7	0.6	0.6	0.9	0.5	1.1	1.1	1.0	1.1	0.8	1.0	0.5	0.9	0.6	0.8	0.8
Testigo +	0.6	0.6	0.8	0.9	0.7	1.0	1.1	1.0	0.7	0.7	0.9	0.9	0.5	0.6	0.7	0.8
Testigo -	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Cuadro 8. Diámetro final del crecimiento colonial de cenicilla polvorienta para la prueba curativa

Tratamiento	Diámetro del halo de crecimiento por colonia del patógeno tiempo final (mm)															
	Repetición Nº 1					Repetición Nº 2					Repetición Nº 3					Promedio
Aislado 22	0.7	0.5	0.9	0.9	1.0	1.3	0.8	0.8	0.9	1.0	2.2	1.6	1.0	1.3	1.5	1.1
Aislado 23	0.5	0.6	0.5	0.5	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.5	0.4	0.4	0.6	0.3
Aislado 33	0.4	0.4	0.5	0.4	0.6	0.3	0.3	0.4	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3
Aislado 60	0.8	1.6	1.2	1.5	1.6	1.1	1.3	1.3	1.4	1.4	2.2	2.3	0.9	0.9	1.0	1.4
Aislado 72	1.2	1.4	1.4	0.9	1.1	1.5	1.4	1.1	1.0	1.4	1.6	1.8	1.2	1.6	1.4	1.3
Aislado 86	1.2	1.4	1.4	1.6	1.8	1.3	1.2	1.2	1.4	1.0	1.5	2.2	2.3	2.2	1.4	1.5
Testigo +	2.2	1.9	1.8	1.8	2.3	2.2	1.5	1.6	1.6	1.8	1.4	1.6	2.3	2.2	2.0	1.9
Testigo -	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Cuadro 9. Incidencia final de cenicilla polvorienta (Nº de hojas enferma) de la prueba preventiva

Tratamiento	Nº Hojas enfermas
Aislado 22	3
Aislado 23	1
Aislado 33	1
Aislado 60	1
Aislado 72	2
Aislado 86	2
Testigo +	3
Testigo -	0

Cuadro 10. Número final de colonias de cenicilla polvorienta para la prueba preventiva

Tratamiento	Nº de Colonias			
	Repetición Nº 1	Repetición Nº 2	Repetición Nº 3	Promedio
Aislado 22	12	8	16	12
Aislado 23	0	10	0	3
Aislado 33	6	0	0	2
Aislado 60	0	18	0	6
Aislado 72	16	0	14	10
Aislado 86	14	15	0	10
Testigo +	38	40	47	42
Testigo -	0	0	0	0

Cuadro 11. Diámetro final del crecimiento colonial de cenicilla polvorienta para la prueba preventiva

Tratamiento	Diámetro del halo de crecimiento por colonia del patógeno (mm)															
	Repetición Nº 1				Repetición Nº 2				Repetición Nº 3				Promedio			
Aislado 22	0.4	0.3	0.8	0.8	0.4	0.5	0.8	0.7	0.6	0.6	0.5	0.8	0.6	0.9	0.4	0.61
Aislado 23	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.3	0.4	0.5	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.15
Aislado 33	0.3	0.5	0.3	0.3	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.12
Aislado 60	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.8	0.5	0.4	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.17
Aislado 72	0.8	0.6	0.7	0.6	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.5	0.4	0.6	0.6	0.39
Aislado 86	0.4	0.4	0.5	0.6	0.6	0.6	0.7	0.7	0.6	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.37
Testigo +	0.6	0.5	0.6	0.4	0.7	0.6	0.7	0.4	0.4	0.6	0.8	0.7	0.8	0.7	0.6	0.61
Testigo -	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00

Cuadro 12. Anova del diámetro final del crecimiento colonial de cenicilla polvorienta para la prueba curativa

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr >F
Modelo	9	6.37904762	1.0631746	15.95	<.0001
Error	14	0.93333333	0.06666667		
Total correcto	23	7.31238095			

Coef Var 23.07309

Cuadro 13. Agrupamiento Tukey para diámetro final del crecimiento colonial de cenicilla polvorienta para la prueba curativa

Tratamiento	Media (mm)	Tukey Agrupamiento	Observaciones
Testigo +	1.8667	A	3
Aislado 86	1.5333	BA	3
Aislado 60	1.3667	BA	3
Aislado 72	1.3333	BA	3
Aislado 22	1.1000	B	3
Aislado 23	0.3333	C	3
Aislado 33	0.3000	C	3
Testigo -	0.0000	D	3

*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Cuadro 14. Anova del diámetro inicial del crecimiento colonial de cenicilla polvorienta para la prueba curativa

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr >F
Modelo	9	1.67011667	0.2385881	29.39	0.0001
Error	14	0.12986667	0.00811667		
Total correcto	23	1.79998333			

Coef Var 12.94743

Cuadro 15. Agrupamiento Tukey para diámetro inicial del crecimiento colonial de cenicilla polvorienta para la prueba curativa

Tratamiento	Media (mm)	Tukey Agrupamiento	Observaciones
Aislado 23	0.8267	A	3
Aislado 86	0.8133	A	3
Aislado 60	0.8000	A	3
Aislado 72	0.8000	A	3
Aislado 33	0.7933	A	3
Testigo +	0.7800	A	3
Aislado 22	0.7533	A	3
Testigo -	0.0000	B	3

*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Cuadro 16. Anova para número de colonias inicial de cenicilla polvorienta prueba curativa

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr >F
Modelo	9	427.8333333	61.1190476	54.33	0.0001
Error	14	18	1.125		
Total correcto	23	445.8333333			

Coef Var 9.569866

Cuadro 17. Agrupamiento Tukey para número de colonias inicial de cenicilla polvorienta prueba curativa

Tratamiento	Media	Tukey Agrupamiento	Observaciones
Aislado 33	13.3333	A	3
Aislado 60	13.3333	A	3
Testigo +	13.0000	A	3
Aislado 22	12.6667	A	3
Aislado 86	12.3333	A	3
Aislado 72	12.3333	A	3
Aislado 23	11.6667	A	3
Testigo -	0.0000	B	3

*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Cuadro 18. Anova para número de colonias final de cenicilla polvorienta prueba curativa

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr >F
Modelo	9	7126	1018	19.83	0.0001
Error	14	821.333333	51.333333		
Total correcto	23	7947.333333			

Coef Var 32.08087

Cuadro 19. Agrupamiento Tukey para número de colonias final de cenicilla polvorienta prueba curativa

Tratamiento	Media	Tukey Agrupamiento	Observaciones
Testigo +	59.3330	A	3
Aislado 86	31.0000	B	3
Aislado 22	26.6670	CB	3
Aislado 72	23.6670	CB	3
Aislado 60	22.0000	CB	3
Aislado 23	8.6670	CD	3
Aislado 33	7.3330	CD	3
Testigo -	0.0000	D	3

*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Cuadro 20. Anova del diámetro inicial del crecimiento colonial de cenicilla polvorienta para la prueba preventiva

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr >F
Modelo	9	0.70666667	0.11777778	2.01	0.1321
Error	14	0.82	0.05857143		
Total correcto	23	1.52666667			

Coef Var 22.6046

Cuadro 21. Agrupamiento Tukey para diámetro inicial del crecimiento colonial del patógeno para la prueba preventiva

Tratamiento	Media (mm)	Tukey Agrupamiento	Observaciones
Testigo +	0.6000	A	3
Aislado 22	0.5667	A	3
Aislado 86	0.3667	A	3
Aislado 72	0.3667	A	3
Aislado 60	0.1667	A	3
Aislado 23	0.1333	A	3
Aislado 33	0.1333	A	3
Testigo -	0.0000	B	3

*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Cuadro 22. Anova para número de colonias final de cenicilla polvorienta para la prueba preventiva

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr >F
Modelo	9	3698.417	410.935	8.672	0.000
Error	14	663.417	47.387		
Total correcto	23	4361.833			

Coef Var 28.274

Cuadro 23. Agrupamiento Tukey para número de colonias final de cenicilla polvorienta para la prueba preventiva

Tratamiento	Media	Tukey Agrupamiento	Observaciones
Testigo +	41.667	A	3
Aislado 22	12.000	B	3
Aislado 72	10.000	B	3
Aislado 86	9.667	B	3
Aislado 60	6.000	B	3
Aislado 23	3.333	B	3
Aislado 33	2.000	B	3
Testigo -	0.000	B	3

*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

9. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 1999. Fitopatología. Quinta Reimpresión de la 2ª Edición. Editorial Limusa. Mexico 838 pag.
- Bettiol W., Garibaldi A. y Migheli Q. 1997. *Bacillus subtilis* for the control of powdery mildew on cucumber and zucchini squash. *Bragantia*, Vol. 56, No.2.
- Boiteux, L. S., Reifschneider, F. J. B., Fonseca, M. E. N. y Buso, J. A. 1995. Search for sources of early blight (*Alternaria solani*) field resistance not associated with vegetative late maturity in tetraploid potato germplasm. *Euphytica* 83: 63-70
- De la Garza R. R. 2004. Efectividad Biológica de Bacterias Rizosféricas Esporuladas sobre el Complejo de Hongos de la Marchitez del Chile. Tesis de Maestría en Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 45 pag.
- De La Garza, R. R. 1996. Respuesta de Tres Variedades de Papa (*Solanum tuberosum*) a la Aplicación de (*Bacillus subtilis*), para el Control de *Rhizoctonia solani* Bajo Invernadero. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Demian, A. y Solomon, N. 1986. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. American Society for Microbiology.
- Falk, S. P., Gadoury, D. M., Pearson, R. C., y Seem, R. C. 1995. Partial control of grape powdery mildew by the mycoparasite *Ampelomyces quisqualis*. *Plant Disease*. 79:483- 490.
- Glawe, D. A. 2008. The powdery mildews: A review of the world's most familiar (yet poorly known) plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 46: 27-51.
- Goel, M., Singh, U. P., Jha, R. N., Pandey, V. B. y Pandey, M. B. 2003. Individual and Combined Effect of (+ -) α -Hydrastine and (+ -)- β -Hydrastine on Spore Germination of Some Fungi. *Folia Microbiol.* 48: 3:363-368.
- Guía Productores de Hortalizas. 2005. Plagas y Enfermedades de las Cucurbitáceas (Guía de Identificación y Manejo).

- Guillen, C. R., Hernández, C. F. D., Gallegos, M. G., Rodríguez, H. R., Aguilar, G. C. N., Padrón, C. E. y Reyes, V. M. H. 2006. *Bacillus* spp. Como Biocontrol en un Suelo Infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su Efecto en el Desarrollo y Rendimiento del Cultivo de Chile. *Revista Mexicana de Fitopatología*, julio-diciembre, 24:002:105-114.
- Hijwegen, T. 1992. Biological control of cucumber powdery mildew with *Tilletiopsis minor* under greenhouse conditions. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, Wageningen, 98:221-225.
- Kimati, H., Cardoso, C.O.N. y Bergamin F. A., 1980. Doenças das cucurbitáceas (abóbora, abobrinha, chuchu, melancia, melão, moranga, pepino). In: Galli, F., ed. *Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. São Paulo, Ceres, pp. 251-269.
- Kimati, H., Soave, J., Eskes, A.B., Kurozawa, C., Brignani N. F. y Fernasdes, N.G. 1986. *Guia de fungicidas agrícolas*. Piracicaba, Livroceres, 281 pag.
- Lira, R., Rodriguez, J. C., Alvarado, J. L., Rodriguez, I., Castrejon, J. y Dominguez, M. A. 1998. Diversidad e Importancia de la Familia Cucurbitaceae en Mexico. *Acta Botánica Mexicana*, 42:43-77
- Llanos, P. P. H. 2001. La Solución Nutritiva, Nutrientes Comerciales, Formulas Completas. WALCO S.A., Mayo 18, Disponible en <http://www.drcalderonlabs.com/Hidroponicos/Soluciones1.html>
- Malathrakis, N. E. 1985. The fungus *Acremonium alternatum* Linc. Fr., a hyperparasite of the cucurbits powdery mildew pathogen *Sphaerotheca fuliginea*. *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, Stuttgart, 92:509-515.
- Martinez A. 2004. *Cencillas Polvorientos en Plantas Ornamentales del Paisaje*. Universidad de Georgia, Departamento de Fitopatologia-Griffin
- Minuto, G., Garibaldi, A. y Gullino, M. L. 1991. Antagonistic activity of some microorganisms against powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) of zucchini: preliminary results. *Bulletin OILB/SROP*, Alassio, 14:181-186.
- Pohronezny, K. y W. M. Stall. 1994. *Powdery Mildew of Vegetables*. Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Romero, D., De Vicente, A., Rakotoaly, H. R., Dufour S. E., Veening, J. W., Arrebola, E., Cazorla, F. M., Kuipers, O. P., Paquot, M. y Garcia, P. A. 2007. The Iturin and Fengycin Families of Lipopeptides Are Key Factors in

- Antagonism of *Bacillus subtilis* Toward *Podosphaera fusca*. The American Phytopathological Society. 20:430–440.
- Romero, D., Pérez, G. A., Rivera, M. E., Cazorla, F. M., y de Vicente, A. 2004. Isolation and evaluation of antagonistic bacteria towards the cucurbit powdery mildew fungus *Podosphaera fusca*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64:263-269.
- Romero, D., Rivera, M. E., Cazorla, F. M., de Vicente, A., Y Pérez, G. A. 2003. Effect of mycoparasitic fungi on the development of *Sphaerotheca fusca* in melon leaves. *Mycol. Res.* 107:64-71.
- Servicio de información agrícola y pesquera. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. 2009. Disponible en: <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/>
- Shishkoff, N. y M. T. McGrath. 2002. AQ10 Biofungicide Combined with Chemical Fungicides or AddQ Spray Adjuvant for Control of Cucurbit Powdery Mildew in Detached Leaf Culture. *Plant Disease* (August 2002). Vol. 86 No. 8
- Shishkoff, N. y McGrath, M. T. 2002. AQ10 Biofungicide Combined with Chemical Fungicides or AddQ Spray Adjuvant for Control of Cucurbit Powdery Mildew in Detached Leaf Culture. *Plant Disease.* 86:8.
- Sicarios, G. J. 2003. Alternativas orgánicas para el control de cenicilla polvorienta en pepino. Universidad Autónoma de Sinaloa.
- Thomson PLM, S.A. 2004. Diccionario de Especialidades Agronomicas. Edicion 14.
- Urquhart, E. J., Menzies, J. G. y Punja, Z. K. 1994. Growth and biological control activity of *Tilletiopsis* species against powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) on greenhouse cucumber. *Phytopathology*, St. Paul, 84:341-351.
- Verhaar, M. A. y Hijwegen, T. 1993. Efficient production of phylloconidia of *Verticillium lecanii* for biocontrol of cucumber powdery mildew, *Sphaerotheca fuliginea*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, Wageningen, 99:101-103.