

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Efectividad Biológica de Bactericidas a Base de Cobre y Biológicos Contra
Pectobacterium carotovorum (Jones, 1901.) Waldee, 1945 *in vitro*

Por:

HÉCTOR DAVID DE LA ROSA TORRES

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Saltillo, Coahuila, México.

Mayo de 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Efectividad Biológica de Bactericidas a Base de Cobre y Biológicos Contra
Pectobacterium carotovorum (Jones, 1901.) Waldee, 1945 *in vitro*

Por:

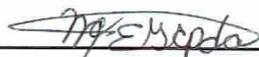
HÉCTOR DAVID DE LA ROSA TORRES

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda

Asesor Principal



M.C. Abiel Sánchez Arizpe

Coasesor



M.P. Víctor Manuel Villanueva Coronado

Coasesor



Dr. Gabriel Gallegos Morales

Coordinador de la División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México.

Mayo de 2017



RESUMEN

Pectobacterium carotovorum, antiguamente *Erwinia carotovora* sub. *carotovora*, es una bacteria fitopatógena que causa la pudrición blanda. Esta enfermedad se presenta en regiones subtropicales y templadas en una amplia variedad de cultivos tales como 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

El objetivo de este trabajo consistió en evaluar dos tipos de controles (químico y biológico), *in vitro*. Como control biológico se tomó la bacteria *Bacillus subtilis* (a una concentración de 1×10^9 en la escala de Mc Farland) y como control químico los productos Ultramyl® y Genoxi® a dosis comercial contra la bacteria fitopatógena *Pectobacterium carotovorum* una de las principales causantes de pudriciones blandas en cucurbitáceas.

Como resultado final, nos arrojó que *Bacillus subtilis* tiene un importante control a largo plazo, ya que durante las primeras 48 horas en competencia directa con *Pectobacterium carotovorum* parecía que esta crecía por toda la caja sin nada que la detuviese pasando las 48 horas sucedió lo contrario ya que el *Bacillus* comenzó a colonizar el medio de una manera tal que incluso las partes donde ya estaba *pectobacterium* se vieron invadidas por *Bacillus subtilis*.

Por el otro lado, Genoxi® tuvo mucho mayor eficacia en comparación con Ultramyl®, ya que este primero inhibió de forma perfecta durante las 72 horas evaluadas; el crecimiento bacteriano no tuvo mucho crecimiento hasta después de las 90 horas. Paso todo lo contrario con Ultramyl® ya que a partir de las 48 el crecimiento bacteriano no tuvo control y llegó hasta donde se encontraba el disco envenenado de este producto.

Palabras clave: *Bacillus subtilis*, *Pectobacterium carotovorum*, *in vitro*, tipos de control, Genoxi®, Ultramyl®.

DEDICATORIAS

Primeramente a Dios por darme la vida y escucharme en los momentos más difíciles de mi vida.

Á mis padres:

Héctor De la Rosa Campos.

Edith Criselda Torres Espindola.

A los que con desvelos, sacrificios y carencias nunca dejaron de apoyarme, moral y económicamente para poder ser lo que ahora soy. A ellos que sin condición alguna depositaron en mí toda su confianza y hoy les demuestro que fui digno de ella para poder ser un hombre de bien.

A los que con cariño amor y mucho sacrificio les dedico este trabajo, y gran parte de lo que soy se los debo ellos.

A mis hermanos

Annel Alejandra De la Rosa Torres

Diego De la Rosa Torres

De quienes he recibido consejos, regaños y ánimos de forma incondicional y en cualquier momento y que gracias a ellos hoy puedo ver logrado un objetivo más en mi vida.

A mis abuelos.

Erasto De la Rosa Ayala

Juana Espindola Estrada

Virgilia Campos Verdiguel

José Gorgonio Torres Osorio

Por sus consejos, por su cariño y por todas las bendiciones que ustedes me han dado.

A mis primos.

Pollo, Omar, Chilango, Alan, Santiago, Ponchito, Iván, Juan, Yeimy y mi pariente Sergio, gracias por todo su apoyo consejos y regaños, porque siempre hemos compartido momentos de felicidad. Y en especial a mi primo Ali Omar Torres que aunque ya no me acompañe en este mundo se lo dedico con todo mi corazón, esto es para ti primo estés donde estés.

A mi novia

Yurimarily Piceno Santos, por darme todo su cariño y comprensión, por regalarme siempre una sonrisa y demostrarme que por más oscura que sea la noche, siempre sale sol, pero sobre todo por estar conmigo a pesar de todo y soportarme en mis momentos de ansiedad y estrés, gracias por todo mi amor. Te amo.

A mis amigos de la carrera.

Pocho, Rigo, Jorge, Marco, Aby, Claudia, Juanito, Johnny, Warrior, quien han estado conmigo en las buenas y en las malas brindándome todo su apoyo.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, por abrirme las puertas y ayudarme a culminar mis estudios dentro del área de agronomía y culminar en la gran dicha de ser llamado Ingeniero Agrónomo Parasitólogo. Ahora podre decir orgullosamente soy Buitre de la Narro.

A la Dra. Ma Elizabeth Galindo Cepeda, por su amistad, regaños, consejos y sobre todo paciencia para la realización de este trabajo. Nada de esto hubiese sido posible si no fuera por usted, de verdad muchas gracias.

A todos los maestros del Departamento De Parasitología Agrícola, los cuales a lo largo de estos años me enseñaron gran parte de lo que ahora se y que gracias a ustedes el día de hoy puede ser llamado Ingeniero.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	ii
INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	3
OBJETIVOS	3
HIPÒTESIS	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Podredumbre blanda (<i>Pectobacterium carotovorum</i> Jones, 1901) Waldee, 1945.....	4
Ubicación taxonómica (Jones, 1901) Waldee, 1945.....	6
Vía de infección	6
Condiciones favorables para su diseminación.....	6
Síntomas.....	7
Manejo	7
El Control Biológico Como Alternativa en el Manejo Integrado de Enfermedades.....	9
Mecanismos de Control Biológico.....	9
Competencia.....	10
Antibiósis.....	10
Características Del Género <i>Bacillus</i>	11
Clasificación taxonómica.....	13
<i>Bacillus subtilis</i> En El Control Biológico De Enfermedades Bacterianas	13
MATERIALES Y METODOS.....	15
Ubicación del experimento	15
Obtención del material biológico.....	15
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	15
<i>Bacillus subtilis</i>	15
Descripción De Los Productos Evaluados	16
Ultramyl 500®.....	16
Información del producto.....	16

Genoxy®	16
Información del producto	17
¿Qué es Genoxy®?	17
¿Cómo funciona?	17
¿Qué bacterias controla?.....	17
Establecimiento del Ensayo	18
Tratamiento	18
Dosis	18
T1 agua Vs <i>Pectobacterium Carotovorum</i>	18
5 ml.....	18
T2 <i>Bacillus subtilis</i> Vs <i>Pectobacterium Carotovorum</i>	18
5 ml de concentración (1x10 ⁹).....	18
T3 Ultramyl 500® Vs <i>Pectobacterium Carotovorum</i>	18
0.5 gr/5 ml de agua.....	18
T4 Genoxi® Vs <i>Pectobacterium Carotovorum</i>	18
0.45 gr/5 ml de agua.....	18
Proceso De La Inoculación	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	21
CONCLUSIONES	28
LITERATURA CITADA	29
APENDICE	34

INDICE DE FIGURAS

Figura.1 Colocación de los discos esterilizados, para imbibición de los productos químicos y biológicos.....	18
Figura.2 Momento de imbibición de los disco con Genoxy®, Ultramyl® y <i>Bacillus subtilis</i>	19
Figura. 3 Agregación de la bacteria <i>Pectobacterium carotovorum</i> bajo condiciones asépticas, para evitar la contaminación de algún otro agente no deseado en el experimento.....	20
Figura 4. Colocación de discos envenenados en cajas Petri llenas de PDA a una distancia equidistante de la bacteria <i>P. carotovorum</i>	20
Figura 5 y 6. Diámetro de crecimiento de la bacteria en los tratamientos del T 2 y del T4 UAAAN 2017.....	21
Figura 7 y 8. Tratamiento 3 Vs <i>Pectobacterium carotovorum</i> . (Diámetro de crecimiento de <i>Pectobacterium carotovorum</i> en el tratamiento 3).....	22
Figura 9. Comparativa entre los dos productos evaluados (Tratamiento 4 Vs Tratamiento3).....	23
....	

INDICE DE GRAFICAS

Grafica 1. <i>Bacillus subtilis</i> Vs <i>Pectobacterium carotovorum</i> . (Crecimiento del diámetro de la colonia de <i>Pectobacterium</i> en el tratamiento.....	24
Grafica 2. Tratamiento 1. Agua Vs <i>Pectobacterium carotovorum</i>	24
Grafica 3. Tratamiento 3 Vs <i>Pectobacterium carotovorum</i>	25
Grafica 4. Genoxy® Vs <i>Pectobacterium carotovorum</i>	25
Grafica 5. Grafica representativa del crecimiento (Cm) de <i>Pectobacterium carotovorum</i> en los diferentes tratamientos.....	26

INTRODUCCIÓN

El aumento en la producción mundial de hortalizas ha traído como consecuencia un mayor movimiento de germoplasma, con la introducción de nuevas especies y variedades, lo que ha llevado a la diseminación de plagas Y enfermedades exóticas, los cuales al encontrarse en un nuevo nicho, donde no hay enemigos naturales, encuentran las condiciones propicias para establecerse y provocar reducción en la calidad y cantidad de la producción, por lo que los agricultores tendrán que recurrir al establecimiento de medidas curativas lo que implica un aumento en los costos de producción al requerir la aplicación de medidas para reducir la incidencia y severidad de ellas., Aunado a esto, su presencia en almacén e incluso en el transporte Y durante su comercialización representa una importante fuente de perdida en pos cosecha, particularmente en combinación con un manejo rudo y un pobre control de la temperatura. Sin embargo en la actualidad, como consecuencia de la contaminación ambiental y la importancia que se le ha venido dando a la inocuidad alimentaria, Son establecidos normas que prohíben el indiscriminado uso de agroquímicos

Las pudriciones blandas de las cucurbitáceas son un problema común de todas las áreas donde se cultivan; dependiendo del manejo que se les de los daños pasaran desapercibidos o de lo contrario tendrán grandes pérdidas.

Pectobacterium carotovorum es una bacteria polífaga, sobre todo afecta órganos suculentos (hortalizas). Es un habitante del suelo. Especies de *Pectobacterium* están implicadas en las podredumbres blandas, que aparecen en el cultivo y sobre todo, en postcosecha. En periodos de lluvias o cuando la humedad en el suelo es elevada, las hojas exteriores, senescentes, son colonizadas por estas bacterias polífagas, abundantes en los suelos donde hay restos vegetales en descomposición.

Las enfermedades suelen afectar a las plantas aunque las condiciones de crecimiento y mantenimiento sean buenas. Tanto las enfermedades como los insectos causan daños similares, pero de modo diferente. El daño causado por

ambos puede resultar en hojas y frutos deformados, manchados o podridos. Ambos pueden causar la caída o la decoloración de las hojas. Si las plantas se observan con atención es posible distinguir el daño causado por las enfermedades del causado por los insectos.

El género *Bacillus subtilis*. Se trata de un organismo que existe en el medio ambiente de forma natural. No es peligroso para el hombre, animales vertebrados e invertebrados terrestres y acuáticos, artrópodos útiles excepto el producto técnico que afecta al Hymenóptero (*Nasonia vitripennis*), etc. Esta especie bacteriana se caracteriza por descomponer la materia orgánica; de ella se han desarrollado varias cepas como fungicidas desinfectantes de semillas. La bacteria forma endosporas que, aplicadas a las semillas, se expanden por las raíces de las plántulas y compiten con hongos patógenos del suelo entre los que destacan fusariosis o pudrición radical (*Fusarium sp.*), mancha o tizón de la hoja (*Alternaria sp.*), pudrición ácida (*Aspergillus sp.*) Y pudrición de la base de la piña (*Thanatephorus sp.*), etc., que atacan a las raíces.

JUSTIFICACIÓN

La pudrición blanda (*Pectobacterium carotovorum*), es uno de los problemas principales que afectan los cultivos (cucurbitáceas), lo que puede llegar a inducir una pérdida total del cultivo, incluso antes de hacer el primer corte, por lo que es de gran importancia su estudio y su control, ya que esta puede que tenga mayor resistencia a productos químicos por lo que el control biológico es lo más nuevo para combatirlo.

OBJETIVOS

Evaluar la eficiencia de *Bacillus subtilis* sobre *Pectobacterium carotovorum*

Evaluar la eficiencia de dos bactericidas comerciales sobre *Pectobacterium carotovorum*.

HIPÒTESIS

Los bactericidas comerciales tendrán un mayor efecto sobre la inhibición del crecimiento de *Pectobacterium carotovorum* que *Bacillus subtilis*.

REVISIÓN DE LITERATURA

Las pudriciones blandas causadas por las bacterias pectolíticas son responsables de considerables pérdidas económicas en diversos cultivos. A nivel mundial se estiman entre 50 y 100 millones de dólares por año solamente en el cultivo de la papa (Matlala, 2004). En las condiciones de Cuba las especies *Pectobacterium carotovorum* (Gardan *et al.*, 2003) (sin. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Jones, 1901) y *Dickeya chrysanthemi* (Samson *et al.*, 2004) (sin. *Erwinia chrysanthemi* (Burkholder *et al.*, 1953), pertenecientes a estas bacterias, son causantes de la podredumbre blanda en la planta y en los tubérculos en el campo y el almacén (Stefanova, 1990).

Con el propósito de disminuir la incidencia en el campo, en todos los países se utilizan diversas medidas de manejo, entre ellas el uso de semillas sanas, variedades resistentes y medidas culturales. El control biológico con antagonistas se ha investigado y valorado como un método potencial para el control de las pudriciones blandas bacterianas en diferentes cultivos, principalmente en la papa (Geels y Schippers, 1983; Colyer y Mount, 1984; Rhodes y Logan, 1986; Tzeng *et al.*, 1990; Lucan y Melo, 1999, Abdel-Alim *et al.*, 2000).

Podredumbre blanda (*Pectobacterium carotovorum* Jones, 1901) Waldee, 1945.

Pectobacterium carotovorum subsp. *Carotovorum* (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Jones, 1901) y *Dickeya chrysanthemi* (*Erwinia chrysanthemi* Burkholder, McFadden & Dimock 1953) tienen una distribución mundial y se consideran las bacterias patógenas de mayor importancia en el cultivo de la papa desde el punto de vista comercial. Estas especies causan pudriciones blandas en los tubérculos y pie negro en los tallos de papa, y ocasionan como consecuencia grandes pérdidas que han sido estimadas entre 50 y 100 millones de dólares anuales a nivel mundial (Benelli *et al.*, 2004; ; Duarte *et al.*, 2004, Burr *et al.*,

2006). El desarrollo de la enfermedad se debe a la acción de enzimas extracelulares producidas por estas bacterias como pectato liasa, poligalacturonasa, celulasa y proteasa, que degradan los componentes de la pared celular de las plantas, lo cual conlleva a la maceración de los tejidos y la liberación de nutrientes para el crecimiento bacteriano (Py *et al.*, 1998; Toth *et al.*, 2003). La actividad de estas enzimas, principalmente de las pectato liasas, ha sido correlacionada con la patogenicidad y la virulencia de estas bacterias fitopatógenas (Matsumoto *et al.*, 2003).

Pectobacterium carotovorum, antiguamente *Erwinia carotovora* sub. *carotovora*, es una bacteria fitopatógena que causa la pudrición blanda. Esta enfermedad se presenta en regiones subtropicales y templadas en una amplia variedad de cultivos tales como 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 de las cucurbitáceas es un problema común en todas las áreas donde se cultivan; dependiendo del manejo que se les dé, los daños pueden pasar desapercibidos o de lo contrario traerán grandes pérdidas. Para este tipo de síntoma se han descrito varias especies de bacterias, sobresalen *Pectobacterium carotovorum* (Jones, 1901) Walde, 1945 emend. Hauben *et al.*, 1999 y *Pectobacterium atrosepticum* (van Hall, 1902) Hauben *et al.*, 1999, aunque también se ha involucrado a *Pantoea ananas* pv. *ananas* (Serrano, 1928) Mergaert, Verdonck & Kersters, 1993, causando pudriciones en tallos y frutos de varias cucurbitáceas, sobre todo cuando existen condiciones de alta humedad ambiental así como temperaturas entre 5 y 37°C, con óptimo de 22°C. Todas ellas son organismos que sobreviven en el suelo y en restos de vegetales de plantas enfermas.

Ubicación taxonómica (Jones, 1901) Waldee, 1945.

Dominio.-.....Bacterias
Filo.-.....Proteobacteria
Clase.-.....Gammaproteobacteria
Orden.-.....Enterobacteriales
Familia.-.....Enterobacteriaceae
Genero.-.....*Pectobacterium*
Especie.-.....*carotovorum*

Vía de infección

La vía más importante de transmisión de la enfermedad es a través de los tubérculos contaminados donde estas especies pectolíticas están presentes de forma latente en la superficie o en las lenticelas (Scott *et al.*, 1996).

Condiciones favorables para su diseminación

Las condiciones ambientales de humedad, temperatura y disponibilidad de oxígeno ejercen una gran influencia tanto en la aparición de la enfermedad como en la extensión del daño causado. La temperatura es un factor principal y su nivel puede determinar cuál organismo predomina en una lesión aunque estén presentes en igual número (Pérombelom, 2002; Smadja *et al.*, 2004). El exceso de agua también es esencial pues permite que las células bacterianas se muevan más fácilmente a través del tejido de la planta. Además conlleva a una disminución en la disponibilidad de oxígeno, lo cual crea un ambiente anaeróbico dentro de la planta y limita sus defensas dependientes de oxígeno (Toth *et al.*, 2003).

Síntomas

Se pueden presentar en cultivos bajo invernadero, a cielo abierto así como en cualquier etapa fenológica del hospedante. Cuando la infección se lleva a cabo en los tallos, es posible que los síntomas aéreos se confundan con los de *Fusarium* o incluso con los de *Erwinia tracheiphila*, ya que se pueden manifestar como manchones en una o varias plantas marchitas y las hojas pueden exhibir clorosis y necrosis; sin embargo, al analizar la planta podrá observarse que los tallos presentan lesiones húmedas y de consistencia blanda, que al ir avanzando llegan a pudrir todo el tallo, lo que induce su colapso (Catara *et al.*, 2001).

Los frutos también se llegan a pudrir ya sea en el campo, en el transporte y/o almacén. El daño puede iniciarse en cualquier parte ya que el patógeno requiere de heridas para poder infectar y la bacteria puede ser acarreada desde el campo o encontrarse en el material donde se empaca la calabaza, en el vehículo donde se transporta el producto e incluso en las paredes del almacén (Catara *et al.*, 2001).

Manejo

El control de este patógeno se dificulta mucho debido a que se disemina a través del agua de riego, sobrevive en la maquinaria agrícola y en los restos de cosechas infestadas. Otra opción adoptada por los agricultores, en aras de prevenir la enfermedad, es la desinfección del material de trabajo con sustancias químicas, el tratamiento de las aguas de riego con luz UV, y el de los cultivos con antibióticos y otras sustancias químicas (Pérombelon y Salmond, 1995).

Para impedir la introducción del patógeno a la zona agrícola se debe evitar sembrar semilla contaminada o de la cual no se tenga la seguridad de que esté libre de la bacteria. Hacer supervisiones diariamente para detectar y eliminar las plantas que manifiesten síntomas de las enfermedades y aplicar riego controlado, evitar que el follaje permanezca húmedo por largos periodos de tiempo. Esta es una de las

pocas enfermedades en las que se ha experimentado con éxito la aplicación de estreptomicina por medio de pulverización, por lo que en cuanto se observen los primeros síntomas efectuar aplicaciones cada 5 a 10 días, sobre todo si las condiciones ambientales son favorables, teniendo cuidado de cubrir todo el follaje; sin embargo, hay que tener en cuenta que las cucurbitáceas son muy sensibles a estos productos y puede haber fitotoxicidad, sobre todo cuando se emplean altas dosis en periodos con temperaturas elevadas (Pérombelon y Salmond, 1995).

Es necesario eliminar los restos vegetales al finalizar el periodo del cultivo. Si es posible, realizar una rotación de cultivos por uno o dos años, para reducir la fuente de inóculo que se encuentre en el suelo, teniendo cuidado en este periodo de eliminar las plantas mostrencas que se desarrollen. También se recomienda el aislamiento del cultivo de otras plantaciones de cucurbitáceas. Se sugiere cambiar de parcela si el cultivo es al aire libre. En el caso de regiones trópicas esto no es indispensable ya que la bacteria no persiste en el suelo. La semilla debe estar sana y de ser posible producirla en regiones secas donde el desarrollo de la enfermedad es desfavorable; o bien puede desinfectarse por termoterapia (Catara *et al.*, 2001).

Plantar en terrenos previamente preparados, eliminar malezas hospedantes y evitar excesos de fertilización nitrogenada. En el caso de ataques en el cuello de las plantas, una solución bacteriostática a base de cobre o quinosol (cryptonol líquido) aplicada localmente es efectiva sobre todo cuando se detecta en sus inicios. Hay que evitar que el suelo próximo al cuello este demasiado húmedo. La aplicación sistemática de productos químicos en la agricultura implica algunas dificultades como el resurgimiento de plagas primarias y secundarias, el desarrollo de resistencia genética, la contaminación del medio ambiente y afectaciones a la salud humana. Muchos de estos productos provocan daños irreparables sobre el sistema nervioso central, y otros están clasificados como carcinogénicos (Pérez, 2004).

El Control Biológico Como Alternativa en el Manejo Integrado de Enfermedades

Por mucho tiempo han existido ejemplos del uso de enemigos naturales para el control de plagas y quizá el caso más antiguo hace al menos 800 años. Sin embargo, el control biológico nace como un método científico hacia finales del siglo XIX (Rodríguez y Arredondo, 2007). Inicialmente se utilizó en el control de insectos, pero existen también otros tipos de control biológico como es el caso de enfermedades de plantas causadas por bacterias u hongos (Guerrero *et al.*, 2009).

La utilización de microorganismos en el control biológico de enfermedades de las plantas constituye una alternativa eficiente y ecológica que contribuye al desarrollo de una agricultura sostenible, ya que disminuye los efectos inherentes al uso de plaguicidas y productos químicos. Entre los agentes de control biológico más estudiados se encuentran los microorganismos pertenecientes a los géneros *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Trichoderma* y *Bacillus* (Whipps, 2001).

El control biológico posee muchas ventajas como alternativa en el manejo integrado de enfermedades, el poco o ningún efecto nocivo colateral, casos raros de resistencia, control de largo plazo, elimina por completo o sustancialmente el uso de plaguicidas relación beneficio/costo muy favorable, evita enfermedades secundarias y no provoca intoxicaciones (Rodríguez y Arredondo, 2007).

Mecanismos de Control Biológico.

En 1960 se suscribió el uso del término antagonismo para todas aquellas interacciones en la cual al menos una de las especies interactuantes es dañada. Los mecanismos de supresión del patógeno por un agente de control biológico son; competencia por sustrato, exclusión, antibiosis y explotación (que incluye parasitismo y predación), sideroforos y resistencia inducida (Baker, 1987).

Competencia.

En la competencia por nutrientes proporcionados por los exudados de raíces y semillas probablemente ocurren muchas interacciones entre microorganismos patógenos y no patógenos (Weller, 1988); en concreto, competencia es cualquier interacción entre dos o más poblaciones de especies de las cuales afectan su desarrollo y sobrevivencia. Los microorganismos benéficos especialmente actinomicetos se incrementan principalmente con el uso de aditamentos orgánicos y compiten por la raíz (Sun y Huang, 1985).

Antibiosis.

Se considera como antagonismo mediado por metabolitos específicos y no específicos de origen microbiano, enzimas, compuestos volátiles u otras sustancias tóxicas (Fravel, 1988); puede considerarse como la relación en la cual una especie A produce una sustancia enemiga a la especie B, sin que la especie A derive cualquier beneficio directo. La palabra antagonismo fue introducida a la microbiología por primera vez en 1874 por Roberts al demostrar una acción antagónica entre *Penicillium glaucum* y una bacteria (Baker, 1987).

En un trabajo realizado por Tschen y Kuo (1985) para determinar el efecto antagónico *in vitro* de *Bacillus subtilis* sobre *Rhizoctonia solani*, observaron claramente las zonas de inhibición además de observar en los puntos de las hifas un crecimiento anormal cuatro días después de la exposición al antibiótico producido por *B. subtilis*. Además determinaron que la bacteria produce sustancias antibióticas que pertenecen a un complejo formado por bacilycin y fergymycin.

López y Virgen (1994) reportaron el antagonismo de la bacteria *B. subtilis* a *Fusarium oxysporum*, *Alternaria sp* y *Botrytis sp*, y observaron un desarrollo anormal de hifas y conidias.

Características Del Género *Bacillus*

El género *Bacillus* pertenece a la familia *Bacillaceae*, es un género que hoy en día incluye más de 60 especies de bacilos. Este género está formado por microorganismos bacilares Gram positivos, formadores de endosporas, quimiheterotrofos que normalmente son móviles y rodeados de flagelos periticos. Son anaerobios o aerobios facultativos son catalasa positivos. Las células bacterianas de este género tienen un amplio tamaño que varía 0,5 a 2,5 μm x 1,2-10 μm . Este género se encuentra comúnmente en suelos y plantas donde tienen un papel importante en ciclo del carbono y el nitrógeno. Son habitantes comunes de aguas frescas y estancadas, son particularmente activos en sedimentos. (Koneman, 2001).

Las especies del género *Bacillus* poseen características especiales que los hacen buenos candidatos como agentes de control biológico. Su utilización para el biocontrol de las enfermedades de las plantas es de gran interés, debido a la capacidad que presentan estas bacterias para producir antibióticos y otras sustancias con capacidad antibacteriana y antifúngica que impiden el establecimiento de patógenos vegetales. Entre las especies más utilizadas con este propósito se encuentran *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. pumillas* y *B. polymyxa*. El rápido crecimiento que muestran estas bacterias en cultivo líquido, la formación de endosporas resistentes al calor y la desecación, y la producción de metabolitos secundarios son características que permiten considerar a estos microorganismos como potenciales agentes de control biológico (Shoda, 2000).

Las características generales del género *Bacillus* son:

- Producen endosporas, las que son termo resistente y también resisten a agentes perjudiciales como la desecación, la radiación, los ácidos y los desinfectantes químicos.

- Muchos bacilos producen enzimas hidrofílicas extracelulares que descomponen polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, permitiendo que el organismo emplee estos productos como fuentes de carbono y donadores de electrones. Muchos bacilos producen antibióticos y son ejemplos de estos la bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina y circulina.

- Los bacilos en general crecen bien en medios sintéticos que contienen azúcares ácidos orgánicos, alcoholes, etc. como las únicas fuentes de carbono y el amonio como única fuente de nitrógeno.

- Viven dentro de los límites de temperatura de 55 a 70°C. El límite inferior de pH para *Bacillus* es de 2 a 3 (Glick, 1995).

B. subtilis está emparentado filogenéticamente con patógenos de importancia, tal el caso de *B. anthracis* y *Clostridium sp.*, por lo cual es interesante utilizar esta bacteria como modelo de investigación. Dado que el hábitat natural de *B. subtilis* es el suelo, el cual está sometido a grandes fluctuaciones de temperatura, y dada la importancia que tienen los factores de transcripción Spo0A para la formación de esporas y de Sigma B en la adaptación a otros tipos de estrés, se decidió estudiar la posible relevancia de estos reguladores de la transcripción en la respuesta y adaptación de *B. subtilis* ante un descenso súbito de la temperatura de crecimiento (Méndez, 2004).

Clasificación taxonómica

Jansen (2004), la clasificación taxonómica es la siguiente:

Dominio: Bacteria

Phyllum: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Género: *Bacillus*

Especie: *subtilis*

***Bacillus subtilis* En El Control Biológico De Enfermedades Bacterianas**

El cobre es el elemento que ha dado mejores resultados en el control de enfermedades de origen bacteriano. Sin embargo, éstos han sido erráticos cuando se presentan condiciones ambientales favorables para el desarrollo y diseminación de las bacterias; a ello se suma la aparición de cepas bacterianas resistentes a compuestos cúpricos. Resultados igualmente erráticos se obtienen cuando se aplican antibióticos contra bacterias fitopatógenas, como las formulaciones de estreptomycin y oxitetraciclina, debido al desarrollo de razas resistentes (SAG, 2004).

En la búsqueda de alternativas más efectivas, la atención se ha dirigido a las propiedades controladoras observadas en *Bacillus subtilis*. Cabe señalar, que el género *Bacillus* presenta el mayor número de especies conocidas con propiedades insecticidas, entre las que destaca *B. thuringiensis* (Donoso *et al.*, 2006).

Las nuevas tendencias mostradas por la exigencia de los mercados agrícolas internacionales, y en menor medida de los locales, restringen el uso de plaguicidas, ya sea por la adopción de sistemas de producción integrada o bien, orgánica. Esta tendencia ha sido aún más crítica en el manejo de enfermedades bacterianas, dada

la aparición sistemática de resistencia a los antibióticos usados, no sólo en agricultura sino también en salud humana. Lo anterior ha generado la búsqueda de una nueva gama de antibióticos alternativos, y el uso de los tradicionales se ha restringido en las actividades ajenas a la medicina, tales como la agricultura y ganadería (SAG, 2004).

B.subtilis es la especie tipo de género *Bacillus*, y sus esporas están ampliamente distribuidas en ambientes naturales .Puede degradar pectina y polisacáridos en los tejidos vegetales. Produce una gran gama de antibióticos pertenecientes a la familia de las Iturinas (Wulff *et al.*, 2002). Se ha reportado como un eficiente antagonista de fitopatógenos. Esta especie se encuentra entre los microorganismos promotores del crecimiento vegetal debido a que produce sustancias semejantes a las fitohormonas, y además contribuye al mejoramiento de la absorción de agua y nutrientes en la raíz. Se le atribuye de igual manera la inducción de resistencia mediante la activación de genes defensivos de la planta (Guillén *et al.*, 2006).

MATERIALES Y METODOS

Ubicación del experimento

El presente trabajo se llevará a cabo en el laboratorio de Fitopatología. En el Departamento de Parasitología Agrícola ubicado en la Universidad Autónoma Agraria Antonio, Se localiza entre las coordenadas geográficas 25° 22" de latitud norte y 101° 02" longitud oeste y a una altitud de 1742 msnm. En Buenavista Saltillo, Coahuila.

Obtención del material biológico

Pectobacterium carotovorum

La bacteria fitopatógena utilizado para este ensayo fue obtenido de residuos de cosecha de calabaza obtenidos en el municipio de Arteaga, Coahuila.

Se aisló en medio B de King (KB) se caracterizó bioquímicamente de acuerdo al protocolo que menciona Schaad *et al.*, (2005), y se incrementó en caldo nutritivo, hasta llegar a la concentración deseada (1×10^9 en la escala de McFarland).

Bacillus subtilis

Esta bacteria se aisló de *Populus alba* y fue caracterizada bioquímicamente por Limón, (2013) por lo que únicamente se incrementó en caldo nutritivo para llegar a la concentración (1×10^9 en la escala de McFarland).

Los productos evaluados fueron los siguientes:

Descripción De Los Productos Evaluados

Ultramyl 500®

(Cobre 42.40% + Estreptomicina 1.755% + Oxitetraciclina 0.176%. pH)

Información del producto

Asociación de cobre: fungistático y bacteriostático de amplio espectro, con estreptomicina: antibiótico sistémico con actividad bactericida y fungicida, y con oxitetraciclina: antibiótico bacteriostático de amplio espectro en la que sus componentes actúan con efecto sinérgico: su efecto es mayor que si se utilizaran por separado, presentada en forma de polvo humectable para aplicar en aspersión foliar.

Genoxy®

Ingredientes Activos:

Sulfato de Gentamicina 2%

Clorhidrato de Oxitetraciclina 6%

Sulfato de Cobre Pentahidratado 80%

Formulación: Polvo Humectable

Genoxi® contiene dentro de su formulación sulfato de gentamicina el antibiótico más contundente de uso agrícola, oxitetraciclina antibiótico de uso generalizado y sulfato de cobre pentahidratado, sus tres ingredientes activos con una alta capacidad de control de bacterias.

Información del producto

¿Qué es Genoxy®?

Producto único en el mercado que permite controlar de manera contundente el ataque agresivo de las enfermedades bacterianas, el control se debe a la sinergia generada entre sus tres ingredientes activos.

¿Cómo funciona?

Por la acción de contacto y sistémico de los tres ingredientes activos de Genoxi® hacen que este sea un excelente bactericida de acción preventiva y curativa, destruyendo los patógenos causantes de las enfermedades de sus cultivos. La formulación activa de Genoxi® interfiere en los procesos que promueven la síntesis de proteínas de las enzimas bacterianas, causantes de la destrucción de los tejidos de la plantas.

¿Qué bacterias controla?

Controla un amplio espectro de enfermedades bacterianas (gram + y gram -) como como *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia* etc, causantes de marchitez y pudrición en sus cultivos, por lo que Genoxi® es el bactericida más completo del mercado.

Establecimiento del Ensayo

Tratamiento	Dosis
T1 agua Vs <i>Pectobacterium Carotovorum</i>	5 ml
T2 <i>Bacillus subtilis</i> Vs <i>Pectobacterium Carotovorum</i>	5 ml de concentración (1×10^9)
T3 Ultramyl 500® Vs <i>Pectobacterium Carotovorum</i>	0.5 gr/5 ml de agua
T4 Genoxi® Vs <i>Pectobacterium Carotovorum</i>	0.45 gr/5 ml de agua

Proceso De La Inoculación

Una vez esterilizados los discos de papel filtro se colocaron en cajas Petri de cristal; esto se hizo con el fin de embeber los discos con los productos comerciales y con el *Bacillus subtilis* del cual se toma una dosis de 5 ml a la concentración anterior.



Figura.1 Colocación de los discos esterilizados, para imbibición de los productos químicos y biológicos

La dosis ocupada en los productos comerciales fue de 0.450 gr de en 5 ml de agua esterilizada, se dejó reposar durante 24 hrs para que los discos quedaran perfecta y uniformemente embebidos.



Figura.2 Momento de imbibición de los disco con Genoxy®, UltramyI® y *Bacillus subtilis*.

La siembra se realizó en cajas Petri, en medio del cultivo PDA (papa dextrosa agar) en formas de manchas irregulares en un punto equidistante del otro. De la bacteria *Pectobacterium carotovorum* se tomó una cantidad de 100 μ l y se agregó dentro de la caja a una distancia considerable de la mitad de la misma



Figura. 3 Agregación de la bacteria *Pectobacterium carotovorum* bajo condiciones asépticas, para evitar la contaminación de algún otro agente no deseado en el experimento.

La colocación de los discos envenados, de igual forma se realizó en la cámara de flujo laminar con el fin de evitar contaminación de algún otro patógeno.



Figura 4 Colocación de discos envenados en cajas Petri llenas de PDA a una distancia equidistante de la bacteria *Pectobacterium carotovorum*

Al finalizar el procedimiento, se obtuvieron 7 repeticiones por tratamiento, esto quiere decir que se hicieron un total de 28 cajas. Y para asegurar que la bacteria estaba activamente patogénica se pusieron dos cajas extra solo con la bacteria que en este caso fue *Pectobacterium carotovorum*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Como resultado obtuvimos que, de los cuatro tratamientos obtuvimos un resultado sorprendentemente favorable al tratamiento 4 y tratamiento 2, dado que estos dos fueron los que tuvieron mejor control en el desarrollo de la bacteria *in vitro*. Se pudo observar que el diámetro de las colonias se incrementó a las 24 horas y a las 72 horas disminuyó donde el mejor tratamiento fue el 4 seguido por el 2. Figura 5 y 6.

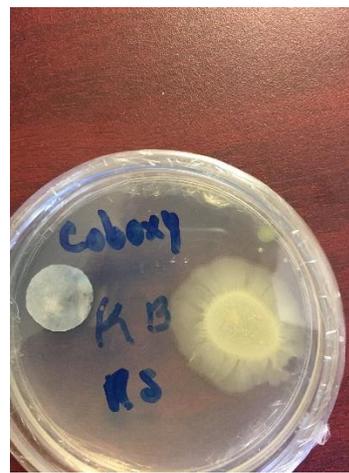
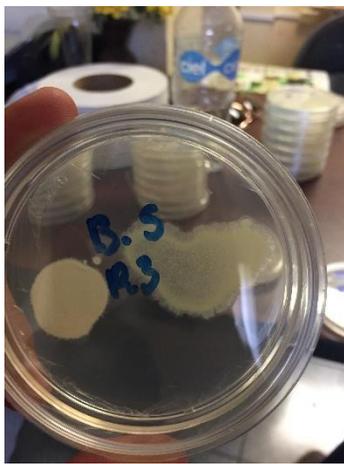


Figura 5 y 6. Diámetro de crecimiento de la bacteria en los tratamientos del T 2 y del T4 UAAAN 2017.

El Tratamiento 3 no mostro un efecto de inhibición en el crecimiento, dado que el halo bacteriano llego a colonizar la parte donde se colocó el disco envenenado de este, lo cual quiere decir que no controla de manera eficiente la bacteria o en su caso distinto seria que requiere dosis más frecuentes para su control todo lo contrario con su competidor que contuvo de manera efectiva la bacteria por el tiempo de evaluación especificado a continuación. figura 7 y 8.



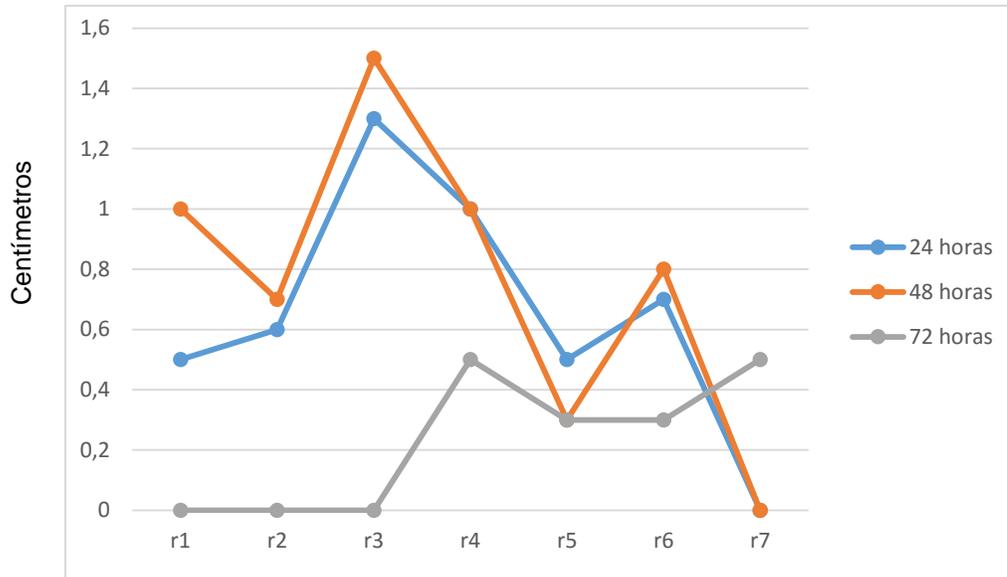
Figura 7 y 8. Tratamiento 3 Vs *Pectobacterium carotovorum*. (Diámetro de crecimiento de *Pectobacterium carotovorum* en el tratamiento 3).

Por otro lado, se hizo la comparativa entre los dos productos comerciales evaluados. Siendo el tratamiento 2 que controla mejor a las 72 horas como se observa en la figura 9 con mayores horas a control ya que visiblemente no hubo tanta invasión por parte de la bacteria al lado donde está el producto.

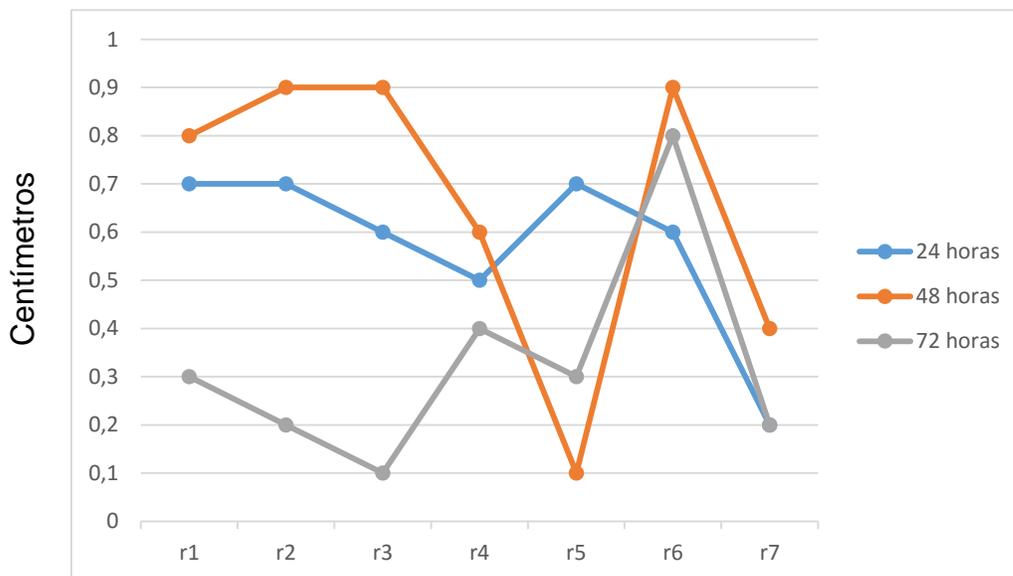


Figura 9. Comparativa entre los dos productos evaluados (Tratamiento 4 Vs Tratamiento3). Claramente se ve una diferencia significativa favorable al tratamiento 1 ya que no se mira una colonización tan severa de parte de la bacteria como en la otra caja (Tratamiento 3) que se ve claramente que la bacteria ya lleva más de la mitad de avanzada.

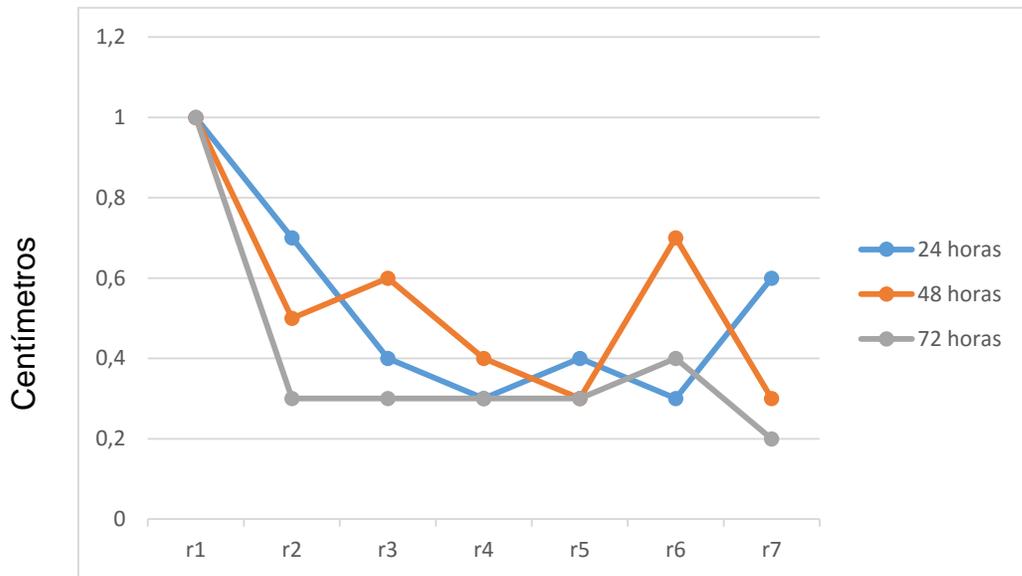
A continuación se muestran algunas graficas donde se observa el aumento en el diámetro de las colonias, de los diferentes tratamientos. Demostrando estos el crecimiento del halo bacteriano que se fue formando en el transcurso de las horas; cabe mencionar que el experimento se realizó durante 72 horas después de la inoculación.



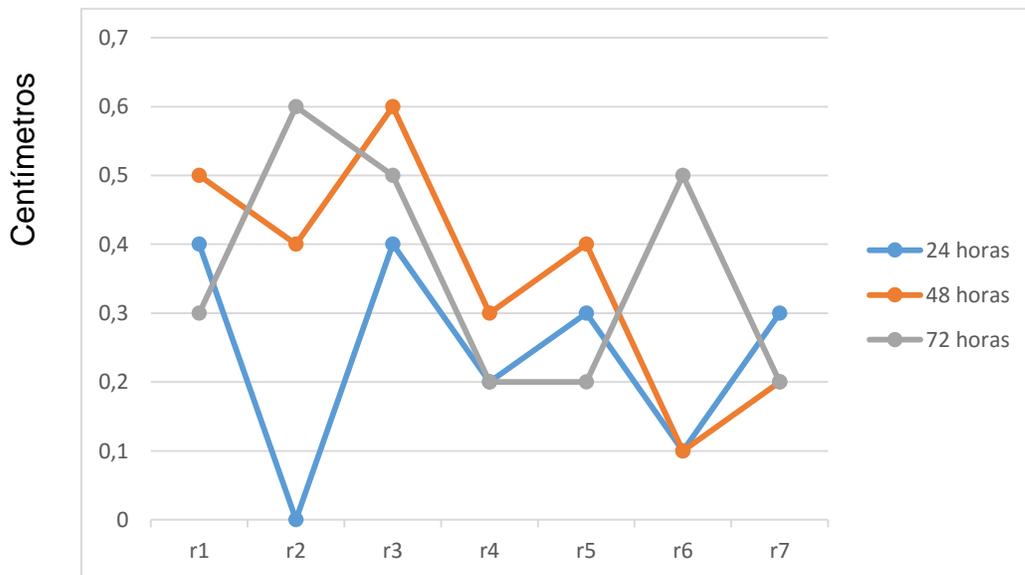
Grafica 1. *Bacillus subtilis* Vs *Pectobacterium carotovorum*. (Crecimiento del diámetro de la colonia de *Pectobacterium* en el tratamiento 2).



Grafica 2. Tratamiento 1. Agua Vs *Pectobacterium carotovorum* (se observa que desde el día 1 el crecimiento bacteriano no tuvo ningún tipo de control ya que no hubo algún agente de control ya sea químico o biológico que lo detuviese).

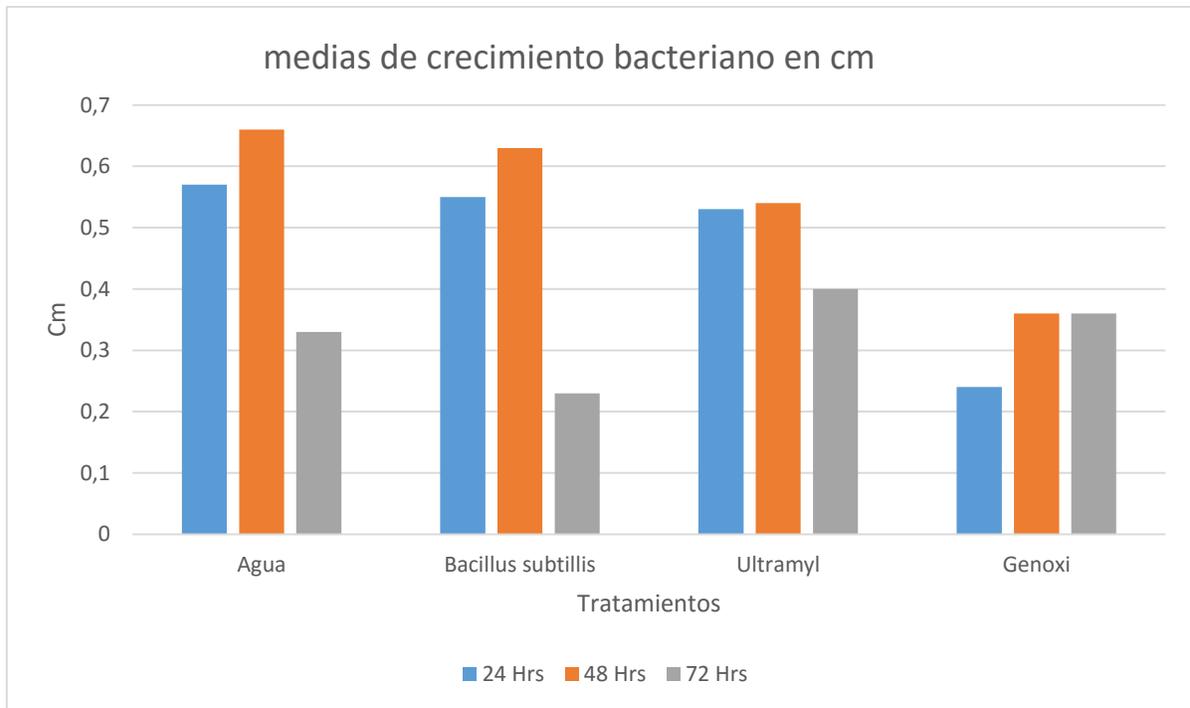


Grafica 3. Tratamiento 3 Vs *Pectobacterium carotovorum* (el control de este tratamiento no fue el esperado ya que desde el día 1 no tuvo el control esperado, incluso la bacteria llego a colonizar donde se encontraba el papel envenenado de este).



Grafica 4. Genoxy® Vs *Pectobacterium carotovorum*. El mejor de los 4 tratamientos fue este ya que demostró ser un excelente inhibidor de crecimiento desde el primer día de inoculación.

A las 24 horas el diámetro de crecimiento de la colonia bacteriana fue muy similar en el caso del tratamiento 1 y tratamiento 2 y tratamiento 3, solo el tratamiento 4 mostro diferencia, a las 48 horas el tratamiento 1 y tratamiento 2 se comportó igual variando solo el tratamiento 3 en el tratamiento 4 el diámetro se incrementó, a las 72 horas el tratamiento 4 fue el que mostro un menor desarrollo en el diámetro de la colonia. Grafica 5.



Grafica 5. Grafica representativa del crecimiento (Cm) de *Pectobacterium carotovorum* en los diferentes tratamientos.

Como se puede ver en la gráfica, a lo largo de las 72 horas el tratamiento que tuvo mejor control desde un principio fue el tratamiento 4 , dado que desde el primer día de evaluación el crecimiento fue casi nulo, todo lo contrario a su adversario tratamiento 3 que desde un principio se vio un crecimiento progresivo en este.

Cabe resaltar que el tratamiento 2 con *Bacillus subtilis*, no tuvo respuesta inmediata como se esperaba, si no que empezó a tener cierto efecto sobre la bacteria pasando las 48 horas, en un principio parecía que esta se la iba a llevar por delante colonizando totalmente el medio de cultivo donde se encontraba, pero tal cual fue la sorpresa que el *Bacillus* comenzó a colonizar de manera tal que llegó a invadir el espacio donde *Pectobacterium* ya estaba asentada.

Los resultados de este estudio son similares a otros obtenidos anteriormente. Sharga y Lyon (1998) lograron inhibir in vitro el crecimiento de *P. carotovorum* y *P. atrosepticum* mediante la utilización de una cepa de *Bacillus subtilis* productora de antibiótico.

CONCLUSIONES

Como conclusiones el experimento nos arrojó que el mejor tratamiento fue el numero 4 (Genoxi), ya que presento una inhibición del 43% respuesta *in vitro* para el control de esta bacteria.

El tratamiento 2 *Bacillus subtilis*, tiene un periodo de tiempo más prolongado para su establecimiento, por lo que inhibe el crecimiento de la colonia de *Pectobacterium*, en un periodo de tiempo más largo después de las 48 horas. Aun así demostró ser una excelente forma de control a largo plazo ya que su efecto no es inmediato.

El tratamiento 3 (Ultramyl), no logro detener el crecimiento de la manera esperada, ya que fue colonizado fácilmente a las 24 horas de inoculación. Por lo que no es recomendable la utilización de este producto o al menos que se aplique con una dosis más elevada.

LITERATURA CITADA

Abdel-Alim, A. I.; P. Laux; W. Zeller: «Biocontrol of the Soft Rot Pathogens (*Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*) with Antagonistic Bacteria», Grupo de trabajo de lucha biológica contra enfermedades de plantas. Extractos de la conferencia 2000 http://dpg-bcpcsymposium.de/fileadmin/alte_Webseiten/ak/02/tagung2000.htm#1 (consultado en el 2007).

Baker, K. F. 1987. Envolving concepts of biological control of plant Pathogens. Ann. Rev. Phytopathol. 25:67-85.

Benelli, A.; Denardin, N.; Forcelini, C.; Duarte, V. 2004. Reacão de cultivares de batata à podridao mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* e por *P. chrysanthemi*. Fitopatol. Bras. 29: 155-159.

Burr, T.; Barnard, M.; Corbett, M.; Pemberton, C.; Simpson, N.; Salmond, G. 2006. Identification of the central quorum sensing regulator of virulence in the enteric phytopathogen, *Erwinia carotovora* the VirR repressor. Molecular Microbiology 59: 113–125.

Colyer, P. D.; M. S. Mount: «Bacterization of Potatoes with *Pseudomonas putida* and Its Influence on Post Harvest Soft Sot Diseases», Plant Disease 67:703-706, 1984.

Donoso, E., Lolas, M. y Muñoz, C. 2006. Evaluación de cepas nativas de la bacteria *Bacillus subtilis* en el biocontrol de enfermedades bacterianas de cultivos hortofrutícolas de importancia regional. Universidad de Talca. 32 p.

Duarte, V.; De Boer, S.; Ward, L.; De Oliveira, A. 2004. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. *Journal of Applied Microbiology* 96: 535–545.

Fravel, R. T. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Ann. Rev. Phytopatol.* 26:75-91. USA.

Geels, F. P.; B. Schppers: «Reduction of Yield Depressions in High Frequency Potato Cropping Soil After Seed Treatments with Antagonistic Fluorescent *Pseudomonas spp.*», *Phytopathologische Zeitschrift* 108:207-214, 1983.

Glick, B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41:109-117.

Guerrero, P. V. M. 2009. Algunas Notas sobre el control biológico de enfermedades con Microorganismos. Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo, A.C. Unidad Cuauhtémoc, Chihuahua. 3 p.

Guillén, R.; F. Hernández; G. Gallegos; R. Rodríguez; C. Aguilar; E. Padrón; M. Reyes. 2006: «*Bacillus spp.* Como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium spp.*, *Rhizoctonia solani* Kûhn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de Chile», *Revista Mexicana de Fitopatología* 24(2):105-114, México, <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/612/61224204.pdf>

Janse, J. D, 2004. Fatty acid analysis in the identification, taxonomy and ecology of (plant pathogenic) bacteria. In: Kowalchuk GA, de Bruijn FJ, Head IM, Akkermans AD, van Elsas JD, eds. *Molecular Microbial Ecology Manual*, 2nd ed. New York, USA: Spring Publishing, 973-982.

Koneman, E. W. 2001. Diagnóstico microbiológico: Texto y atlas de color. Quinta Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.

López, N. J. y Virgen, C. G. 1994. Antagonismo in vitro de *Bacillus subtilis* a *Fusarium oxysporum*, *Alternaria* sp. y *Botrytis* sp. XXI Congreso Nacional de Fitopatología. Sociedad Mexicana de Fitopatología.

Lucan, C. M. M.; I. S. de Melo: «Seleção de rizobacterias antagónicas a *Erwinia carotovora* subsp *atroseptica*, em tubérculos de batata», Summa Phytopathologica 25:132-136, 1999.

Matlala, K.: Epidemiology and detection of *Erwinia* spp on potatoes, <http://www.up.ac.za/academic/microbio> (consultado en enero del 2004).

Matsumoto, H.; Jitareerat, P.; Baba, Y.; Tsuyumu, S. 2003. Comparative study of regulatory mechanisms for pectinase production by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. Mol. Plant-Microbe Interact 16: 226-237.

Méndez, B. M. 2004. Novel roles of the master transcription factor Spoa and Sigma B for survival and sporulation of *Bacillus subtilis* at low growth temperature. Journal of Bacteriology. 186(4) 989-1000, 2004.

Pérez, N.: «Control biológico de patógenos vegetales», Manejo ecológico de plagas, cap. 7, Ed. Agustín García, 231-247, 2004.

Pérombelon, M. 2002. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. Plant Pathol. 51: 1-12.

Py, B.; Barras, F.; Harris, S.; Robson, N.; Salmond, G. 1998. Extracellular enzymes and their role in *Erwinia* virulence. Meth. Microbiol. 27: 157-168.

Rhodes, D. J.; C. Logan: «Effects of Fluorescent *Pseudomonas* on Potato Blackleg Syndrome», Annual of Applied Biology 108:511- 518, 1986.

Rodríguez, del B. L. A. y Arredondo, B. H. C. 2007. Teoría y aplicación del control biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico. 303 p.

SAG. 2004. Declaración de Ventas de Plaguicidas, año 2004. 152 pp. [En línea]. Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). <http://www.sag.cl/common/asp/pagAtachadorVisualizador.asp?argCryptedDt=G1tk tXdhRJAS2Wp3v88hMmV7C%2FJUat%2B&argModo=&argOrigen=BDargFlagyGrabados=&argArchivold=1645>

Scott, R.; Chard, J.; Hocart, M.; Lennard, J.; Graham, D. 1996. Penetration of potato tuber lenticels by bacteria in relation to biological control of blackleg disease. Potato Res. 39: 333-344.

Shoda, M.: «Bacterial Control of Plant Diseases», Journal of Bioscience and Bioingeniery 89:515-521, 2000.

Smadja, B.; Latour, X.; Trigui, S.; Burini, J.; Chevalier, S.; Orange, N. 2004. Thermodependence of growth and enzymatic activities implicated in pathogenicity of two *Erwinia carotovora* subspecies (*Pectobacterium* spp.). Can. J. Microbiol. 50: 19-27.

Stefanova, M: «Lista de bacterias fitopatógenas de Cuba», Cidisav, Inisav, La Habana, 1990.

Sun, S. K. and Huang, J.W. 1985. Formulated soil amendment for controlling Fusarium wilt and others soilborne diseases. Plant Disease 68:917- 920.

Toth, I.; Bell, K.; Holeva, M.; Birch, P. 2003. Soft rot erwiniae: from genes to genomes. *Molecular Plant Pathology* 4: 17-30.

Tschen, S. M. and Kuo, W. L. 1985. Antibiotic inhibition and control of *Rhizoctonia solani* by *Bacillus subtilis* *Plant Protection Bulletin* 27:95-103. Taiwan.

Tzeng, K.; R. G. McGuire; A. Kelman: «Resistance of Tubers from Different Potato Cultivars to Soft Rot Caused by *Erwinia carotovora subsp atroseptica*», *American Potato Journal* 67:287-305, 1990.

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

Whipps, J.: «Microbial Interaction and Biocontrol in the Rhizosphere», *Journal of Experimental Botany* 52:487-511, 2001.

Wulff, E.; C. Mguni; K. Mansfeld-Giese; J. Fels; M. Lübeck; H. Hockenhull. 2002.: «Biochemical and Molecular Characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilis* Isolates with Distinct Antagonistic Potential Against *Xanthomonas campestris pv. Campestris*», *European Journal of Plant Pathology* 51:574-584, Holanda.

APENDICE

ANALISIS DE VARIANZA 24 horas

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	3	0.677144	0.225715	3.1082	0.045
ERROR	24	1.742856	0.072619		
TOTAL	27	2.420000			

C.V. = 53.90 %

TABLA DE MEDIAS

TRATAMIENTO	MEDIA
1	0.6571 A (<i>Bacillus</i>)
2	0.5714 A (Agua)
3	0.5286 AB (Ultramyl)
4	0.2429 B (Coboxy)

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

ANALISIS DE VARIANZA 48 horas

FV	GL	SC	CM	F	P>F
----	----	----	----	---	-----

TRATAMIENTOS	3	0.618571	0.206190	1.9117	0.154
ERROR	24	2.588570	0.107857		
TOTAL	27	3.207141			

C.V. = 56.76 %

TABLA DE MEDIAS

TRATA.	REP.	MEDIA
--------	------	-------

1	7	0.757143 A
2	7	0.657143 B
3	7	0.542857 B
4	7	0.357143 B

ANALISIS DE VARIANZA 72 horas

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	3	0.111429	0.037143	0.7156	0.555
ERROR	24	1.245714	0.051905		
TOTAL	27	1.357143			

C.V. = 69.34 %

TABLA DE MEDIAS

TRATA.	REP.	MEDIA
1	7	0.228571 A
2	7	0.328571 A
3	7	0.400000 A
4	7	0.357143 A

	Bacillus subtilis Vs Pectobacterium carotovorum (medidas en cm)		
	24 horas	48 horas	72 horas
R1	0,5	1	0
R2	0,6	0,7	0
R3	1.3	1.5	0
R4	1	1	0,5
R5	0,5	0,3	0,3
R6	0,7	0,8	0,3
R7	0	0	0,5

Medias=

24 Hrs	48 Hrs	72 Hrs
0,55	0,63	0,23

	Agua Vs Pectobacterium carotovorum (medidas en cm)		
	24 horas	48 horas	72 horas
R1	0,7	0,8	0,3
R2	0,7	0,9	0,2
R3	0,6	0,9	0,1
R4	0,5	0,6	0,4
R5	0,7	0,1	0,3
R6	0,6	0,9	0,8
R7	0,2	0,4	0,2

Medias=

24 horas	48 horas	72 horas
0,57	0,66	0,33

	Ultramyl Vs Pectobacterium carotovorum (medidas en cm)		
	24 horas	48 horas	72 horas
R1	1	1	1
R2	0,7	0,5	0,3
R3	0,4	0,6	0,3
R4	0,3	0,4	0,3
R5	0,4	0,3	0,3
R6	0,3	0,7	0,4
R7	0,6	0,3	0,2

Medias=

24 horas	48 horas	72 horas
0,53	0,54	0,40

	Coboxy Vs Pectobacterium carotovorum (medidas en cm)		
	24 horas	48 horas	72 horas
R1	0,4	0,5	0,3
R2	0	0,4	0,6
R3	0,4	0,6	0,5
R4	0,2	0,3	0,2
R5	0,3	0,4	0,2
R6	0,1	0,1	0,5
R7	0,3	0,2	0,2

Medias=

24 horas
0,24

48 horas
0,36

72 horas
0,36