

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO**

**DIVISIÓN DE AGRONOMÍA  
DEPARTAMENTO DE BÓTANICA**



**Evaluación *in vitro* de extractos biológicos con actividad  
antagonista contra bacterias fitopatógenas**

**Por:**

**MARELY DOMÍNGUEZ CASTELLANOS**

**T E S I S**

**Presentada como requisito parcial para obtener el título de:**

**Ingeniero en Agrobiología**

**Saltillo, Coahuila, México**

**Diciembre de 2011**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO**

**DIVISIÓN DE AGRONOMÍA  
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA**

**Evaluación *in vitro* de extractos biológicos con actividad antagonista contra  
bacterias fitopatógenas**

Por:

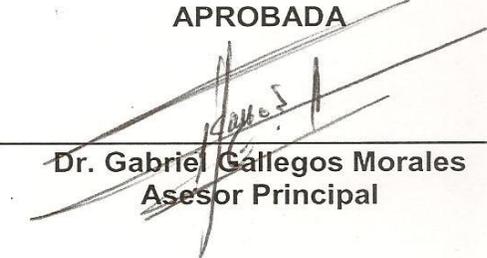
**MARELY DOMÍNGUEZ CASTELLANOS**

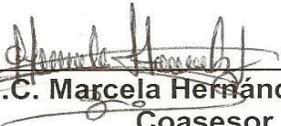
**T E S I S**

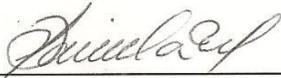
**Presentada como requisito parcial para obtener el título de:**

**INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA**

**APROBADA**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Gabriel Callegos Morales**  
**Asesor Principal**

  
\_\_\_\_\_  
**M.C. Marcela Hernández Suárez**  
**Coasesor**

  
\_\_\_\_\_  
**M.C. Miriam Desiree Dávila Medina**  
**Coasesor**

**Saltillo, Coahuila, México  
Diciembre de 2011**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO**

**DIVISIÓN DE AGRONOMÍA  
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA**

**Evaluación *in vitro* de extractos biológicos con actividad antagonista contra  
bacterias fitopatógenas**

**Por:**

**MARELY DOMÍNGUEZ CASTELLANOS**

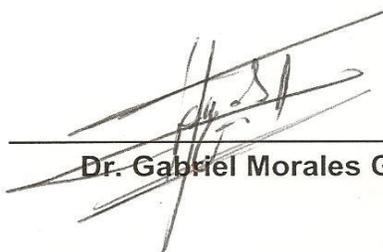
**T E S I S**

**Presentada como requisito parcial para obtener el título de:**

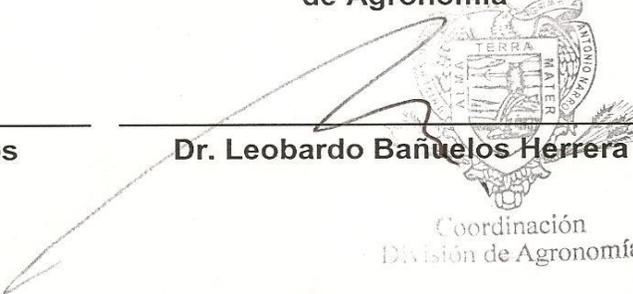
**INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA**

**APROBADA**

**Asesor Principal**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Gabriel Morales Gallegos**

**Coordinador de la División  
de Agronomía**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Leobardo Bañuelos Herrera**

  
Coordinación  
División de Agronomía

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A DIOS**

Por darme la vida y por ser la luz que guía mi camino cada día, por ser un consuelo y por darme la fuerza para salir adelante en los momentos más difíciles. Pero sobre todo, por permitirme llegar hasta aquí y lograr una de mis metas.

### **A Mi Alma Terra Mater.**

Por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de superarme profesionalmente, logrando concluir mis estudios.

### **Al Dr. Gabriel Gallegos Morales**

Por brindarme su apoyo en todo momento, tiempo, esfuerzo y sus aportaciones en la elaboración de este trabajo. Sin su ayuda no hubiese sido posible realizar este trabajo.

### **A la M.C. Marcela Hernández Suárez**

Por su dedicación y apoyo, que a pesar de ser una persona con diversas actividades siempre estuvo dispuesto a colaborar en todo momento en el desarrollo de este trabajo.

### **A la M.C. Miriam Desireé Dávila Medina**

Por su participación y sugerencias, así como aportaciones en el desarrollo y revisión de este trabajo.

### **A la T.A. María Cristina Sánchez Flores**

Por su colaboración en laboratorio y por sus aportaciones en el desarrollo de este trabajo, gracias por el apoyo brindado en todo momento y sobre todo gracias por tu amistad y cariño

### **Al Ing. Dorian Hans Olivar Roldan**

Por el apoyo, y gracias por la ayuda brindada para realizar este trabajo

## DEDICATORIAS

### *A Mís Padres*

*José Luis Domínguez Pérez y Rebeca Castellanos Cordero con amor y respeto, por haberme dado la confianza y apoyo en todo momento, por sus sacrificios para que yo pudiera terminar mis estudios, nunca podré pagarles, el tiempo y la dedicación en mi formación profesional.*

### *A Mís Hermanos*

*Con mucho cariño: Graciela, Damaris, Tíla y Carlos Heberto, por los consejos y el apoyo brindado, en todo momento incondicionalmente y por compartir conmigo siempre los momentos importantes.*

### *Especialmente*

*Al Licenciado José Maclovio Hernández, gracias amor por el tiempo, apoyo, dedicación y comprensión en todo momento, porque eres y serás siempre parte importante en mi vida. Te amo.*

### *A mis Amigos*

*gracias por la confianza y por la amistad, Inés, Silvia, Aleida, y Luis, Isaías, Antonia y Shirley. A mis compañeros de Carrera; Jesús Asunción, Gloria Laura, Juana Inés, Juan, Carmen Alicia, Luz María, Valeria soledad, Adriana, Víctor, José, Elvira, Y Carlos Leobardo,*

## INDICE DE CONTENIDO

	Página
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	iv
<b>DEDICATORIAS</b> .....	v
<b>INDICE DE CONTENIDO</b> .....	vi
<b>INDICE DE CUADROS</b> .....	viii
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>INDICE DEL APÉNDICE</b> .....	x
<b>RESUMEN</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>OBJETIVOS</b> .....	3
<b>HIPÓTESIS</b> .....	3
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	4
Generalidades de las bacterias.....	4
Características generales de las bacterias fitopatógenas.....	4
Reproducción.....	5
Ecología y diseminación.....	5
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp., <i>michiganensis</i> .....	6
Importancia económica.....	6
Morfología.....	6
Síntomas y daños al cultivo.....	6
Distribución Geográfica.....	7
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv., <i>phaseoli</i> .....	7
Importancia económica.....	7
Morfología.....	8
Síntomas y daños al cultivo.....	8
Distribución geográfica.....	8
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv., <i>flaccumfaciens</i> .....	9
Importancia económica.....	9
Morfología.....	10

Síntomas y daños al cultivo.....	10
Distribución geográfica.....	11
<i>Pectobacterium carotovorum sub., carotovorum</i> .....	12
Importancia económica.....	12
Morfología.....	12
Síntomas y daños al cultivo.....	12
Distribución geográfica.....	13
Extractos como Alternativa de Control Biológico.....	13
Ácido Jasmónico.....	13
Ácido Salicílico.....	14
Funcionamiento en plantas.....	15
Actinomicetos.....	16
Condiciones de crecimiento.....	18
Composición química.....	18
Control biológico.....	19
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	21
Ubicación del experimento.....	21
Obtención de patógenos.....	21
Obtención de extractos.....	21
Preparación y esterilización de los medios de cultivos y soluciones.....	22
Cultivo de bacterias.....	22
Preparación del medio KB.....	22
Diferentes técnicas empleadas para la siembra de las bacterias.....	22
Ensayo 1. Técnica de discos impregnados.....	22
Ensayo 2. Medio envenenado.....	23
Ensayo 3. Técnica de diluciones.....	24
Análisis de datos.....	24
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	25
<b>CONCLUSIONES</b> .....	34
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	35

## INDICE DE CUADROS

	Pagina
Cuadro 1. Clasificación de los actinomicetos por (Stackebrandt <i>et al.</i> , 1997). .....	17
Cuadro 2. Tipos de paredes celulares de los actinomicetos (Serrano y Sandoval, 2008).....	19
Cuadro 3. Porcentaje de inhibición de las bacterias <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv <i>flaccumfaciens</i> (Cff) y <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp., <i>michiganensis</i> (Cmm) causado por el extracto de ácido jasmónico a diferentes concentraciones.....	26
Cuadro 4. Porcentaje de inhibición de la bacteria <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp <i>michiganensis</i> causado por el extracto de sobrenadante de las cepas de los actinomicetos ASH53 Y APC70.....	28
Cuadro 5. Porcentaje de inhibición de la bacteria <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv <i>flaccumfaciens</i> causado por el extracto de sobrenadante de las cepas de actinomicetos ASH53 y APC70.....	30

## INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mapa de distribución geográfica de <i>Clavibacter michiganensis</i> .....	7
Figura 2. Mapa de distribución geográfica de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv., <i>phaseoli</i> .....	9
Figura 3. Mapa de distribución geográfica de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv., <i>flaccumfaciens</i> .....	11
Figura 4. Estructura química del ácido Jasmónico.....	14
Figura 5. Estructura química del ácido Salicílico.....	15
Figura 6. Técnica de disco impregnados.....	23
Figura 7. Inhibición de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> y <i>Clavibacter michiganensis</i> creciendo en medio KB con diferentes concentraciones del extracto del ácido jasmónico.....	27
Figura 8. Inhibición de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp <i>michiganensis</i> creciendo en medio KB con diferentes concentraciones de los extractos de actinomicetos ASH53 y APC70.....	29
Figura 9. Inhibición de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> creciendo en medio KB con diferentes concentraciones de los extractos de actinomicetos ASH53 y APC70.....	31
Figura 10. Actividad antagonista en caldo nutritivo de los extractos de ácido jasmónico, actinomicetos ASH53 y APC70 contra las bacterias <i>Clavibacter michiganensis</i> y <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> .....	32

## INDICE DEL APÉNDICE

	Página
Cuadro 1. Análisis de varianza de la inhibición de la bacteria <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> con el extracto de ácido jasmónico.....	41
Cuadro 2. Análisis de varianza de la inhibición de la bacteria <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> con el extracto de actinomicetos ASH53.....	41
Cuadro 3. Análisis de varianza de la inhibición de la bacteria <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> con el extracto de actinomicetos APC70.....	41
Cuadro 4. Análisis de varianza de la inhibición de la bacteria <i>Clavibacter michiganensis</i> con el extracto de ácido jasmónico.....	42
Cuadro 5. Análisis de varianza de la inhibición de la bacteria <i>Clavibacter michiganensis</i> con el extracto de actinomicetos ASH53.....	42
Cuadro 6. Análisis de varianza de la inhibición de la bacteria <i>Clavibacter michiganensis</i> con el extracto de actinomicetos APC70.....	42
Cuadro 7. Ingredientes para el medio de cultivo KB.....	43
Figura 1. Porcentaje de inhibición de la bacteria <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> a diferentes concentraciones de los extractos de actinomicetos APC70, ASH53 y ácido jasmónico.....	43
Figura 2. Porcentaje de inhibición de la bacteria <i>Clavibacter michiganensis</i> a diferentes concentraciones de los extractos de actinomicetos APC70, ASH53 y ácido jasmónico.....	44

## RESUMEN

La presente investigación se realizó en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo, Coahuila, México. El objetivo de éste trabajo fue evaluar la actividad antagonica de extractos de fermentación de *Botryodiplodia theobromae* y *Pseudomonas fluorescens* productores de ácido jasmónico y ácido salicílico, así como de extractos de sobrenadantes de actinomicetos seleccionados previamente por su actividad (ASH53 y APC70) contra bacterias fitopatógenas, las cuales fueron *Xanthomonas axonopodis* pv., *phaseoli*, *Pectobacterium carotovorum* subsp., *carotovorum*, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv., *flaccumfaciens*. Se realizaron bioensayos de antibiosis *in vitro*, empleando tres técnicas: discos impregnados, medio envenenado y diluciones en tubo. Se descartó la técnica de discos impregnados al no presentar resultados para ninguna de las cuatro bacterias con ninguno de los extractos. En la técnica de medio envenenado a diferentes concentraciones de los extractos no se observó actividad antagonista contra las bacterias *X. axonopodis* y *P. carotovorum*, sin embargo se observaron porcentajes de inhibición del 80-100% para *C. flaccumfaciens* y *C. michiganensis*, siendo el A70 quien presentó los niveles más altos de antagonismo contra *C. michiganensis* a la dosis menor utilizada y el ácido jasmónico el mayor efecto inhibitorio contra *C. flaccumfaciens*. En la técnica de diluciones se observó un alto grado de inhibición con el actinomiceto A70 contra *C. michiganensis*, en el caso de *C. flaccumfaciens* solamente el A53 y ácido jasmónico presentaron un grado mínimo de inhibición. De acuerdo a los resultados obtenidos y al análisis estadístico se demuestra que los extractos de actinomicetos y ácido jasmónico inhiben satisfactoriamente a las bacterias fitopatógenas, variando los resultados dependiendo de la técnica empleada. Con esto se demuestra que tanto el ácido jasmónico como los actinomicetos son una alternativa para el control biológico de bacterias fitopatógenas.

**Palabras clave:** ácido jasmónico, actinomicetos, antagonismo, bacterias fitopatógenas.

## ABSTRACT

The present research was conducted in the “Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro” in Saltillo, Coahuila, México. The objective of this work was to evaluate the antagonistic activity of fermentation extracts of *Botryodiplodia theobromae* y *Pseudomonas fluorescens* salicylic acid and jasmonic acid producers, and extracts of supernatants from actinomycetes previously selected for its activity (ASH53 and APC70) against phytopathogenic bacteria, which were *Xanthomonas axonopodis* pv., *phaseoli*, *Pectobacterium carotovorum* subsp., *carotovorum*, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv., *flaccumfaciens*. Antibiosis bioassays *in vitro* were performed, using three techniques: disks impregnated, poisoned culture medium and dilutions in test tube. Technique discs impregnated was discarded by failing to submit results for any of the four bacteria with none of the extracts. In the technique of poisoned culture medium to different concentrations of the extracts was not observed antagonistic activity against bacterias *X. axonopodis* and *P. carotovorum*, however percentages of inhibition 80-100% were observed for *C. flaccumfaciens* and *C. michiganensis*, with the A70 who presented the highest levels of antagonism against *C. michiganensis* to the lowest dose used and jasmonic acid, the highest inhibitory effect against *C. flaccumfaciens*. The dilution technique showed a high degree of inhibition with the actinomycete A70 to *C. michiganensis*, in the case of *C. flaccumfaciens* only the A53 and jasmonic acid had a minimal degree of inhibition. According to the results and statistical analysis demonstrated that extracts of actinomycetes and jasmonic acid successfully inhibit plant pathogenic bacteria, varying results depending on the technique used. This shows that both jasmonic acid and actinomycetes are an alternative for the biological control of plant pathogenic bacteria.

**Key words:** jasmonic acid, actinomycetes, antagonism, plant pathogenic bacteria

## INTRODUCCIÓN

La palabra bacteria viene del griego *batería* que significa báculo, bastón, vara o varilla. Las bacterias son los organismos más abundantes del planeta, son ubicuas, se encuentran en todos los hábitats terrestres; crecen hasta en los medios simbioses más extremos como en los manantiales de aguas calientes y ácidas, en desechos radioactivos, en las profundidades tanto del mar y como de la corteza terrestre.

Existen varios géneros de bacterias y dentro de estos se encuentran las fitopatógenas de las cuales más de 200 pertenecen a los géneros *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Streptomyces*, *Agrobacterium*, *Bacterium* y *Corynebacterium* que causan enfermedades en plantas cultivadas y producen anualmente cuantiosas pérdidas, por lo cual se ha abordado temas relacionados con la epidemiología y el control biológico de distintas bacterias fitopatógenas (Reinoso *et al.*, 2006).

Las enfermedades causadas por bacterias son difíciles de controlar utilizando compuestos químicos, ya que éstos pueden provocar resistencia al agente causal, además las bacterias fitopatógenas producen abundantes cantidades de polisacáridos extracelulares, los cuales las protegen de algunos agentes químicos antibacteriales (Rangel *et al.*, 2010).

Actualmente se estudian microorganismos antagónicos de fitopatógenos tales como los actinomicetos que son un reservorio enorme de antibióticos y metabolitos bioactivos y muchos de ellos son excelentes agentes de biocontrol para proteger

las plantas contra fitopatógenos. Aunque miles de antibióticos y metabolitos bioactivos han sido descritos, se cree que estos representan solo una fracción de los compuestos bioactivos producidos por los actinomicetos, (González y Robles, 2009).

También existen otros datos como los del ácido jasmónico (AJ) relacionados principalmente con la defensa a insectos, hongos y bacterias fitopatógenas además de las respuestas a heridas en las plantas. De hecho, la participación de AJ en la respuesta ante patógenos es de las más estudiadas. (Herrera, 2008).

En cuanto al ácido salicílico está implicado generalmente en la activación de respuestas defensivas frente a patógenos biotróficos (aquellos que requieren de las células vivas de la planta) (Seo *et al.*, 2001), se conoce como activador de las defensas de plantas contra hongos, virus, bacterias, nematodos e insectos. Por lo antes descrito se llevó a cabo esta investigación con el propósito de conocer el poder antagónico *in vitro* de los extractos de actinomicetos, ácido jasmónico y ácido salicílico contra bacterias fitopatógenas.

## OBJETIVO GENERAL

- ✚ Evaluar el efecto antagónico *in vitro* de los extractos de actinomicetos, ácido jasmónico y ácido salicílico contra cuatro bacterias fitopatógenas.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ✚ Determinar el antagonismo *in vitro* de cuatro extractos contra las bacterias fitopatógenas con tres diferentes técnicas.
- ✚ Determinar el porcentaje de inhibición de cada uno de los extractos contra las bacterias *Clavibacter michiganensis* subsp., *m*, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv., *f*, *Xanthomonas axonopodis* pv., *p* y *Pectobacterium carotovorum* subsp., *c*.
- ✚ Evaluar diferentes concentraciones de los extracto contra las bacterias fitopatógenas.

## HIPÓTESIS

Los extractos de actinomicetos, ácido jasmónico y ácido salicílico presentaran efecto antagonista contra al menos dos de las bacterias de importancia agrícola *Xanthomonas axonopodis* pv., *phaseoli*, *Clavibacter michiganensis* subsp., *michiganensis*, *Pectobacterium carotovorum* subsp., *carotovorum* y *Curtobacterium flaccumfaciens* pv., *flaccumfaciens*.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Generalidades de las bacterias

Las bacterias son la forma de vida más antigua de la tierra, sobreviven y prosperan en los ambientes más rigurosos, en manantiales, en pozos de ácido, en grietas de la tierra, sin luz, sin aire y a temperaturas elevadas. Estos microorganismos juegan un papel fundamental en la naturaleza y en el hombre: la presencia de una flora bacteriana normal es indispensable, aunque muchos gérmenes son patógenos, análogamente tienen un papel importante en la industria y permiten desarrollar importantes progresos en la investigación, concretamente en fisiología celular y en genética (Ramírez *et al.*, 2001).

### Características generales de las bacterias fitopatógenas

**Morfología:** La mayoría de las bacterias fitopatógenas tienen forma de bastón, las únicas excepciones son especies de *Streptomyces* las cuales son filamentosas. Los bastones son más o menos cortos y cilíndricos y en los cultivos jóvenes tienen una longitud que va de 0.6 a 3.5  $\mu\text{m}$  y un 0.5 a 1.0  $\mu\text{m}$  de diámetro. En los cultivos viejos o en altas temperaturas los bastones de muchas especies son mucho más largos e incluso pueden tener forma filamentosa. En ocasiones se dan variaciones de la forma de bastón en la forma de una masa, una Y o una V y otras formas ramificadas. (Peñalbert *et al.*, 2009).

Las paredes celulares de la mayoría de las especies de bacterias están cubiertas por un material viscoso y gomoso que puede ser delgado (caso en el cual se le denomina capa mucilaginosa) o densa, formando una masa relativamente amplia en torno a la célula (en cuyo caso se le denomina cápsula). La mayoría de las

bacterias fitopatógenas poseen delicados flagelos en forma de filamentos que a menudo son considerablemente más largos que las células que formaron.

En algunas especies bacterianas, cada bacteria presenta un solo flagelo, mientras que otras poseen un ramillete de flagelos en uno de sus extremos, algunas tienen un flagelo simple o un ramillete de ellos en cada extremo y todavía otras poseen flagelos peritrícos, es decir, distribuidos sobre toda la superficie.

## **Reproducción**

Las bacterias fitopatógenas en forma de bastón se reproducen mediante el proceso asexual conocido como 'fisión binaria' o 'fisión'. Esta se produce por la invaginación de la membrana citoplasmática hacia la parte central de la célula, formando un tabique membranoso transversal, que divide al citoplasma en dos partes aproximadamente iguales.

Durante el proceso, se secretan o sintetizan dos capas del material de la pared celular (continuando con la pared celular externa) entre las dos capas de la membrana. Cuando concluye la formación de dichas paredes celulares, las dos capas se separan dando como resultado un par de células.

Mientras que la pared celular y el citoplasma están llevando a cabo la fisión, el material nuclear se organiza en una estructura circular en forma de cromosoma la cual se autoduplica y se distribuye por partes iguales entre las dos células formadas a partir de la célula en división (Peñalbert *et al.*, 2009).

## **Ecología y diseminación**

La mayoría de las bacterias fitopatógenas se desarrollan principalmente como organismos parásitos en las plantas hospedantes y parcialmente en el suelo como saprófitos. Sin embargo hay grandes diferencias entre especies en cuanto al grado de desarrollo en uno u otro ambiente (González *et al.*, 2005).

## ***Clavibacter michiganensis subsp., michiganensis (Cmm)***

### **Importancia económica**

Los daños causados por *C.m. var., michiganensis*, en cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum*) en invernadero y en campo cultivados a cielo abierto, matando a las plantas jóvenes o reduciendo su producción comercial. Genera la enfermedad denominada “ojo de pájaro” o “cancro bacteriano del tomate”; es una enfermedad que causa la muerte prematura de la planta y severas pérdidas en el rendimiento, presentándose en otras solanáceas, pero solamente en el tomate representa importancia económica (Nazari *et al.*, 2007).

### **Morfología**

Son bacilos cortos, ligeramente curvos, Gram positivos, algunos móviles, de uno a dos flagelos, presentan un crecimiento lento, hidrolizan débilmente el almidón, no producen nitratos pero producen ácido a partir de glucosa.

### **Síntomas y daño al cultivo**

Las plantas son vulnerables en cualquier etapa de desarrollo, las plántulas infectadas se mueren rápidamente o producen plantas débiles. Los primeros síntomas de la enfermedad son marchitez, rizado y bronceado de las hojas, a menudo en un solo lado de la planta (Nazari *et al.*, 2007).

Si se practica un corte en el tallo puede observarse decoloración café en el elemento vascular. Los síntomas se dividen en: superficiales (por colonización bacteriana de tejidos superficiales), y sistémicos (por invasión bacteriana del tejido vascular). Aparecen lesiones necróticas de hasta 6 mm de diámetro en la superficie

de las hojas viejas superiores, o puntos circulares ligeramente protuberantes de 3 mm de diámetro. Pueden observarse manchas similares en tallos y pecíolos.

### Distribución geográfica

Afecta a regiones de Centroamérica, Estados Unidos, Canadá, Australia, Nueva Zelanda, Europa, China, África Costa mediterránea de Turquía y Sudamérica.

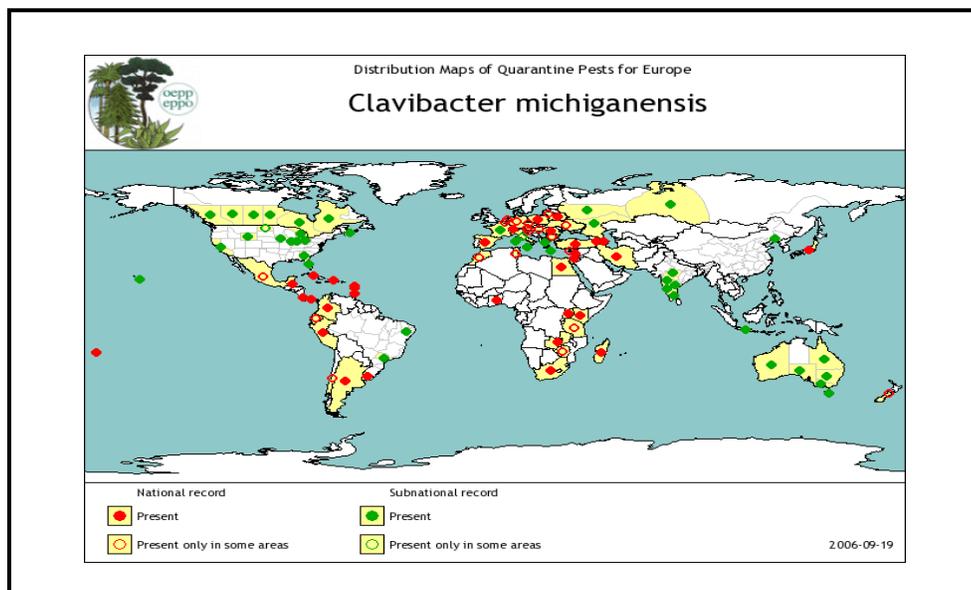


Figura 1. Mapa de distribución geográfica de *Clavibacter michiganensis* (<http://www.eppo.org>)

### *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap)

#### Importancia económica

Representa una de las bacterias de mayor importancia epidemiológica en las zonas tropicales. Dentro de este género, la especie *axonopodis* tiene gran importancia económica porque ataca cultivos comestibles y plantas ornamentales, es

la responsable del tizón común en el cultivo de frijol (Navarrete y Acosta, 2000). La clasificación de la especie *campestris* ha sido motivo de estudios taxonómicos y se ha propuesto cambiar la especie *campestris* a *axonopodis*. Por ende, muchos patovares serán cambiados a este último grupo de existir evidencia significativa que sustente el cambio en la clasificación (Zapata y Gaud, 2001).

### **Morfología**

Son bacilos rectos y cortos, Gram-negativos, con flagelación monótricos, presentan un pigmento amarillo no difusible en el medio.

### **Síntomas y daños al cultivo**

En plántulas se manifiesta con pequeñas manchas húmedas, que terminan confluyendo y tomando un color castaño oscuro. En adultas las manchas tienen bordes angulosos que se oscurecen y forman un halo clorótico, finalmente la planta muestra una apariencia de quemado llegando a perder las hojas. También aparecen manchas en las vainas y tallo. Cuando se produce en ambiente de alta humedad se producen pequeñas incrustaciones amarillas constituidas por bacterias y sus exudados cubriendo las manchas (Navarrete y Acosta, 2000).

### **Distribución geográfica**

*X. axonopodis* pv., *phaseoli* se encuentra distribuida en todo el mundo, principalmente en lugares tropicales, subtropicales y en climas templados.

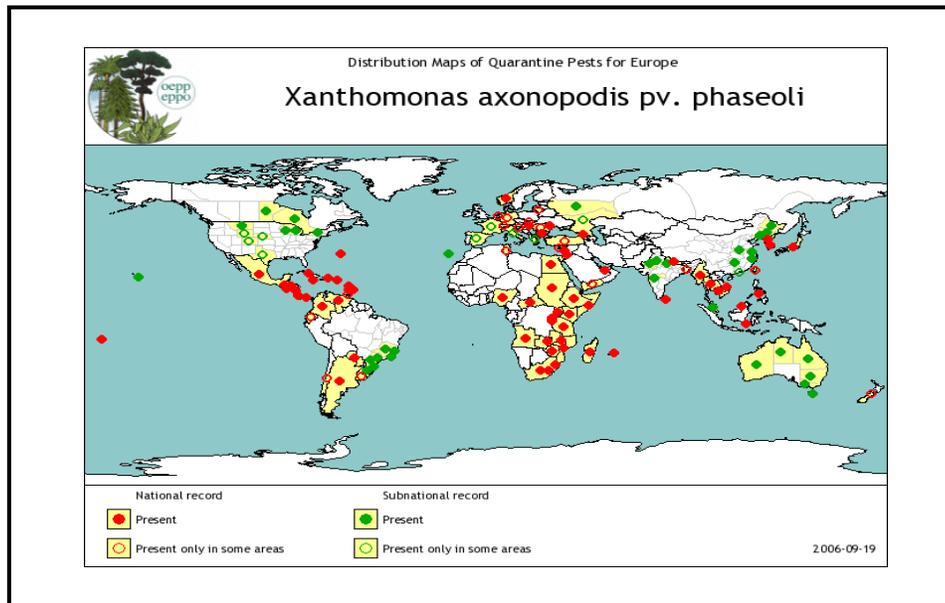


Figura 2. Mapa de distribución geográfica de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (<http://www.eppo.org>)

### ***Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff)**

#### **Importancia económica**

La marchitez bacteriana del frijol es una enfermedad causada por, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv., *flaccumfaciens* que afecta principalmente al frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), y a otras especies tales como: (*P. coccineus*, *P. aureus*, *P. lunatus*, *P. angularis*, *P. mungo*), así como *Glycine max* (soja) *Pisum sativum* (arveja) *Vigna sinensis* (caupí) *Lablab purpureus* (poroto Jacinto). Puede ser inoculada y sobrevivir en *Zea mays* (maíz) y otros hospedantes (Hung *et al.*, 2007).

## **Morfología**

Es una bacteria aerobia Gram-positiva, no productora de esporas, de 0,3-0,5 x 0,6-3,0 micras con uno a tres flagelos laterales o polares. Las colonias en agar de extracto de carne son de color amarillo, circulares, lisas, planas o ligeramente convexa, húmedo brillante, semi-opaco y tiene un margen liso.

## **Síntomas y daños al cultivo**

En el género *Phaseolus*, las plantas jóvenes de 5 a 8 cm de altura, pueden ser atacadas y generalmente mueren, si las plantas sobreviven a un ataque temprano, o son infectadas en una etapa de crecimiento tardío, pueden vivir durante la estación y producir semillas. La enfermedad se caracteriza por un marchitamiento de las hojas o parte de éstas durante las horas más calurosas del día y una posterior recuperación a medida que se acerca la noche y las temperaturas descienden. Como resultado de la obturación bacteriana de los vasos, se interrumpe el suministro de agua y las hojas se tornan marrones y caen (Ting *et al.*, 2003).

Ocasionalmente, estos típicos síntomas de marchitamiento, pueden estar ausentes y ser reemplazados por lesiones necróticas amarillas en las hojas, muy parecidas a las del tizón común, *Xanthomonas axonopodis* pv., *phaseoli*, sin embargo, el margen de la lesión es más irregular en las infecciones de *C. flaccumfaciens* pv., *flaccumfaciens*.

En general, no hay humedecimiento de tallos y hojas, como aparece en las infecciones de tizón común y de halo. En las vainas, la enfermedad es mucho menos visible que en el tizón común, todas las semillas de una vaina pueden estar infectadas, mientras que la vaina permanece aparentemente sana esto se debe a que el patógeno infecta a la semilla por el sistema vascular, siguiendo las suturas de la vaina; las suturas pueden estar de color más oscuro y ese oscurecimiento puede extenderse lateralmente (Ting *et al.*, 2003).

En vainas jóvenes, aparecen ocasionalmente partes humedecidas, y el área se torna de color verde-amarillento o más oscura que el resto de la vaina y en vainas maduras las lesiones son más visibles, siendo de color verde-oliva en contraste con su color amarillo normal. Las plantas aparentemente vigorosas pueden presentar uno o más tallos marchitos o vainas infectadas.

### Distribución geográfica

Región mediterránea europea: ampliamente difundida en Hungría; localmente establecida en Bélgica, Grecia, Rumania, Unión Soviética, Túnez, Turquía y Yugoslavia.

No ha sido satisfactoriamente documentada su presencia en Francia, Alemania Federal y Suiza. América del Norte: reportada por primera vez en EEUU en 1920, actualmente es común en el noreste y ocasionalmente se encuentra en el oeste; Canadá (Ontario), México y Australia.

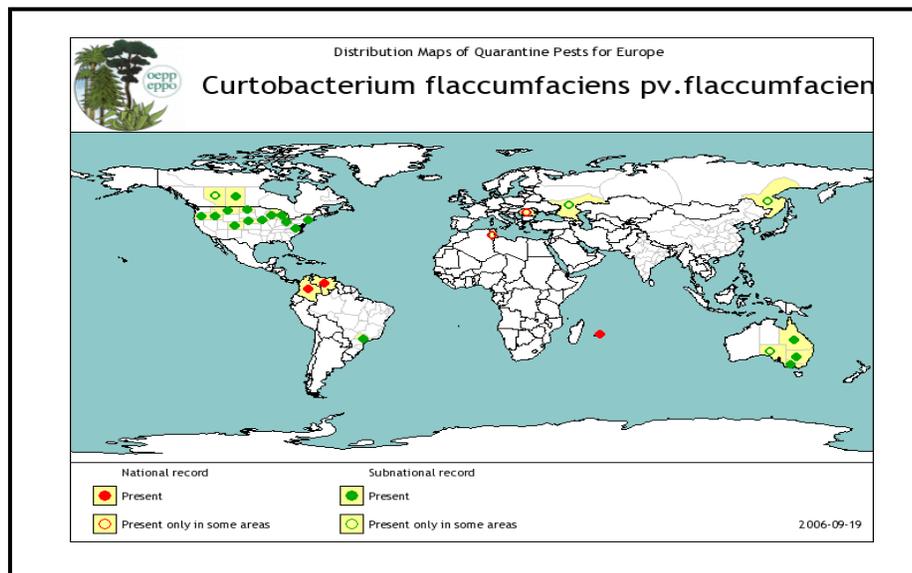


Figura 3. Mapa de distribución geográfica de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv., *flaccumfaciens*  
(<http://www.eppo.org>)

## ***Pectobacterium carotovorum* subsp., *carotovorum* (Pcc)**

### **Importancia económica**

Antes incluida en el género *Erwinia* y ahora en el género *Pectobacterium*. (Gardan *et al.*, 2003; Samson *et al.*, 2005), son responsables de podredumbres blandas en distintas especies vegetales, afectando a un amplio rango de plantas cultivadas y ocasionando graves pérdidas en los cultivos principalmente en zanahoria (*Daucus carota* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), pimiento (*Capsicum annuum* L.), chicoria (*Cichorium intybus* L.) y papa (*Solanum tuberosum* L.). En este último caso es una de las enfermedades poscosecha más severas en el mundo (Toth *et al.*, 2003). La pudrición blanda puede ocurrir durante el almacenamiento de los tubérculos de papa, así como en el suelo antes de la cosecha, y por la utilización de tubérculos y semillas contaminados que se deterioran después de la siembra (Kucharek y Bartz, 2000).

### **Morfología**

Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, es de forma bacilar, Gram-negativa y anaeróbica facultativa; se caracteriza por ser una bacteria oportunista, es decir, una infección latente en el tubérculo puede convertirse en activa cuando la planta se estresa bajo condiciones de temperatura y humedad. Las temperaturas mínimas, óptimas y máximas para que se desarrolle la enfermedad son de 5, 22 y 37°C, respectivamente (Guss, 1999).

### **Síntomas y daños al cultivo**

La enfermedad puede aparecer primeramente en el campo a través de heridas. La inoculación de órganos carnosos y su diseminación posterior son facilitadas por insectos vectores; pudrición húmeda en tubérculos y raíces, una

disminución en plántulas emergidas, caída de las mismas y el colapso del pedúnculo en la flor cortada en poscosecha (Kucharek y Bartz, 2000).

### **Distribución geográfica**

Mundial, en España se identifica en las zonas de cultivo de papa y esporádicamente en otros cultivos.

### **Extractos como alternativa de control biológico**

En la agricultura moderna el empleo de agroquímicos como fungicidas, antibióticos e insecticidas ha traído problemas de contaminación, intoxicación y efectos crónicos indeseables en humanos.

La tendencia de los microorganismos a cambiar y evadir la resistencia a los diversos tipos de antibióticos y plaguicidas hace necesario el desarrollo de otro tipo de estrategias más duraderas y con menores costos ambientales y económicos.

### **Ácido jasmónico**

El ácido jasmónico (AJ) y sus derivados son reguladores endógenos del crecimiento de las plantas, éstos inducen el incremento en la agricultura y regulan los mecanismos de defensa de las plantas contra el ataque de patógenos. (Lorenzo y Solano, 2005). El ácido jasmónico está incluido dentro del grupo de los jasmonatos (JAs), y prostaglandinas originados en animales a partir del ácido araquidónico (Creelman y Mullet, 1997; Blée, 2002; Howe, 2004). AJ es una ciclopentanona que posee una cadena pentenilo y una cadena carboxílica.

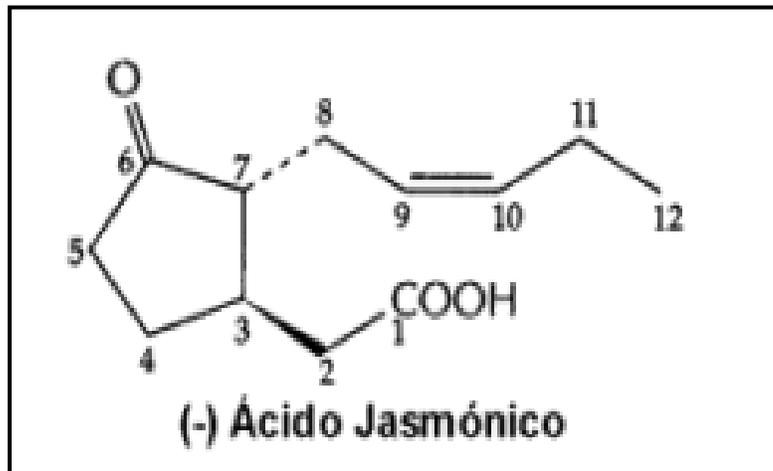


Figura 4. Estructura química del ácido Jasmónico  
( <http://2.bp.blogspot.com>)

Las membranas celulares son fuente de ácidos grasos de los que derivan algunos compuestos señalizadores (Weber, 2002), tal es el caso del AJ que se origina a partir del ácido graso poliinsaturado alfa-ácido linolénico (LA). Una vía posible de provisión de LA involucra la desaturación de los ácidos grasos poliinsaturados produciendo LA a partir del 18:2 (ácido linoleico) (León y Sánchez-Serrano, 1999). Modelos actuales postulan que diversas señales inducen la activación de fosfolipasas, las cuales liberarían el LA, el hecho de ello es que las primeras enzimas de la biosíntesis de JAs se localizan en cloroplastos. (Abdala y Cenzano 2006).

Al AJ se le han atribuido otras funciones además de la que tiene en los mecanismos de defensa, desarrollo floral y formación del tubérculo, entre estas funciones se encuentra la de inhibición de bacterias fitopatógenas.

### **Ácido salicílico.**

El ácido salicílico (AS) (o ácido 2-hidroxibenzoico) recibe su nombre de *Salix*, la denominación latina del sauce, de cuya corteza fue aislado por primera vez. Fue sintetizado por primera vez por Charles Frédéric Gerhardt en 1853 y luego en forma

de sal por Hermann Kolbe en 1859. Hubo que esperar hasta 1897 para que el químico alemán Felix Hoffmann, de la casa Bayer, consiguiera sintetizar al ácido salicílico con gran pureza. Sus propiedades terapéuticas como analgésico y antiinflamatorio fueron descritas en 1899 por el farmacólogo alemán Heinrich Dreser, lo que permitió su comercialización.

### **Funcionamiento en las plantas**

El funcionamiento del AS es relativamente sencillo, es el mensajero interno natural de las plantas, lo que significa es que cuando una planta es atacada por una enfermedad o plaga, ella genera AS para advertirle al resto de la planta que está siendo afectada y que suba sus defensas. Teniendo esto en mente, se sabe por qué el AS aplicado externamente tiene el efecto de activador de resistencia. La debilidad del AS es que su vida dentro de la planta es muy corta, siendo inmovilizada en las paredes celulares (Rangel *et al.*, 2010).

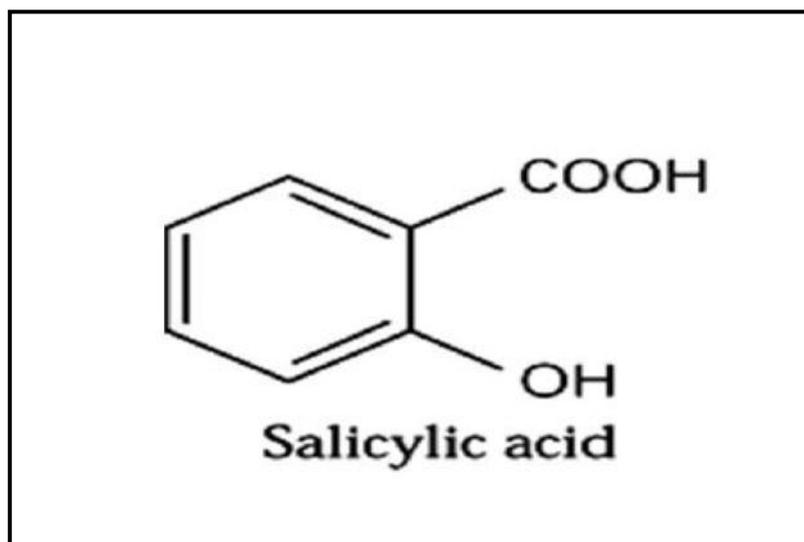


Figura 5. Estructura química del ácido Salicílico  
( <http://www.occc.edu>)

El ácido salicílico forma parte de un amplio grupo de compuestos sintetizados en plantas denominados fenólicos, los cuales poseen en su estructura química un grupo hidroxilo unido a un anillo aromático (Fig. 5). Los compuestos fenólicos participan en muchas funciones metabólicas en plantas, como son la síntesis de lignina, actividad alelopática y en algunos casos en la biosíntesis de compuestos relacionados a la defensa como las fitoalexinas. (Rangel *et al.*, 2010).

El AS participa en procesos como la germinación de semillas, crecimiento celular, respiración, cierre de estomas, expresión de genes asociados a senescencia, repuesta a estrés abiótico y de forma esencial en la termogénesis, así como en la resistencia a enfermedades (Humphreys y Chapple, 2002; Vlot *et al.*, 2009).

Adicionalmente, se ha descrito que en algunos casos el efecto del AS dentro del metabolismo de las plantas puede ser de forma indirecta ya que altera la síntesis y/o señalización de otras hormonas que incluyen la vía del ácido jasmónico (AJ), etileno (ET), y auxinas (Lorenzo y Solano 2005; Broekaert *et al.*, 2006; Loake y Grant 2007; Balbi y Devoto 2008). En relación a la biosíntesis del AS, se ha descrito que puede ser generado por dos distintas vías enzimáticas que requieren del metabolito primario corismato (Garcion y Métraux, 2006; Chen *et al.*, 2009). El aminoácido L-fenilalanina, puede ser convertido en ácido salicílico por dos vías, una mediante el intermediario benzoato y la otra mediante el ácido cumárico, a través de una serie de reacciones enzimáticas

## **Actinomicetos**

Los actinomicetos constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos, son bacterias Gram-positivas, que se caracterizan por formar filamentos ramificados y parcialmente ácido resistentes, ampliamente distribuidas en el suelo, así como también en otros ambientes naturales del mundo. Inicialmente fueron clasificadas como hongos pero, debido a los estudios de los componentes de su pared celular, se reclasificaron dentro del orden de los *Actinomycetales* (Uzcátegui, *et al.*, 2009). Este

orden comprende 63 géneros constituyendo, aproximadamente del 20-60% de la población microbiana del suelo (Ezziyani *et al.*, 2004).

El grupo abarca géneros con una amplia variedad de morfologías que se extiende desde el coco (*Micrococcus*) y bacterias en forma de bacilos (por ejemplo *Arthrobacter*) hasta formas de fragmentación hifal (por ejemplo *Nocardia*), hasta géneros con un permanente micelio ramificado altamente diferenciado, (*Micromonospora*, *Streptomyces* y otros). Algunos géneros forman esporas que van desde zoosporas móviles a propágulos especializadas que resisten la desecación y el calor suave, pero que no tienen la organización y las propiedades marcadas de resistencia de la endospora bacteriana. Todas las familias actinomicetos fueron divididas en diez subórdenes (Stackebrandt *et al.*, 1997).

**Cuadro 1. Clasificación de los actinomicetos por (Stackebrandt *et al.*, 1997).**

<b>Clase: Actino bacteria; Subclase: Actinobacteridae; Orden: Actinomicetales</b>	
Suborden	Familia
<i>Micrococcineae</i>	<i>Micrococcaceae, Brevibacteriaceae, Cellulomonadaceae, Dermabacteriaceae, Dermatophilaceae, Intrasporangiaceae, Jonesiaceae, Microbacteriaceae, Promicromonosporaceae</i>
<i>Actinomycineae</i>	<i>Actinomycetaceae</i>
<i>Frankineae</i>	<i>Frankiaceae, Acidothermaceae, Geodermatophilaceae, Microsphaeraceae, Sporichthyaceae Propionibacterineae</i>
<i>Propionibacterineae</i>	<i>Propionibacteriaceae, Nocardioidaceae</i>
<i>Streptomycineae</i>	<i>Streptomycetaceae</i>
<i>Corynebacterineae</i>	<i>Corynebacteriaceae, Dietziaceae, Gordoniaceae, Mycobacteriaceae, Nocardiaceae, Tsukamurellaceae</i>
<i>Micromonosporineae</i>	<i>Micromonosporaceae</i>
<i>Streptosporangineae</i>	<i>Streptosporangiaceae, Nocardiosaceae, Thermomonosporaceae</i>
<i>Pseudonocardineae</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>
<i>Glycomycineae</i>	<i>Glycomycetaceae</i>

La identificación y caracterización biológica y molecular de microorganismos útiles como agentes de biocontrol, productores de compuestos bioactivos o sustitutos de antibióticos, ha sido de gran interés para la medicina y la agricultura moderna. Dentro de sus características particulares presentan un olor típico a suelo húmedo, debido a su actividad metabólica y a la producción de terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares con las que son capaces de degradar materia orgánica de origen vegetal y animal (Ezzyyani *et al.*, 2004).

### **Condiciones de crecimiento**

La adición de la materia orgánica a los suelos estimula la multiplicación y actividad de los actinomicetos. Los suelos alcalinos y neutros resultan ser más favorables para el desarrollo de esta bacteria; el rango de pH óptimo para las actividades de estos microorganismos se encuentra entre 6.5 y 8.0. Los actinomicetos al ser principalmente aerobios se desarrollan favorablemente en suelos bien aireados; suelos con humedades entre el 80 y 90% son perjudiciales para el desarrollo de los actinomicetos (Farfan y Gutiérrez, 2009).

### **Composición química**

Las células de los actinomicetos químicamente están compuestas por un 45% de carbono y un 10% de nitrógeno, el contenido lipídico varía de un 12 a un 65%, su pared celular difiere químicamente según los grupos, básicamente se diferencian siete tipos de pared celular teniendo en cuenta el aminoácido diaminado, los azúcares característicos y la presencia de glicina en el puente interpeptídico (Titus y Pereira, 2007).

**Cuadro 2. Tipos de paredes celulares de los actinomicetos (Serrano y Sandoval, 2008)**

Tipos de pared celular	Aminoácidos Diaminados	Azúcares característicos	Glicina en el puente interpeptídico	Microorganismos representativos
I	L-DAP	NA	+	<i>Streptomyces intrasporangium</i>
II	m-DAP	NA	+	<i>Actinoplanes</i> <i>Micromonospora</i>
III	m-DAP	Madurosa	+	<i>Microbispora</i> , <i>Frankia</i>
IV	m-DAP	Arabinosa- Galactosa	-	<i>Corynebacterium</i> <i>Nocardia</i>
V	N.A	N.A	-	<i>Actinomyces israelii</i>
VI	N.A	Galactosa	-	<i>Oerskovia turbata</i> <i>Cellulomonas</i>
VII	DAP	NA	+	<i>Agromyces</i>

NA (no aplicable, o bien no se detecta un azúcar diferencial); DAB (Ácido Diaminobutírico); DAP (Ácido Diaminopimélico).

### Control biológico

La ecología microbiana se ha convertido en una alternativa biológica para el control de plagas de plantas. El control biológico se encuentra dividido en efectos directo e indirectos, en los efectos directos se presenta competencia por nutrientes o por espacio, producción de enzimas líticas, antibióticos y parasitismo.

Cuando se generan cambios biológicos y bioquímicos en las plantas tales como tolerancia al estrés y mayor adsorción de nutrientes inorgánicos, el control biológico está dado por efectos indirectos los cuales incrementan resistencia por parte de la planta ante el patógeno (Gohel *et al.*, 2006).

El uso de agentes químicos para el control de patógenos ha provocado la resistencia en el control de los mismos, con el fin de reducir el uso de estos y disminuir problemas ambientales se ha estudiado el control biológico en el tratamiento de enfermedades causadas por fitopatógenos (Compant *et al.*, 2005).

Los actinomicetos son un gran reservorio de antibióticos y metabolitos bioactivos de los cuales una gran parte son excelentes agentes de biocontrol para proteger a las plantas contra fitopatógenos, algunos se emplean como agentes antitumorales, inhibidores enzimáticos y agentes contra parásitos, de ahí su importancia como agentes de metabolitos bioactivos para el control de microorganismos patógenos de plantas, animales e incluso del hombre. Aunque miles de antibióticos y metabolitos bioactivos han sido descritos, se cree que estos representan solo una fracción de los compuestos bioactivos producidos por los actinomicetos (González y Robles, 2009).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación del experimento

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro ubicada en Saltillo, Coahuila, México.

### Obtención de los patógenos

Las cepas bacterianas, *Clavibacter michiganensis*, subsp., *michiganensis*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* y *Pectobacterium carotovorum* subsp., *carotovorum* utilizadas en los bioensayos pertenecen a la colección de el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología Agrícola de esta Universidad.

### Obtención de los extractos

Los extractos de ácido jasmónico y ácido salicílico se obtuvieron de la fermentación de *Botryodiplodia theobromae* y *Pseudomonas fluorescens* éstos fueron proporcionados por la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila. Los filtrados de sobrenadante de la propagación de actinomicetos se obtuvieron de los aislamientos APC70 (A70) y ASH53 (A53), aislados de caña de azúcar y suelo de hormiguero respectivamente, mismos que han demostrado actividad antagónica *in vitro* contra hongos fitopatógenos.

## **Preparación y esterilización de los medios de cultivo y soluciones**

Se preparó caldo nutritivo (CN) de la marca Bioxón con las indicaciones del fabricante en matraces y se prepararon tubos con solución salina fisiológica al .85% para realizar las diluciones necesarias. Se esterilizaron en autoclave 121°C/15 min. Se almacenaron hasta su uso.

## **Cultivo de bacterias**

En matraces conteniendo CN fueron inoculados con cada una de las bacterias, posteriormente se colocaron en una incubadora con agitación a 100 rpm, a tiempo y temperatura óptima para cada una de las bacterias (24 - 48 horas) a 30°C.

## **Preparación del medio KB**

La evaluación de los extractos de ácido jasmónico, ácido salicílico y de *Actinomicetes* fue realizada mezclando diferentes concentraciones de los extractos con el medio de cultivo King de B (KB) preparado y esterilizado siguiendo las especificaciones del fabricante y colocado en cajas petri, se dejaron solidificar y se conservaron en refrigeración hasta su uso.

## **Diferentes técnicas empleadas para la siembra de las bacterias**

### **Ensayo 1. Técnica de discos de papel impregnados**

Este procedimiento fue utilizado para evaluar de manera directa los extractos. Se impregnaron discos de 5 mm de diámetro de papel filtro whatman No 40, en cada uno de los extractos a evaluar durante 30 min, y se dejaron secar al aire en ambiente estéril.

En cajas petri conteniendo medio de cultivo KB, se sembraron las bacterias por la técnica de extensión en superficie, posteriormente se colocaron los discos antes mencionados en los cuatro puntos cardinales de la caja petri.

Las placas fueron incubadas a 30°C 24-48 h, posteriormente se observó el halo de inhibición (Fig.6).

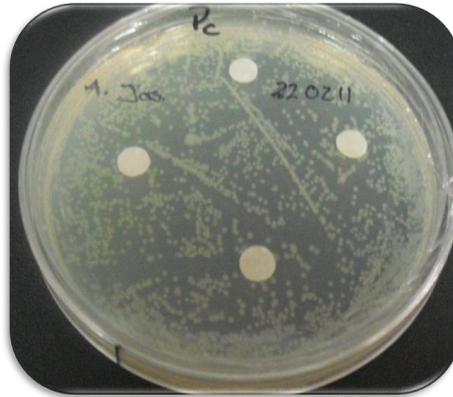


Figura 6. Técnica de discos impregnados

## Ensayo 2. Técnica del Medio envenenado

El Agar KB esterilizado fue colocado en cajas petri conteniendo a concentraciones de 250, 500, 750 y 1000  $\mu$ l por placa de cada uno de los extractos, mezclando perfectamente el extracto con el medio de cultivo, se dejó solidificar y se colocaron en incubadora por 24 h como prueba de esterilidad. Posteriormente las placas fueron sembradas por difusión en placa con 100  $\mu$ l de cada una de las bacterias fitopatógenas a evaluar a una concentración de  $1 \times 10^4$  UFC/ml, y se incubaron a 30°C por 24-48 h. Posteriormente se realizó el conteo de colonias para la evaluación.

### **Ensayo 3. Técnica de diluciones**

Para esta técnica se realizaron diluciones seriadas de los extractos a las concentraciones de 1:10, 1:100 y 1:1000 en caldo nutritivo, posteriormente se sembraron con 100 µl de una concentración bacteriana de  $1 \times 10^4$  UFC/ml. Se incubaron en agitación a 100 rpm durante 24-48h a 30°C. Se observó el efecto de los extractos en el crecimiento o inhibición de las bacterias por la turbidez del medio comparada con el testigo. Esta acción fue catalogada mediante una escala visual de turbidez, la cual se interpreta como: (-) sin crecimiento, (+) crecimiento mínimo, (++) crecimiento regular y (+++) crecimiento abundante.

### **Análisis de datos**

Los datos obtenidos de porcentajes de inhibición de las bacterias a diferentes concentraciones fueron analizadas por una prueba de comparación de medias según Tukey ( $P \leq 0.05$ ) mediante un diseño completamente al azar. Donde los extractos fueron los tratamientos y la unidad experimental fue una caja petri. Los resultados se analizaron con el programa estadístico SAS versión 2002.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Acorde a los procedimientos de bioensayos de evaluación se encontró que con el uso de la técnica de discos impregnados con los extracto evaluados ninguno de ellos demostró actividad para las bacterias fitopatógenas en estudio, descartándose esta técnica como procedimiento de evaluación de actividad antagónica, probablemente la absorción del extracto no fue suficiente para causar efecto inhibitorio, por lo que es necesario concentrarlo.

Empleando la técnica de medio envenenado y la dilución de caldo nutritivo no se apreció actividad alguna para *X. axonopodis* y *P. carotovorum* ambas especies Gram-negativas, por lo que se demuestra su falta de actividad para estas especies y grupos, mientras que con estas mismas dos técnicas se observaron efectos de inhibición satisfactorios para *C. flaccumfaciens* y *C. michiganensis*, especies Gram-positivas.

Con la técnica de medio envenenado se observan altos porcentajes de inhibición con el ácido jasmónico contra *C. flaccumfaciens* (Cff) (Cuadro 3). De acuerdo al análisis estadístico, indica que los mejores tratamientos son a concentraciones de 500 y 1000 $\mu$ l, ya que son significativamente iguales pero diferentes en comparación con el testigo, tal y como se observa en la Figura 7, en la cual se muestra de manera notable la inhibición de la bacteria a diferentes concentraciones del extracto, destacándose un 100% de inhibición a 1000 $\mu$ l del extracto por cada placa, reduciéndose paulatinamente conforme se reduce la concentración.

Estos datos concuerdan con lo reportado por Pozo *et al.*, 2005 quienes afirman que el ácido jasmónico presenta una respuesta inhibitoria al ataque contra patógenos, así como los reportados por Herrera 2008; Abdala y Cenzano, 2006;

Lorenzo y Solano, 2005, quienes afirman que el ácido jasmónico tiene efecto inhibitorio sobre bacterias fitopatógenas, aunque no existen datos realizados en laboratorio, el resultado obtenido confirma este hecho, de que el extracto de ácido jasmónico presenta porcentajes altos de antagonismo *in vitro* para las bacterias *C. flaccumfaciens* y *C. michiganensis* evaluadas.

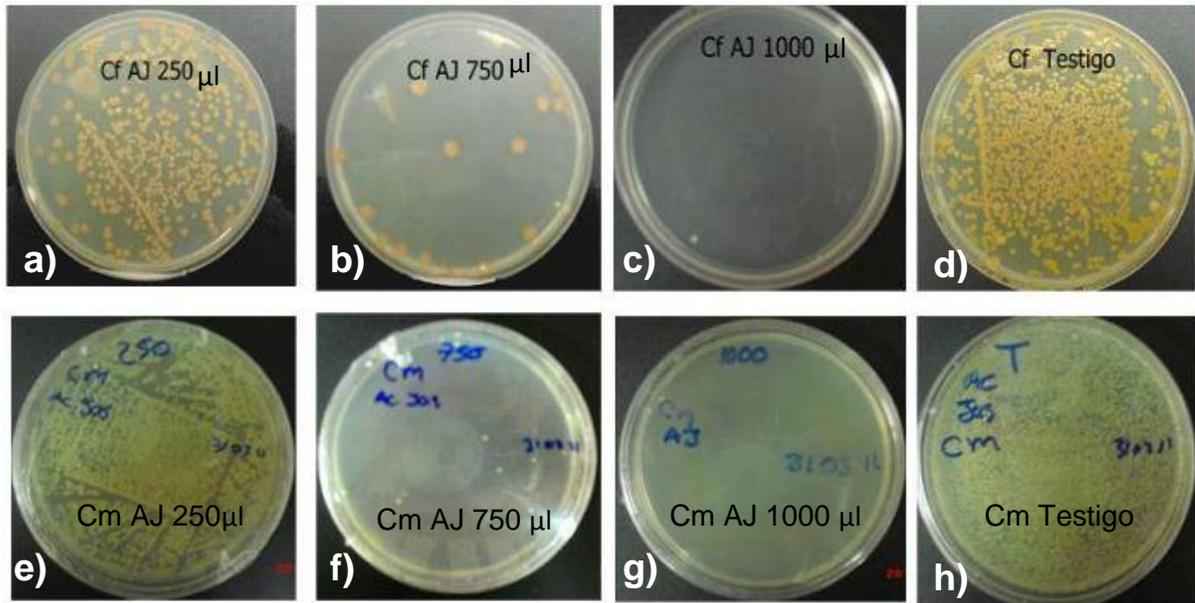
La evaluación del extracto de ácido jasmónico para *C. michiganensis* (Cmm) mostro un efecto similar que en *C. flaccumfaciens* (Cff) ya que en dosis de 1000 y 750 µl por placa de cultivo se inhibió al 100% y 97% respectivamente a esta bacteria, como se muestra en el Cuadro 3 donde estadísticamente ( $P \leq 0.05$ ) los tratamientos con base en el extracto del ácido jasmónico, inhiben el crecimiento de *C. michiganensis* (Cmm) en proporción marcada respecto del crecimiento en el testigo.

El efecto descrito es posible de apreciarlo a simple vista ya que el crecimiento colonial de *C. michiganensis* se observa de forma muy clara en el testigo mientras que éste es nulo en las placas conteniendo el extracto en concentraciones 1000 y 750 µl por placa de cultivo. (Fig.7)

Cuadro 3. Porcentaje de inhibición de las bacterias *Curtobacterium flaccumfaciens* pv *flaccumfaciens* (Cff) y *Clavibacter michiganensis* subsp., *michiganensis* (Cmm) causado por el extracto de ácido jasmónico a diferentes concentraciones

Tratamientos	Concentración de la bacteria/mL	% de Inhibición			
		<i>Cf</i>	( $P \leq 0.05$ )	<i>Cm</i>	( $P \leq 0.05$ )
AJ. 1000µl	1x10 <sup>4</sup>	100.000	A	100.000	A
AJ. 750µl	1x10 <sup>4</sup>	95.900	A	97.433	A
AJ. 500µl	1x10 <sup>4</sup>	61.233	B	62.700	B
AJ. 250µl	1x10 <sup>4</sup>	48.367	C	3.000	C
Testigo	1x10 <sup>4</sup>	0	D	0	C

DSM=11.274, CV= 6.866829 \*Media de tres repeticiones de ensayos en placa para *cf*  
 DSM= 6.1925, CV= 4.378937 \*Media de tres repeticiones de ensayos en placa para *Cmm*  
 Valores con la misma letra son significativamente iguales



**Figura 7. Inhibición de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* y *Clavibacter michiganensis* creciendo en medio KB con diferentes concentraciones del extracto del ácido jasmónico. Cff= *Curtobacterium flaccumfaciens* pv., *flaccumfaciens*, Cmm = *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*, AJ= extracto de ácido Jasmónico, µl= micro litros del extracto**

a) Inhibición de Cff a una concentración de 250µl del extracto de AJ/placa, b) inhibición de Cff, a una concentración de 750 µl del extracto de AJ/placa, c) 100% de inhibición de Cff a concentración de 1000µl del extracto de AJ/placa , d) Crecimiento de la bacteria Cff (Testigo) conteniendo solamente medio de cultivo KB, e) Inhibición de Cmm a una concentración de 250 µl del extracto AJ/placa, d) Inhibición de la bacteria Cmm a una concentración de 750µl del extracto de AJ/placa, g) Inhibición al 100% de Cmm conteniendo 1000µl del extracto de AJ/placa de cultivo, h) Crecimiento máximo en placa de la bacteria Cmm (Testigo) en medio de cultivo KB sin concentración alguna del extracto de AJ.

El porcentaje de inhibición de *C. michiganensis* (Cmm) producidos por los sobrenadantes de actinomicetos fue alto, ya que las dos cepas de actinomicetos A53 y A70 inhiben al 100% la bacteria en las placas de cultivo en las máximas dosis utilizadas y resultando que el aislado A70 mostró una diferencia al presentar

porcentajes de inhibición altos (95%) a la menor dosis de prueba, que fue de 250  $\mu$ l/placa de cultivo (Cuadro 4). Por lo que éste actinomiceto es un aislado potencial para empleo en el control de ésta bacteria fitopatógena, comprobando con ello la bondad de estos microorganismos para biosíntesis de metabolitos bioactivos.

Por su parte González y Robles, (2009), afirman que los actinomicetos desempeñan un papel importante como agentes de biocontrol de patógenos tales como hongos y bacterias. Esto coincide con lo descrito por Leiva *et al.*, (2004), quienes reportan que de 62 cepas aisladas de actinomicetos, 36 (58.1%) tuvieron actividad antimicrobiana principalmente en bacterias Gram positivas y algunas bacterias Gram-negativas usando la técnica de impregnado de discos con el extracto.

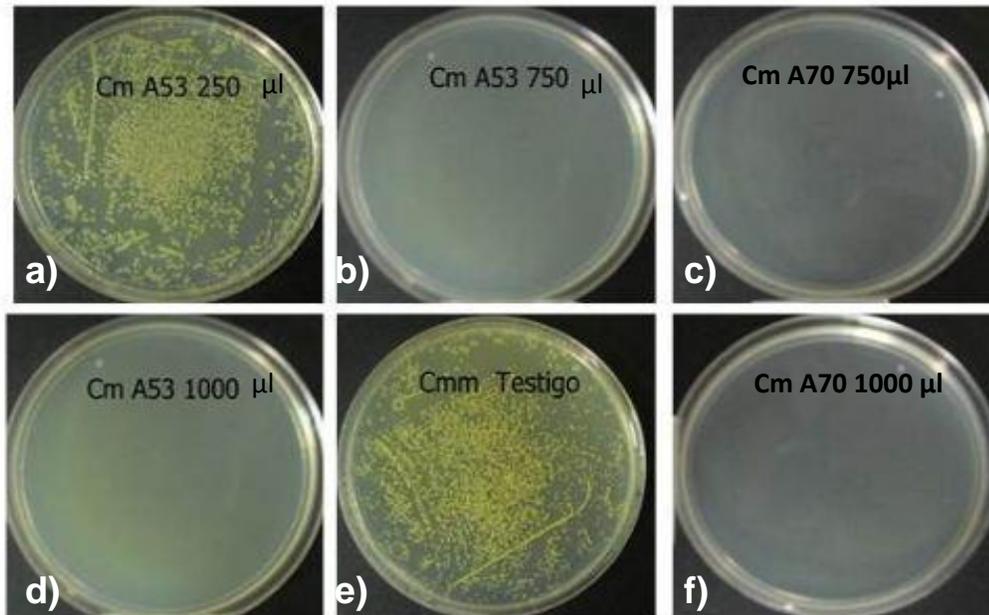
Cuadro 4. Porcentaje de inhibición de la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* causado por el extracto de sobrenadante de las cepas de los actinomicetos ASH53 Y APC70.

Tratamientos	Concentración de la bacteria/mL	% de Inhibición			
		A53	(P $\leq$ 0.05)	A70	(P $\leq$ 0.05)
1000 $\mu$ l	1x10 <sup>4</sup>	100.000	A	100.000	A
750 $\mu$ l	1x10 <sup>4</sup>	99.567	A	100.000	A
500 $\mu$ l	1x10 <sup>4</sup>	.97.100	A	100.000	A
250 $\mu$ l	1x10 <sup>4</sup>	14.333	B	95.133	B
Testigo	1x10 <sup>4</sup>	0	B	0	C

DSM= 17.461, CV= 10.44686 \*Media de tres repeticiones de ensayos en placa con el extracto A53

DSM= 2.8599, CV=1.346720 \*Media de tres repeticiones de ensayos en placa con el extracto A70

Valores con la misma letra son significativamente iguales



**Figura 8. Inhibición de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*** creciendo en medio KB con diferentes concentraciones de los extractos de actinomicetos A53 y APC70. A53= (extracto de la cepa de actinomicetos ASH53), A70= (extracto de la cepa de actinomicetos APC70), AJ= (extracto de ácido Jasmónico), Cmm= (*Clavibacter michiganensis* subsp., *michiganensis*), µl= (microlitros del extracto por placa de cultivo.).

a) Inhibición de Cmm a una concentración de 500µl del extracto de actinomicetos A53 de en medio de cultivo KB , b) Inhibición de Cmm al 100% en concentraciones de 750µl del extracto de AJ/placa de cultivo, c) Inhibición completa de Cmm con el extracto A70 en concentración de 750µl en placa, d) Inhibición al 100% Cmm en concentración de 1000µl del extracto A53 por placa, e) Cmm en medio KB sin aplicación alguna del extracto (Testigo) y f) Inhibición del 100% de Cmm con el extracto A70 en concentración de 1000µl por placa.

Los sobrenadantes de crecimiento de la propagación de los aislamientos de los actinomicetos de clave A53 y A70 mostraron también una alta actividad antagonista sobre la bacteria en estudio *C. flaccumfaciens* (Cff) (Cuadro 5); el porcentaje de inhibición fue diferente al testigo ( $P \leq 0.05$ ) sin embargo el 100% se

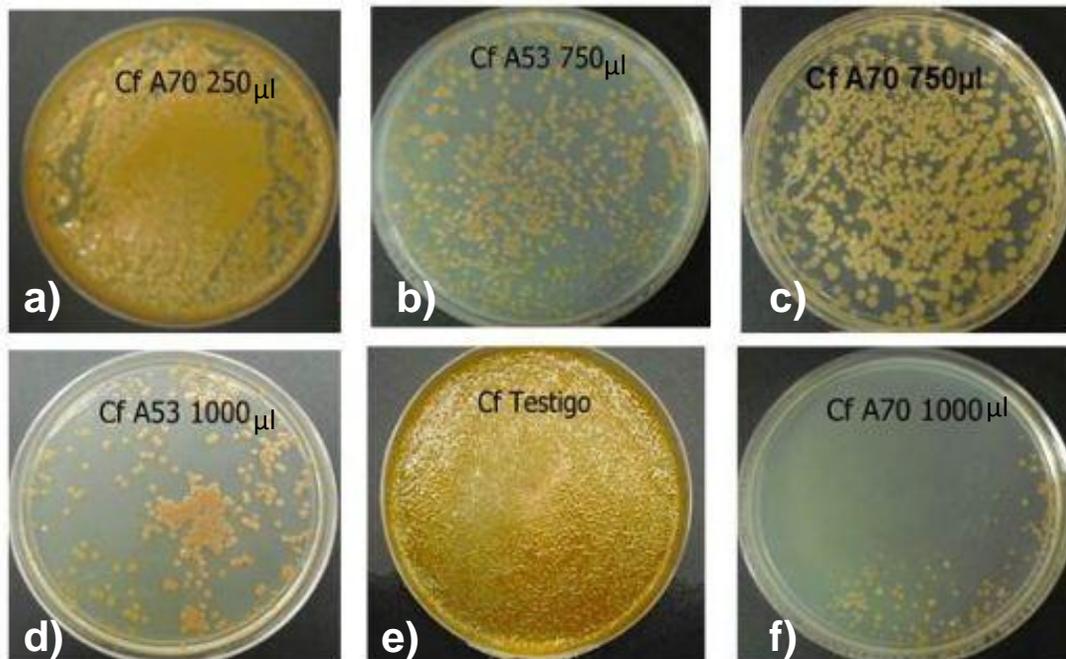
logró a la dosis de 1000µl del extracto en ambas cepas de actinomicetos. Fue notorio que el crecimiento de la bacteria fue mínimo a las dosis de 1000 y 750µl pero sin llegar a la inhibición completa, tal y como se muestra en la Figura 9, donde se observa el crecimiento mínimo de *C. flaccumfaciens*.

Estos resultados con las dos cepas de actinomicetos coinciden con Pisano *et al.*, (1992) quienes encontraron que de 116 cepas de actinomicetos capaces de degradar quitina, 85 (73%) fueron bioactivos; la actividad primordial fue contra bacterias Gram-positivas (68%) y solo un 11% fue activa contra bacterias Gram-negativa. Además encontraron que el 47% de los actinomicetos mostraron actividad contra hongos. De igual forma Castillo *et al.*, (2001) quienes obtuvieron hasta un 87.05% de inhibición *in vitro* de *Rhizoctonia solani*, con actinomicetos aislados de la rizósfera de papa. Evangelista y Moreno 2007, reportaron que de los microorganismos crecidos en cultivos axénicos, los actinomicetos eran los que más producían compuestos inhibidores del crecimiento de las bacterias patógenas, en particular cerca del 50% de la cepas aisladas presentaron algún compuesto activo, principalmente contra bacterias Gram-positivas.

Cuadro 5. Porcentaje de inhibición de la bacteria *Curtobacterium flaccumfaciens* pv *flaccumfaciens* causado por el extracto de sobrenadante de las cepas de actinomicetos ASH53 y APC70

Tratamientos	Concentración de la bacteria/mL	% de Inhibición			
		A53	(P≤ 0.05)	A70	(P≤ 0.05)
1000µl	1x10 <sup>4</sup>	74.133	A	88.000	A
750µl	1x10 <sup>4</sup>	48.867	B	44.667	B
500µl	1x10 <sup>4</sup>	18.900	C	6.367	C
250µl	1x10 <sup>4</sup>	2.367	D	0	C
Testigo	1x10 <sup>4</sup>	0	D	0	C

DSM=14.818, CV= 19.11164 \*Media de tres repeticiones de ensayos en placa con el extracto A53  
 DSM=8.0208, CV= 10.73430 \*Media de tres repeticiones de ensayos en placa con el extracto A70  
 Valores con la misma letra son significativamente iguales

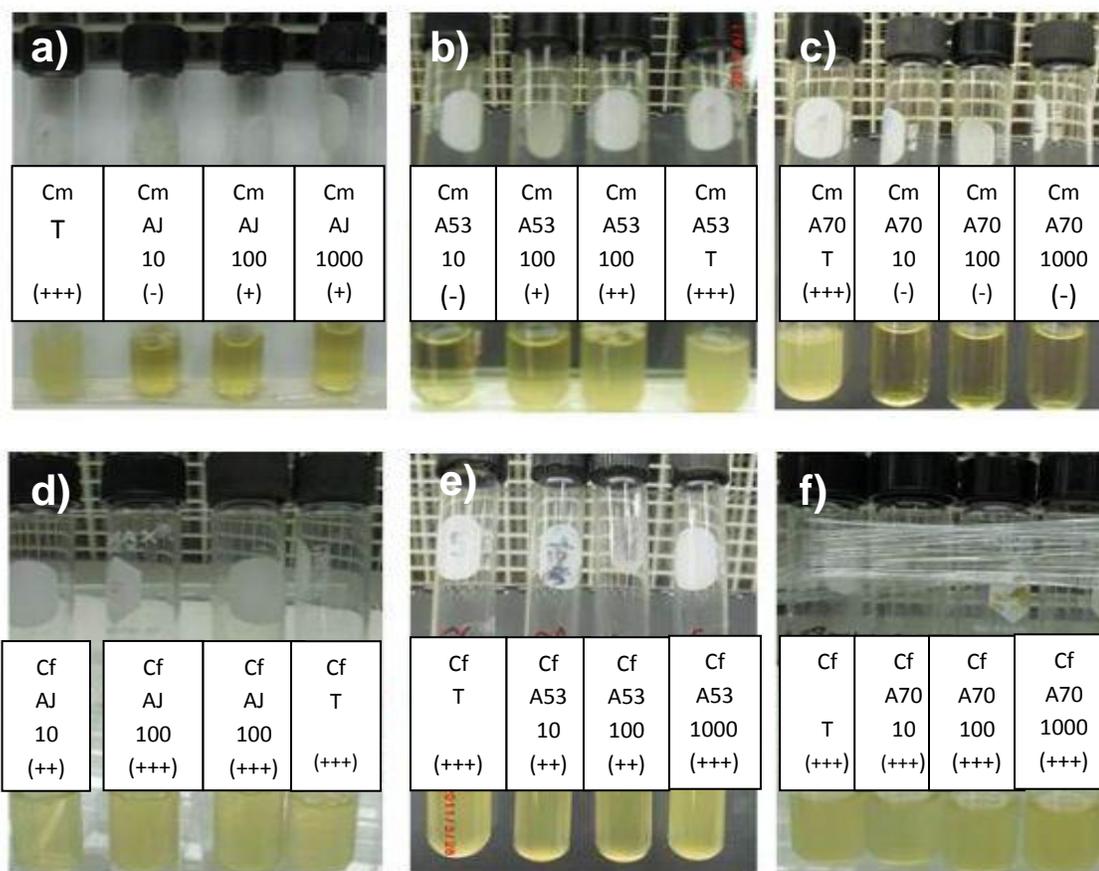


**Figura 9. Inhibición de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*** creciendo en medio KB con diferentes concentraciones de los extractos de actinomicetos ASH53 y APC70. A53= (extracto de la cepa de actinomicetos ASH53), A70= (extracto de la cepa de actinomicetos APC70), AJ= (extracto de ácido Jasmónico), Cff= (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv., *flaccumfaciens*), µl= (microlitros del extracto por placa de cultivo.).

a) Crecimiento de Cff conteniendo 250µl de extracto A53 por placa, b) Inhibición de la bacteria conteniendo 750µl del extracto A53 por placa, c) Inhibición de Cff a una concentración de 750µl del extracto A70 por placa, d) Inhibición de Cf con 1000µl del extracto A53 por placa, e) Placa con medio KB tomada como testigo sin ninguna concentración de extractos, f) Inhibición de la bacteria con 1000µl del extracto A70 por placa.

La confrontación de los tres extractos experimentales en la técnica de diluciones en tubo contra las dos bacterias fitopatógenas en estudio arrojó resultados interesantes ya que se demostró indudablemente que los extractos no permitieron el crecimiento de la bacteria en el medio líquido (Fig.10), encontrándose que los

actinomicetos A70 y A53 inhibieron a la bacteria *C. michiganensis*, presentándose mayor grado de inhibición con la cepa A70; en el caso del actinomiceto A53 y el ácido jasmónico la inhibición apreciable fue menor. Para la bacteria *C. flaccumfaciens* se observó crecimiento regular para A53, seguidamente del ácido jasmónico y para el A70 el crecimiento fue abundante (+++) igual al testigo donde no se añadió el extracto



**Figura 10. Actividad antagonista en caldo nutritivo de los extractos de ácido jasmónico, actinomicetos A53 y A70 contra las bacterias *Clavibacter michiganensis*, y *Curtobacterium flaccumfaciens*. Cm (*Clavibacter michiganensis*) Cf= *Curtobacterium flaccumfaciens* 10,100 y 1000 = No de diluciones del extracto, AJ = Acido jasmónico, A53 =extracto ASH53 de actinomicetos, A70 = extracto APC70 de actinomicetos, T = Testigo, (-) Sin crecimiento, (+) = Crecimiento mínimo, (++) Crecimiento regular, (+++) Crecimiento abundante**

a) Diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000 $\mu$ l del extracto de AJ en medio de cultivo liquido, con 100 $\mu$ l de la bacteria Cmm por tubo de ensayo, b) Diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000 $\mu$ l del extracto A53 en medio de cultivo liquido con 100 $\mu$ l de la bacteria Cmm por tubos de ensayo, c) Diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000 $\mu$ l del extracto A70 y 100 $\mu$ l de la bacteria por cada tubo, d) Diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000 $\mu$ l del extracto de AJ y 100 $\mu$ l de la bacteria Cff por tubo de ensayo, e) Dilución 1:10, 1:100 y 1:1000 $\mu$ l del extracto A53 en medio de cultivo liquido con 100 $\mu$ l de la bacteria Cff por tubo de ensayo, f) Diluciones 1:10, 1:100l y 1:1000 $\mu$ l del extracto A70 en medio de cultivo liquido con 100 $\mu$ l de la bacteria Cff.

Si bien la inhibición observada fue variable dependiendo del procedimiento de evaluación, se comprobó la actividad de los extractos A53, A70 y ácido jasmónico en ambas bacterias fitopatógenas en estudio, descartando la impregnación de disco como procedimiento de determinación de actividad antagonista bajo las condiciones de trabajo.

## CONCLUSIONES

En las tres técnicas de evaluación de los extractos en estudio, ninguno de los extractos presentó actividad antagonista para *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Xanthomonas axonopodis* pv., *phaseoli*.

No se presentaron efectos antagónicos con el uso del procedimiento de impregnación de discos de papel en todas las bacterias evaluadas.

Acorde a los resultados obtenidos se comprobó que los extractos de *Botryodiplodia theobromae* conteniendo ácido jasmónico y los extractos de los aislados de los actinomicetos A70 y A53 presentaron efectos antagonistas de inhibición contra *Curtobacterium flaccumfaciens* pv., *flaccumfaciens* y *Clavibacter michiganensis* subsp., *michiganensis*.

El ácido jasmónico y los extractos acuosos de los actinomicetos A70 y A53 son una fuente alternativa para el control biológico de fitopatógenos foliares y radiculares.

## LITERATURA CITADA

- Abdala, G.** y Cenzano A. 2006. Biosíntesis de jasmonatos y participación en procesos del desarrollo vegetal.
- Balbi, V.** y A. Devoto. 2008. Jasmonate signalling network in *Arabidopsis thaliana*: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytologist*. 177: 301-318.
- Blée, E.** 2002. Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends in Plant Science* 7, 315-322.
- Broekaert, W.F.** Delaure, S.L. De Bolle, M.F. y B.P. Cammue. (2006). The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology*. 44: 393–416.
- Chen, Z.** Zheng, Z. Huang, J. Lai, Z. y B. Fan. (2009). Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signaling and Behavior*. 4: 493-496.
- Compant, S.,** Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., Barka, E. 2005. Use of plant Growth-promoting Bacteria for Biocontrol of plant diseases: Principles mechanisms of action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology*. 71:4951-4959.
- Creelman, R.A.,** Mullet, J.E. Oligosaccharins, brassinolides, jasmonates: nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression. *Plant Cell* . 1997, 9, 1211-1223.

- Ezziyani, M.,** Perez, C., Requena, M., Ahmed, A., Candela, M. 2004. Evaluación del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*. Anales de Biología. 26:61-68.
- Farfán, D.M.,** y Gutierrez C. 2009. Determinación de la actividad quinolítica de Cepas nativas de Actinomicetos y su efecto antagónico sobre microorganismos fitopatógenos.
- Garción, C.** y J.P. Métraux. 2006. Salicylic acid. In Plant Hormone Signaling. 24: 229–255. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.
- Gardan, L.,** Gouy, C., Christen, R., Samson, R. 2003. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavasculorum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov.. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53: 381-301.
- Gohel, V.,** Singh, A., Vimal, M., Ashwini, P., Chhatpar, H.S. 2006. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms African Journal of Biotechnology. 5:5472.
- González, A.C.,L,** Robles. 2009. Actinomycetes as biological control agents of phytopathogenic fungi. 2:64-71.
- González, M.A.,**Silva, Rojas, M.V.,Mascorro Gallardo, J.O. 2005. Ensayo *in vitro* del Péptido Antimicrobiano Melitina contra Diferentes Bacterias Fitopatógenas. Rev mexicana de fitopatología 3:176-182.
- Guss, A.** 1999. Erwinia carotovora. (5 de Marzo de 2006) [http://web.umn.edu/~microbio/BIO221\\_1999/E\\_carotovora.html](http://web.umn.edu/~microbio/BIO221_1999/E_carotovora.html)

- Herrera, M.** 2008. Estudio sobre la participación y función de moléculas señal en la regulación de la simbiosis micorriza arbuscular. Tesis Doctoral Universidad de Granada, P: 63
- Howe G.A.** 2004. The roles of hormones in defense against insects and disease. In: Davies PJ, ed. Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action. Cornell University, NY, USA, 610-634.
- Humphreys, J.M.** y C. Chapple. 2002. Rewriting the lignin roadmap. Current Opinion in Plant Biology. 5: 224-229.
- Hung chang, H.,** Hans Henning, M., Erickson, R.S., Chelle, C.D., Balasubramanian, P.M., Kiehn, F., and Conner, R.L. 2007 Resistance of common bean (*Phaseolus vulgaris L*) cultivars and germplasm lines to the purple variant of bacterial wilt (*Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens*). Plant pathol. Bull 16:91-95
- Kucharek, T.;** J. Bartz: 2000. Bacterial Soft Rot of Vegetables and Agronomic Crops, Plant Pathology Fact Sheet 2:12-18.
- Leiva, P.S.,** Yañez, M., Zaror, L., Rodriguez, H., Garcia, H. 2004. Antimicrobial activity of actinomycetes isolated from aquatic environments in Southern Chile. Rev Med Chile;132:151-159.
- León J,** Sánchez-Serrano JJ. 1999. Molecular biology of jasmonic acid biosynthesis in plants. Plant Physiology and Biochemistry 37, 373-380.
- Loake, G.** y M. Grant. (2007). Salicylic acid in plant defence-the players and protagonists. Current Opinion in Plant Biology. 10: 466-472.

- Lorenzo, O.** y R. Solano. (2005). Señalización de ácido jasmónico e interacciones con otras hormonas. *Biojournal.net*. 1: 1-16.
- Navarrete** y Acosta. 2000, Genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Resistentes a *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* de México
- Nazari, F.**, Niknam, G. R., Ghasemi, A., Taghavi, S. M., Momeni, H. and Torabi, S. 2007. An Investigation on Strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in North and North West of Iran. *Journal of Phytopathology*. 155:563–569
- Peñalbert, R.**, Liop, P., Marco, Noales E., López, M. 2009. bacterias fitopatógenas, Instituto Valenciano de investigaciones agrarias.
- Pozo M.J.**, Van Loon LC, Pieterse CMJ. 2005. Jasmonates-signals in plant-microbe interactions. *Journal of Plant Growth Regulation* **23**, 211-222.
- Ramirez,** Vallejo, P., Castillo González, F., Cruz Izquierdo, F., Tlapal Bolaños, B., Garcia Espinoza, R., Sandoval S. 2001. Produccion masiva de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Agrociencia* 35:575-581.
- Rangel, G.** Castro, E. Beltrán, E. Reyes, H. y García, E. (2010). El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. 4:90-93
- Reinoso,** Y., Casadesús, L., Garcia, A., Gutieerez, J., Alvarez, V. 2006. Aislamiento, Selección e Identificación de Bacterias del Genero *Bacillus* Antagonistas de *Pectobacterium carotovorum*. 3:187-191.
- Samson,** R., Legendre, J.B., Christen, R., Fischer-Le Saux, M., Achouak, W., Gardan, L. (2005). Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder

*et al.* 1953) Brenner *et al.* 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 1415-1427.

**Seo, H.S.**, Song, J.T., Cheong, J.J., Lee, Y.H., Lee, Y.W., Hwang, I., Lee, J.S., y Choy, Y.D. 2001. jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key Enzyme for jasmonate-regulated plant responses. Proceedings oh the National Academy of escience of the United States of America 98:4788-4793

**Stackebrandt, E.**, Rainey, F. A. and Ward-Rainey, N. L. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 479-491.

**Ting- Fang. H.**, Hung-Chang, H., Hans Henning, M., and R, Scott E .2003. a rapid Indoor technique for Screening Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L) for Resistance to Bacterial Wilt [*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *Flaccumfaciens* (hedges) Collins and Jones] *Rev Mexicana de Fitopatologia* 21: 364-369.

**Toth, I. K.** Bell; M. Choleva; P. Birch: 2003. Soft Rot Erwiniae from Genes to genomes. *Molecular Plant Pathology* 4:17-30.

**Titus, A.**, Pereira, G.N. 1999-2007. The role of Actinomycetes in coffee plantation ecology.(Online).<http://www.ineedcoffee.com/05/actinomycetes/print.asp>. Acceso 21 de enero de 2008.

- Uzcategui, M.** Serrano, J.A. Boiron, P. Rodríguez ,V. Couble, A. Moniée, D. Sánchez, K. Sandoval, H. Reviakina, V.Mercedes, M. y Mendoza, M. 2009 Clasificación e Identificación de Especies de Actinomicetos: Un Estudio Fenotípico Comparativo 29:91-97
- Vlot, A.C.** Dempsey, D.A. y D.F. Klessig. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. Annual Review of Phytopathology. 47: 177-206.
- Weber H.** 2002 Fatty acid-derived signals in plants. Trends in Plant Science 7, 217-224.
- Zapata, M.,** y Gaud, R. 2001. Estrategias para diferenciar *Xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli* con sales inorgánicas. Agronomía Mesoamericana 12(1): 01-07. 2001

**Imágenes disponibles en:**

[http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Clavibacter\\_m\\_michiganensis/CORBMI\\_map.htm](http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Clavibacter_m_michiganensis/CORBMI_map.htm)

[http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Curtobacterium\\_flaccumfaciens/CORBFL\\_map.htm](http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Curtobacterium_flaccumfaciens/CORBFL_map.htm)

[http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Xanthomonas\\_phaseoli/XANTPH\\_map.htm](http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Xanthomonas_phaseoli/XANTPH_map.htm)

<http://www.occc.edu/jmckenna/Mckenna/images/aspirin-reactants.gif>

[http://2.bp.blogspot.com/\\_me39fAf7ZBY/TUxK60UMG7I/AAAAAAAAAbU/x\\_aS2cTK6pM/s320/jasmonico.gif](http://2.bp.blogspot.com/_me39fAf7ZBY/TUxK60UMG7I/AAAAAAAAAbU/x_aS2cTK6pM/s320/jasmonico.gif)

[http://aulavirtual.usal.es/aulavirtual/Demos/microbiologia/unidades/documen/uni\\_02/56/fig/fig320.jpg](http://aulavirtual.usal.es/aulavirtual/Demos/microbiologia/unidades/documen/uni_02/56/fig/fig320.jpg)

## APÉNDICE

**Cuadro 1.** Análisis de varianza de la inhibición de la bacteria *Curtobacterium flaccumfaciens* con el extracto de Ácido Jasmónico

<b>F.V</b>	<b>G.L</b>	<b>S.C</b>	<b>C.M</b>	<b>F-Valor</b>	<b>Pr&gt; F</b>
Tratamientos	4	19858.84667	4964.71167	282.03	<.0001
Error	10	176.03333	17.60333		
Total	14	20034.88000			

CV= 6.866829

**Cuadro 2.** Análisis de varianza de la inhibición de la bacteria *Curtobacterium flaccumfaciens* con el extracto de actinomicetos ASH53

<b>F.V</b>	<b>G.L</b>	<b>S.C</b>	<b>C.M</b>	<b>F-Valor</b>	<b>Pr&gt; F</b>
Tratamientos	4	12251.81733	3062.95433	100.73	<.0001
Error	10	304.08000	3062.95433		
Total	14	12555.89733			

CV=19.11164

**Cuadro 3.** Análisis de varianza de la inhibición de la bacteria *Curtobacterium flaccumfaciens* con el extracto de actinomicetos APC70

<b>F.V</b>	<b>G.L</b>	<b>S.C</b>	<b>C.M</b>	<b>F-Valor</b>	<b>Pr&gt; F</b>
Tratamientos	4	17740.77600	4435.19400	497.81	<.0001
Error	10	89.09333	8.90933		
Total	14	17829.86933			

CV= 10.73430

**Cuadro 4.** Análisis de varianza de la inhibición de la bacteria *Clavibacter michiganensis* con el extracto de Ácido Jasmónico

<b>F.V</b>	<b>G.L</b>	<b>S.C</b>	<b>C.M</b>	<b>F-Valor</b>	<b>Pr&gt; F</b>
Tratamientos	4	28757.14267	7189.28567	1353.74	<.0001
Error	10	53.10667	5.31067		
Total	14	28810.24933			

CV=4.378937

**Cuadro 5.** Análisis de varianza de la inhibición de la bacteria *Clavibacter michiganensis* con el extracto de actinomicetos ASH53

<b>F.V</b>	<b>G.L</b>	<b>S.C</b>	<b>C.M</b>	<b>F-Valor</b>	<b>Pr&gt; F</b>
Tratamientos	4	30609.52667	7652.38167	181.24	<.0001
Error	10	422.23333	42.22333		
Total	14	31031.76000			

CV=10.44686

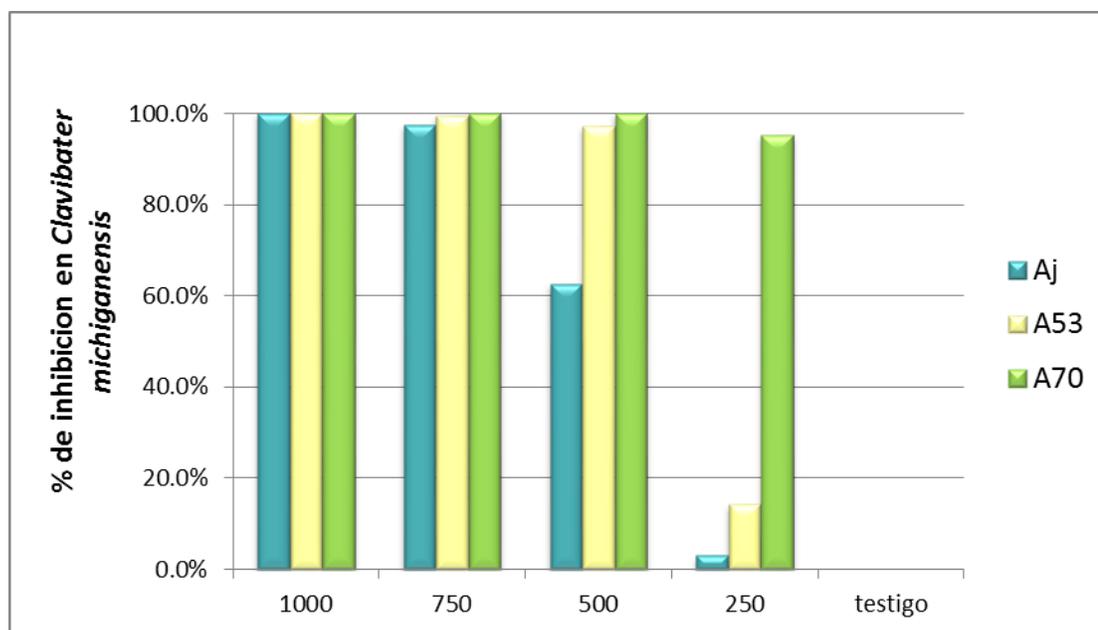
**Cuadro 6.** Análisis de varianza de la inhibición de la bacteria *Clavibacter michiganensis* con el extracto de actinomicetos APC70

<b>F.V</b>	<b>G.L</b>	<b>S.C</b>	<b>C.M</b>	<b>F-Valor</b>	<b>Pr&gt; F</b>
Tratamientos	4	23472.84267	5868.21067	5180.88	<.0001
Error	10	11.32667	1.13267		
Total	14	3484.16933			

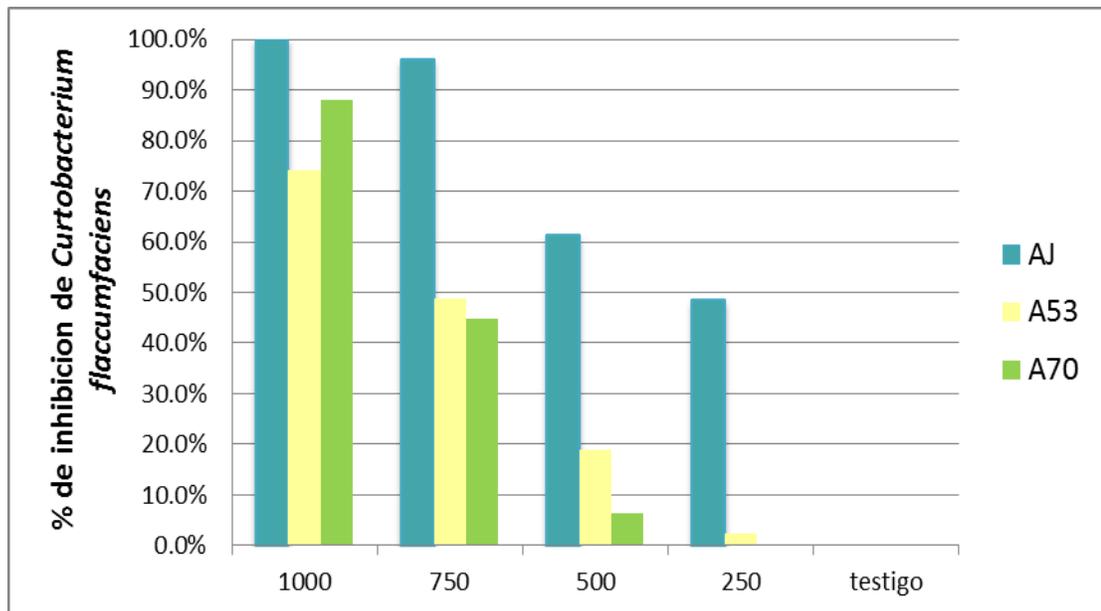
CV=1.346720

**Cuadro 7.** Ingredientes para el medio de cultivo KB

Ingredientes	1Lt (gr)
Peptona	20.0 gr
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5 gr
MgSO <sub>4</sub>	1.5 gr
Glicerol	15.0 ml
Agar Bacteriológico	18.0 gr
Agua Destilada	1000 ml



**Figura 1.** Porcentaje de inhibición de la bacteria *Curtobacterium flaccumfaciens* a diferentes concentraciones de los extractos de actinomicetos ASH53, APC70 y ácido jasmónico



**Figura 2.** Porcentaje de inhibición de la bacteria *Clavibacter michiganensis* a diferentes concentraciones de los extractos de actinomicetos ASH53, APC70 y ácido jasmónico