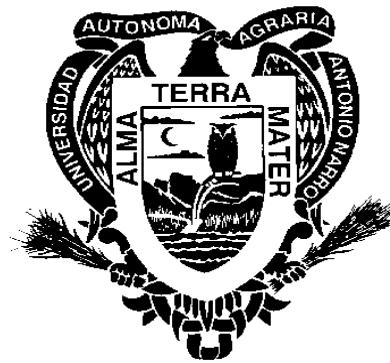


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



**Actividad Bactericida de los Ácidos Fúlvicos sobre Bacterias Saprófitas
Facultativas Asociadas a Cultivos Agrícolas**

Por:

NELLY CECILIA DOMÍNGUEZ SAUCEDO

TESIS

**Presentada como Requisito Parcial para
Obtener el Título de:**

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

Actividad Bactericida de los Ácidos Fúlvicos sobre Bacterias Saprófitas
Facultativas Asociadas a Cultivos Agrícolas

Por:

NELLY CECILIA DOMÍNGUEZ SAUCEDO

Que se somete a consideración del H. Jurado Examinador como requisito
parcial para obtener el título de Ingeniero en Agrobiología

Aprobada por:



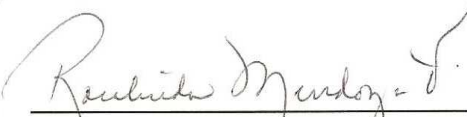
DRA. LEILA MINEA VÁSQUEZ SILLER

Asesor principal



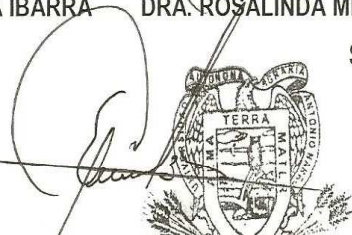
DR. MANUEL DE LA ROSA IBARRA

Sinodal



DRA. ROSALINDA MENDOZA VILLARREAL

Sinodal



DR. MARIO ERNESTO VÁSQUEZ BADILLO

Coordinador de la división de Agronomía
División de Agronomía

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Noviembre de 2009

“El biosistema, viviente y globalizado, que constituye la Naturaleza, no puede ser disecado ni desmembrado en partes. Una vez quebrantado o derribado muere. O, más bien, aquellos que separan un trozo de la Naturaleza, agarran algo que está muerto, e ignorantes de que lo que están examinando ya no es lo que pensaban que era, blasonan de haber entendido a la Naturaleza”

(Masanobu Fukucka)

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Leila Minea Vásquez Siller**, por su valiosa asesoría, por la oportunidad de la realización de esta investigación, por su comprensión, consejos y muy apreciable apoyo.

Al **Dr. Manuel De la Rosa Ibarra**, por toda su disponibilidad brindada, por su apoyo incondicional, por brindarme su confianza, por sus sabios consejos e invaluable amistad.

A la **Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal**, por el apoyo brindado y disponibilidad en la revisión de este trabajo.

Al **Centro de Desarrollo de Productos Bióticos** y en especial al **Dr. Roberto Montes Belmont**, a la **M. C. Hilda Elizabet Flores Moctezuma**, la **M. C. Leticia Bravo Luna** y a la **Ing. Arely Ruíz Rosales**, por su valiosa ayuda en la parte estadística, por toda su disponibilidad y recursos otorgados, y su inolvidable amistad.

A la **Técnico académico Sandra Luz García Valdéz** y a la **T. A. Martina De la Cruz Casillas**, por su valiosa ayuda en el laboratorio y por las facilidades brindadas en el transcurso de la elaboración de este trabajo, por su apoyo y sincera amistad.

A mi bondadosa *Alma Terra Mater* por haberme cobijado en todo el transcurso de mi formación y darme la oportunidad de superarme y realizarme como profesionalista.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo con todo mi amor y respeto,

a mis padres: El **Sr. Benito Domínguez Godínez**, por ser siempre el ejemplo a seguir, por ser mi inspiración motivadora de conocimientos y sabiduría, por ser un gran padre y amigo, mi ídolo de ídolos.

Y la **Sra. Antonia Saucedo León**, por su inmenso amor, por todas sus bendiciones y sabios consejos, por creer en mí, por su admirada fortaleza, por ser una excelente madre y mi mejor amiga.

A mis hermanos **Alahir** y **Ángel**, por ser parte de mis aventuras y de toda mi vida, por todo su cariño, por sus ánimos e incondicional amistad.

A mi cuñada **Mayra** y a mi adorado sobrino **Dalí**, por formar parte de mi familia, por sus alegrías y apoyo.

A mi tía **Esther “Teté”** y a mis primos **Eduardo** y **Sugeidy**, por sus preocupaciones, alegrías y apoyo incondicional.

A mis amigos y compañeros de generación en especial a **Abigail**, **Belén**, **Amira** y mi ahijada **Joselyn**, **Carlitos** y el inolvidable **Seo**, por ustedes que me otorgaron la oportunidad de vivir hermosos momentos y brindarme su sincera amistad.

A ti **Jorge** mi compañero de batallas y el ser que me cautivó, con quién me siento protegida, el que no se rindió ante nada y en los momentos que sentí consternación me hiciste ver que las cosas eran más fáciles de lo que pensaba, a ti con mucho amor.

De corazón y por siempre **Nelly...**

RESÚMEN

El presente trabajo se efectuó en el Laboratorio de Ensayos de Semillas del Centro de Capacitación y Desarrollo en Tecnología de Semillas, perteneciente al Departamento de Fitomejoramiento de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en conjunto con el Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional de Yautepec, Morelos, México.

Fue evaluado el efecto bactericida de los ácidos fúlvicos con bacterias saprófitas del suelo facultativamente fitopatogénicas y simbióticas. La cepa de la bacteria fitopatogénica fue aislada a partir de semillas de acelga, fue identificada como fitopatogénica mediante sus características morfológicas y patogénicas, a través de pruebas para la identificación de bacterias fitopatogénicas a nivel género, dando positivo para el género *Clavibacter*.

En el caso de la bacteria fitopatogénica, se utilizaron concentraciones de 0, 500, 1500, 2500 y 3500 ppm de ácidos fúlvicos concentrados al 14%, probadas a diferentes diluciones de inóculo: 2,093,077; 1,113,694; 557,425 y 95,496 ufc/mL, expuestas a los ácidos fúlvicos a 30, 60 y 90 minutos.

El análisis estadístico de los resultados indicó que los resultados obtenidos revelaron que existen diferencias significativas entre todos los tratamientos experimentados. Por lo que los ácidos fúlvicos poseen efecto bactericida en bacterias fitopatogénicas, en la dosis de 3500 ppm de ácidos fúlvicos, y a una concentración de inóculo de

95,496 ufc/mL, y a los 30 minutos de exposición, se obtuvo un 99.19% de control, aunque también el efecto bactericida fue consistente cuando se utilizaron dosis de 2500 ppm que sólo permitió sobrevivir el 0.44% de 282,926 ufc/mL.

La cepa de *Rhizobium* se obtuvo a partir de nódulos de raíces de frijol colectadas en el vivero experimental del Departamento de Interacciones Planta-Insecto, perteneciente al Laboratorio de Fitopatología del CeProBi.

En este caso se utilizaron concentraciones de 0, 500 y 3500 ppm de ácidos fúlvicos, con diluciones de inóculo de 1,252; 1,044 y 348 ufc/mL, con tiempos de exposición de 30 y 90 minutos.

Sin embargo en *Rhizobium* sp. el dato más revelador indicó que existe un control de 60% al tiempo de 30 minutos, y por el contrario existe un incremento del inóculo en un 58.62% en la dosis de 500 ppm.

Con esto se asegura la actividad bactericida que poseen los ácidos fúlvicos en una bacteria fitopatógena y el efecto que causa hacia la microbiota benéfica, al menos en las pruebas microbiológicas realizadas en esta investigación.

Palabras clave: Bacterias saprófitas, ácidos fúlvicos, *Clavibacter*, *Rhizobium*.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
AGRADECIMIENTOS.....	ii
DEDICATORIAS.....	iii
RESÚMEN.....	iv
INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivos.....	2
Hipótesis.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
1.1 La agricultura ecológica y el cuidado del medio ambiente.....	4
1.1.1 Impacto ambiental de los pesticidas sintéticos.....	6
1.1.2 Residualidad de los pesticidas sintéticos.....	7
1.1.3 Tratamientos de protección a semillas.....	7
2.1 Las sustancias húmicas.....	9
2.2.1 Los ácidos fúlvicos.....	14
2.2.1.1 Efectos de los ácidos fúlvicos en el desarrollo vegetal.....	14
2.2.1.2 Propiedades de los ácidos fúlvicos.....	15
2.2.1.3 Constitución molecular de los ácidos fúlvicos.....	16
3.1 Bacterias saprofitas facultativas asociadas con la agricultura.....	17
3.1.1 Bacterias fitopatógenas.....	17
3.1.1.1 Características generales de los géneros de bacterias fitopatógenas.....	18
3.1.1.2 Clasificación del género <i>Clavibacter</i>	23
3.1.2 Bacterias fitopatógenas asociadas a semillas.....	27
3.1.3 Bacterias simbióticas en cultivos agrícolas.....	28

3.1.3 .1 Características generales de las bacterias simbióticas asociadas a cultivos agrícolas.....	32
3.1.3.2 Clasificación del género <i>Rhizobium</i>	34
3.1.3.3 Relación simbiótica bacteria-planta en los agroecosistemas.....	35
MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
CONCLUSIONES.....	67
LITERATURA CITADA.....	68
APÉNDICE.....	79

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Pág.
1. Características fundamentales de los géneros bacterianos parásitos de las hortalizas.....	22
2. Fitobacterias que sobreviven en semillas.....	29
1.1 Morfología colonial de las cepas bacterianas aisladas de semilla de acelga.....	45
1.2 Reacciones diferenciales inducidas en pruebas determinativas para género por la cepa bacteriana fitopatógena Acel-B1.....	47
1.3 Análisis de varianza para la variable viabilidad de ufc/mL de <i>Clavibacter</i> spp. tratada con ácidos fúlvicos.....	50
1.4 Comparación de medias de los factores principales en el bioensayo de ácidos fúlvicos e inóculo de <i>Clavibacter</i> spp.....	51
1.5 Porcentaje de sobrevivencia de inóculo bacteriano en diferentes diluciones de ufc de <i>Clavibacter</i> spp. tratadas con ácidos fúlvicos a diferentes dosis a los 30 minutos de exposición.....	53
1.6 Porcentaje de sobrevivencia de inóculo bacteriano en diferentes diluciones de ufc de <i>Clavibacter</i> spp. tratadas con ácidos fúlvicos a diferentes dosis a los 60 minutos de exposición.....	54
1.7 Porcentaje de sobrevivencia de inóculo bacteriano en diferentes	

diluciones de ufc de <i>Clavibacter</i> spp. tratadas con ácidos fúlvicos a diferentes dosis a los 90 minutos de exposición.....	55
1.8 Análisis de varianza para la variable viabilidad de ufc/mL de <i>Rhizobium</i> sp. tratada con ácidos fúlvicos.....	60
1.9 Comparación de medias de los factores principales en el bioensayo de ácidos fúlvicos e inóculo de <i>Rhizobium</i> sp.....	61
1.10 Porcentaje de sobrevivencia de inóculo bacteriano en diferentes diluciones de ufc de <i>Rhizobium</i> sp. tratadas con ácidos fúlvicos a diferentes dosis a los 30 minutos de exposición.....	62
1.11 Porcentaje de sobrevivencia de inóculo bacteriano en diferentes diluciones de ufc de <i>Rhizobium</i> sp. tratadas con ácidos fúlvicos a diferentes dosis a los 90 minutos de exposición.....	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. Suspensión de bacterias para efectuar reacción de patogenicidad.....	39
2. Cepa Acel B-1 cultivada en medio de cultivo Yeast Extract-Dextrosa-Calcium carbonate-agar (YDC) (A). Tinción Gram de la cepa Acel-B1 (B).....	46
3. Resultado de la reacción de patogenicidad en plántulas de acelga, 24 horas después de la inoculación con la cepa Acel-B1.....	48
1.1 Medias generales de los tratamientos con ácidos fúlvicos en <i>Clavibacter</i> spp.....	49
1.2 Efecto de los ácidos fúlvicos en ufc de <i>Clavibacter</i> spp. a los 30 minutos de exposición.....	56
1.3 Efecto de los ácidos fúlvicos en ufc de <i>Clavibacter</i> spp. a los 60 minutos de exposición.....	57
1.4 Efecto de los ácidos fúlvicos en ufc de <i>Clavibacter</i> spp. a los 90 minutos de exposición.....	58
1.5 Medias generales de los tratamientos con ácidos fúlvicos en <i>Rhizobium</i> sp.....	59

1.6 Efecto de los ácidos fúlvicos en ufc de <i>Rhizobium</i> sp. a los 30 minutos de exposición.....	64
1.7 Efecto de los ácidos fúlvicos en ufc de <i>Rhizobium</i> sp. a los 90 minutos de exposición.....	65

INTRODUCCIÓN

El manejo de la producción agrícola ha exigido técnicas eficientes de protección vegetal que contribuyan a un incremento sustancial en el rendimiento de los cultivos y que sean inocuos al medio ambiente. El uso de materiales inorgánicos como fertilizantes ha estado unido a la actividad agrícola desde sus orígenes, y su empleo está relacionado íntegramente desde una perspectiva histórica, con el mantenimiento de la productividad de los suelos de cultivo.

Debido al efecto de la residualidad de los pesticidas sintéticos, se ha intensificado la búsqueda y el uso de pesticidas orgánicos para contrarrestar dicha residualidad. Es por esto, que la agricultura orgánica se concentra en utilizar materiales orgánicos como las sustancias húmicas, formados a partir de la degradación biológica y química de plantas y animales, y las cuales se dividen en tres fracciones: los ácidos húmicos, los ácidos fúlvicos y las huminas. Las sustancias húmicas de bajo peso molecular como los ácidos fúlvicos, han revelado generar baja residualidad en el suelo cuando han sido aplicados; además poseen un alto contenido de grupos fenólicos con actividad antimicrobiana es bien conocida.

Los compuestos fenólicos son ampliamente utilizados como biocidas industriales para la protección de agentes fungosos e incluso no se descarta la posibilidad de que también tengan acción bactericida, por lo que este trabajo se realiza con el fin de determinar la actividad bactericida de los ácidos fúlvicos contra bacterias saprófitas facultativas, especialmente contra bacterias fitopatógenas.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Determinar el efecto bactericida de los ácidos fúlvicos en bacterias saprofitas facultativas con el propósito de desarrollar tratamientos de protección fitosanitaria a las semillas orgánicas sin dañar al medio ambiente.

Objetivos específicos:

- Evaluar *in vitro* el efecto bactericida de los ácidos fúlvicos sobre bacterias fitopatógenas asociadas a semillas.
- Evaluar *in vitro* la inocuidad de los ácidos fúlvicos con bacterias simbióticas asociadas a cultivos agrícolas.

HIPÓTESIS

Los ácidos fúlvicos tienen un efecto biológico diferencial cuando se aplican a bacterias saprofitas facultativas, actuando como bactericida en bacterias fitopatógenas y como un agente inocuo en bacterias simbióticas.

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 La agricultura ecológica y el cuidado del medio ambiente.

La tendencia del mercado global ha estado encaminado a tomar preferentemente los productos orgánicos con calidades especiales, que son producidos en un contexto de conservación local y fomenta la sociedad y culturas rurales, provocando el rechazo hacia aquellos productos contaminados y contaminantes que atentan contra la salud humana y el bienestar ecológico del planeta (Altieri y Nichols, 2000).

Los sistemas en agricultura se basan en el mantenimiento de la productividad del suelo y su estructura, la aportación de nutrientes a las plantas y el control de los insectos, malas hierbas, plagas y enfermedades, en la rotación de cultivos, los abonos animales, las leguminosas, los abonos verdes, la utilización de residuos orgánicos y aspectos del control biológico de plagas (Labrador, 1996; Lampkin, 2001, Buol *et. al*, 2004; S.I.C.C.F.A., 2004). Todas estas prácticas tienden a favorecer la alta productividad a corto plazo y es cada vez más evidente que las condiciones necesarias para sostener la productividad se está erosionando. Los recursos agrícolas como el suelo, el agua y la diversidad genética han sido usados excesivamente, degradando los procesos ecológicos globales sobre los que se inclina la agricultura (Gliessman, 2002).

Dicha aseveración se basa en alcanzar aquellos objetivos que la agricultura convencional establece: la maximización de la producción y de las ganancias, desarrollando prácticas que no consideran las consecuencias a largo plazo ni la dinámica ecológica de los agroecosistemas (Gliessman, 2002; Lampkin, 2001).

Es por esto, que surge una nueva modalidad de agricultura: la agricultura ecológica, que se manifiesta como respuesta a los problemas derivados de la agricultura convencional intentando abrir un camino de futuro, considerando un sistema que trata de evitar el uso directo o rutinario de los productos químicos muy solubles y todo tipo de biocidas, sean o no de origen natural (Lampkin, 2001; Félix *et al.*, 2008), reforzando con la opción de preservar la productividad de la agricultura requiriendo sistemas sostenibles de producción de alimentos; cuyo alcance se logra mediante practicas de cultivo basadas en el conocimiento adecuado y profundo de los procesos ecológicos que suceden tanto en las parcelas de producción como en el contexto de las cuales ellas son parte, enfocado hacia cambios sociales y económicos que promueven la sostenibilidad en todos los sectores del sistema alimentario (Gliessman, 2002).

Cualquier planteamiento ecológico para el control de plagas y enfermedades que no dependa del empleo de productos químicos, requiere el reconocimiento de que no existe un único factor responsable de una plaga o enfermedad determinada y se basará en la aplicación de diversas prácticas agrícolas que fomenten la

estabilidad y el equilibrio entre los cultivos y sus plagas (Lampkin, 2001; De la Cruz, 2002).

1.1.1 Impacto ambiental de los pesticidas sintéticos.

El uso de plaguicidas de origen químico ha sido en los últimos años la estrategia más empleada en el control de plagas, por lo que ha causado al ambiente alteraciones a las plagas, debido a la resistencia desarrollada (Bautista y Díaz, 2001), con lo que se concatenan una serie de problemas debido a su uso inadecuado, y destacan aquellos relacionados a la alteración del medio ambiente, y el potencial de afectar una amplia gama de ecosistemas, comenzando desde el suelo y sus microorganismos, hasta los animales superiores. Este trastorno puede ser provocado por la toxicidad directa, consecuentemente a la ruptura de las cadenas alimentarias en los ecosistemas y el debilitamiento de los sistemas inmunológicos en seres vivos. (Lampkin, 2001; Odum, 1971; Pimentel, 1980).

Los plaguicidas que incluyen a insecticidas, fungicidas y herbicidas, son productos que tienen una elevada actividad biológica y por lo regular afectan organismos a los que no van dirigidos o sobre procesos biológicos. Los efectos nocivos secundarios son habituales, incluyendo la resistencia a pesticidas por parte de los patógenos o la exacerbación de enfermedades ya presentes (Lampkin, 2001).

1.1.2 Residualidad de los pesticidas sintéticos.

Una gran cantidad de agroquímicos aplicados termina en ríos, lagos y otros acuíferos, donde pueden lixiviarse hacia los mantos acuíferos de donde se extrae agua potable, con la consecuente amenaza para la salud humana (Cremlynn, 1982; Gleissman, 2002; Altieri y Nicholls, 2000).

En el proceso de fabricación de los plaguicidas que contamina el medio ambiente, sea por accidente o por emisiones rutinarias (Lampkin, 2001; Cremlynn, 1982). Como una consecuencia cada vez mayor de los plaguicidas surge el problema de los residuos que los productos dejan en los alimentos. Todos los plaguicidas son tóxicos en alguna medida y es inevitable que su aplicación de lugar a la formación de depósitos y de residuos (Costa *et al.*, 1974).

1.1.3 Tratamientos de protección a semillas.

Es importante recalcar que las semillas son estructuras vivas, las cuales se hallan expuestas a las transformaciones fisiológicas de su naturaleza biológica, como el envejecimiento y la muerte. Ahora bien, ese deterioro natural puede ser acelerado o frenado de alguna forma, dependiendo si se le da o no un tratamiento adecuado en poscosecha (Agris, 1996).

El tratamiento de semillas en un sentido amplio envuelve la aplicación de diversos procesos y/o sustancias a las semillas con el objetivo de preservar o perfeccionar su desempeño y aumentar la productividad de las plantas. En el sentido estricto y más tradicional, el tratamiento de semillas está orientado, exclusivamente, para controlar a los agentes que ocasionan enfermedades que interfieren en la productividad de las plantas cultivadas (Agrios, 1996; Vásquez, 2008).

El tratamiento de semilla puede servir a numerosas funciones: erradicar patógenos de semillas, proteger las semillas en la siembra contra hongos de suelo que causan “*damping-off*” en pre y post emergencia y posteriormente, cuando la plántula emerge, la protege por un tiempo limitado contra hongos que ocasionan enfermedades foliares. Además de eso, el tratamiento garantiza la obtención de un buen establecimiento del cultivo, disminución de las pérdidas y evita la diseminación de organismos patógenos (Dhingra *et al.*, 1980; Messiaen *et al.*, 1995).

Los principales objetivos de la lucha contra la enfermedad son la aplicación de medidas profilácticas directas enfocadas a impedir la infección y la inmunización del huésped mediante creación de nuevas variedades por otros procedimientos. Muchas de las medidas profilácticas implican la aplicación de fungicidas a las semillas, follaje u otras partes de las plantas (Walker, 1973).

Aunque tradicionalmente, las semillas y plántulas de varios cultivos agrícolas, se han protegido contra el ataque de patógenos que se encuentran en el suelo, por medio de fungicidas, bactericidas y antibióticos (Taylor y Harman, 1993).

Sin duda, hacen falta bactericidas adecuados para las plantas y hay un considerable campo para la introducción de tóxicos completamente nuevos en esta área. El problema parece ser la dificultad para encontrar materiales que sean lo suficientemente persistentes como bactericidas y que no dañen a la planta hospedera. Por ejemplo, la estreptomicina y otros antibióticos son activos contra ciertas enfermedades bacterianas de la planta, sin embargo son caros y existe un margen muy pequeño entre la concentración que proporciona el control adecuado de la enfermedad y la que ocasiona daño por la fitotoxicidad (Cremllyn, 1982).

2.1 Las sustancias húmicas.

Los principios de la agricultura ecológica se remontan hacia los elementos del suelo, así como la materia orgánica presente en productos de restos orgánicos en avanzado estado de descomposición y productos sintetizados por microorganismos, como sustancias semejantes a proteínas, ácidos orgánicos, hidratos de carbono, gomas, ceras, grasas, taninos, ligninas, etc.; hasta sustancias húmicas, como los ácidos fúlvicos, ácidos húmicos y huminas, que por lo general son resistentes a una descomposición posterior por los seres vivos (Guerrero, 1996; Lampkin, 2001).

El papel de la materia orgánica en la protección de los cultivos frente a las enfermedades se puso en evidencia al constatar las mejoras en el rendimiento debidas a la aplicación de abonos orgánicos y composta eran mayores en cuanto al contenido de nutrientes (Porta *et al.*, 2003). Posteriores investigaciones muestran que este “efecto humus” se encuentra asociado al incremento de la actividad microbiana, una reducción de la agresividad e infestación de patógenos, un aumento a la resistencia a los virus y una disminución de la toxicidad del suelo (FitzPatrick, 1985; Lampkin, 2001). Además, el empleo de abonos orgánicos permite que las plantas absorban directamente moléculas químicas específicas, tales como fenoles, considerablemente útiles para el desarrollo de su sistema inmunológico. Es por esto, que la aplicación de materias orgánicas contribuye al potencial anti-fitopatogénico de los suelos; en particular, en enfermedades de podredumbre de los semilleros causada por hongos como *Rhizoctonia*, *Fusarium* y *Pythium* (Lampkin, 2001).

Se conocen ciertos elementos químicos de suelo que contribuyen a su potencial anti-fitopatogénico. La descomposición de abonos orgánicos, provoca la liberación de dióxido de carbono que en concentraciones elevadas resulta perjudicial para ciertos patógenos. Al mismo tiempo, las sustancias aleloquímicas producidas por ciertas plantas y por microorganismos que generan el fenómeno de fatiga del suelo, pueden ser degradadas por una microflora activa o ser absorbidas por coloides húmicos, quedando inactivadas (Costa *et al.*, 1974).

La resistencia de la planta individual se ve apoyada por la absorción de fenoles y otros compuestos como el ácido salicílico que tienen un efecto antibiótico, actuando directamente sobre los gérmenes patógenos (Lampkin, 2001).

En los últimos años ha aumentado el interés por los mecanismos implicados en la resistencia del suelo y en la contribución del abonado orgánico al potencial antifitopatogénico del suelo (Costa *et al.*, 1974; Lampkin, 2001; Dhingra *et al.*, 1980), y se ha pensado en los compuestos a base de fenoles, o bien el benceno y sus derivados que forman sustancias tales como fármacos y empleados como conservadores de alimentos y como antisépticos (Bloomfield, 2001; De la Cruz, 2002). Cabe mencionar que los fenoles o también conocidos como ácido fénico y ácido carbólico, son utilizados también en la fabricación de insecticidas y herbicidas, sin embargo, a altas concentraciones se comportan como venenosos (Del Bosque, 2004).

Algunos fenoles relacionados con la resistencia a las enfermedades se encuentran en las plantas ya sean sanas o enfermas, pero su síntesis o acumulación ocurre hasta después de haber ocurrido la infección, a estos fenoles se les puede considerar como compuestos fenólicos comunes, sin embargo, otros compuestos fenólicos no los producen las plantas sanas, excepto cuando son estimuladas por algún patógeno o por algún agente mecánico o químico (Agris, 1996).

Se sabe que los suelos con altos contenidos de materia orgánica y con una actividad biológica resisten a los patógenos de los vegetales, que por lo general se debe a el mayor numero y complejidad de las relaciones plaga-depredador mantienen la estabilidad del ecosistema suelo. Sin embargo, la acción de los suelos resistentes también puede explicarse a partir de que para una nutrición equilibrada es esencial una actividad microbiana elevada, y se aplica la teoría de la síntesis de proteínas (Chaboussou, 1985: citado por Lampkin, 2001).

La materia orgánica no humificada o materia orgánica fresca para la formación de sustancias húmicas, esta integrada por una biomasa vegetal senescente procede de la parte aérea de la vegetación y raíces, y de restos de deyecciones y secreciones de animales; y de una biomasa microbiana, constituida por una masa de microorganismos, y se encuentra muy poco o nada alterada y no se encuentra a la fracción mineral, y es separada por procedimientos físicos (Bohn *et al.*, 1993; S.I.C.C.F.A., 2004).

El humus se encuentra constituido por sustancias resultantes de la alteración de productos sintetizados por las plantas y los microorganismos (Félix, 2008; Bohn *et al.*, 1993).

Las sustancias húmicas, humus en sentido estricto, suponen entre un 60 y un 80% de la materia orgánica del suelo. Son el producto de la alteración de la materia

orgánica por acción microbiana y por procesos abióticos (Bohn *et al.*, 1993; FitzPatrick, 1985).

El humus está formado por una cantidad enorme de distintos constituyentes, muchos de los cuales recuerdan perfectamente los compuestos, presentes en los tejidos biológicos de los que derivan. (Buol *et al.*, 2004; Labrador *et al.*, 1996). Haciendo uso de las distintas características de solubilidad, han podido diferenciarse en las materias húmicas, ciertos grupos de sustancias más o menos distintos entre ellos, los ácidos húmicos y los ácidos fúlvicos (Buol *et al.*, 2004).

Los ácidos húmicos corresponde a la fracción de las sustancias húmicas soluble en medio alcalino e insoluble en medio ácido (Bohn *et al.*, 1993; Labrador 1996). En tanto que los ácidos fúlvicos es la fracción de las sustancias húmicas soluble, tanto en medio alcalino como en medio ácido (FitzPatrick, 1985). Cabe señalar que ni los ácidos húmicos ni los ácidos fúlvicos son un compuesto químico definido. Cada grupo engloba multitud de compuestos diversos más o menos relacionados entre ellos (García, 2005).

Por su parte, los ácidos húmicos y fúlvicos, son macromoléculas aromáticas complejas, muy estables, con estructura polimérica en forma de círculos, cadenas y racimos (FitzPatrick, 1985; Dorronsoro, 2008), y ciclos aromáticos condensados, con aminoácidos, amino-azúcares, péptidos y compuestos alifáticos (Félix *et al.*, 2008).

2.2.1 Los ácidos fúlvicos.

Las sustancias húmicas tienden a formar compuestos más complejos como los ácidos fúlvicos que constituyen una serie de compuestos sólidos o semisólidos, amorfos, de color amarillento y naturaleza coloidal, fácilmente dispersables en agua y no precipitables por los ácidos, susceptibles en cambio de experimentar floculación en determinadas condiciones de pH y concentración de las soluciones de cationes no alcalinos (FitzPatrick, 1985).

2.2.1.1 Efectos de los ácidos fúlvicos en el desarrollo vegetal.

Los ácidos fúlvicos aportan nutrientes y funciona como base para la formación de múltiples compuestos que mantienen la actividad microbiana, que al incorporarla ejercerá distintas reacciones en el suelo como mejorar la estructura del suelo, facilitando la formación de agregados estables con lo que mejora la permeabilidad de éstos, aumenta la fuerza de cohesión a suelos arenosos y disminuye en suelos arcillosos (Guerrero, 1996), mejoran la retención de humedad del suelo y la capacidad de retención de agua, estimula el desarrollo de plantas, mejora y regula la velocidad de infiltración del agua, disminuyendo la erosión producida por el escurrimiento superficial, eleva la capacidad tampón de los suelos, su acción quelante contribuye a disminuir los riesgos carenciales y favorece la disponibilidad de algunos micronutrientes (Fe, Cu y Zn) para la planta, aportan elementos minerales en

bajas cantidades, y es una importante fuente de carbono para los microorganismos del suelo (Guerrero, 1996; Buol *et al.*, 2004).

Debido a los grupos carboxilos e hidroxilos fenólicos y alcohólicos de los ácidos fúlvicos, intervienen en la raíz de los hipocotilos, como un resultado de su actividad quelatante con el hierro (Labrador, 1996). Los compuestos de bajo peso molecular intervienen en la solución de iones metálicos e influyen en el transporte hacia las raíces de las plantas (García, 2005).

2.2.1.2 Propiedades de los ácidos fúlvicos.

Las plantas fertilizadas orgánicamente no pueden infectarse con bacterias patógenas, porque el calor y la microflora benéfica controlan esas poblaciones patógenas (De Bauer, 1987). Adicionalmente, los ácidos fúlvicos contenidos en la materia orgánica humificada aumentan la capacidad de retención de agua y la aireación del suelo, mejoran la agregación del suelo y evita su encostramiento. En la planta los ácidos fúlvicos estimulan el desarrollo de raíces y tallos, mejoran la absorción de nutrientes, estimulan y aumentan la absorción de nitrógeno, entre otros (Porta *et al.*, 2003; Félix *et al.*, 2008).

2.2.1.3 Constitución molecular de los ácidos fúlvicos.

Los ácidos fúlvicos son de color amarillo claro a café-amarillento, de bajo peso molecular (de 170 a 2000 Kda), 45 % de carbón y 48 % de oxígeno (12 % más que los AH). Los ácidos fúlvicos tienen alto contenido de oxígeno, pero bajo contenido de carbón; contienen más grupos funcionales de naturaleza ácida, particularmente carboxilos (COOH). La acidez total es de 900 a 1400 meq/100g y considerablemente más altos que los ácidos húmicos (400 a 870 meq/100g) (Stevenson, 1982) que se debe básicamente a un alto contenido en grupos funcionales oxigenados COOH, OH fenólico, OH alcohólico y C = O quinónico, hidroxiquinónico y de cetonas α - β insaturadas (FitzPatrick, 1985; Bohn *et al.*, 1993).

El oxígeno de los ácidos fúlvicos puede ser considerado de gran manera, como grupos funcionales (-COOH, OH, C = O), unidos a cadenas alifáticas y ciclos aromáticos, mientras que en los ácidos húmicos, la mayor porción de oxígeno, parece estar presente como un componente estructural del núcleo y/o ciclos aromáticos (Bohn *et al.*, 1993).

El contenido en carbono de los ácidos fúlvicos es de 40 a 50% respectivamente. El contenido en nitrógeno generalmente es de 0.8% a 3%. El contenido en oxígeno es de 44 a 50%, es por esto que el contenido en grupos funcionales oxigenados en los ácidos fúlvicos parece ser mayor que en cualquier otro

polímero orgánico presente en la naturaleza (Labrador, 2008; Bohn *et al.*, 1993.; Lampkin, 2001; Del Bosque, 2004).

3.1 Bacterias saprofitas facultativas asociadas con la agricultura.

La mayoría de las bacterias asociadas con la agricultura son saprófitas estrictas, y por lo tanto benéficas al hombre porque intervienen en la descomposición de la materia orgánica. Las bacterias fitopatógenas son saprófitos facultativos (Agrios, 1994; De la Garza, 1999), denominados parásitos no obligados, que pueden desarrollarse sobre hospedantes vivos o muertos, y viven gran parte o todo su ciclo de vida como parásitos pero, en ciertas condiciones pueden desarrollarse de manera saprófita sobre la materia orgánica muerta (Agrios, 1994), desarrollando una relación fitopatógena causando daño o atacando a los procesos biológicos de las plantas e incluso también manifestándose como organismos simbióticos que actúan sobre la integración de un mismo hábitat en una población viva de manera mutua y benéfica (Dickinson y Lucas, 1987).

3.1.1 Bacterias fitopatógenas.

Se ha reportado que las bacterias son microorganismos patógenos de gran importancia económica, éstas son organismos unicelulares de aproximadamente 3 micras de longitud, de pared celular rígida y no forman esporas. Según las especies, tienen uno o más flagelos que utilizan para su movimiento. Se reproducen por fisión

binaria o de multiplicación asexual (Bigre *et al.*, 1987) y en condiciones cálidas y húmedas se puede producir gran cantidad de células nuevas. Además, en condiciones particulares, producen esporas formadas por aquellas bacterias que se hallan en condiciones ambientales desfavorables (Anaya, 1999; Agrios, 1996). La sustancia que forma las células de las bacterias se condensa, se empobrece de agua; se circunda de robustas membranas, y así la bacteria asume la forma de espora duradera. Las bacterias esporógenas, resisten años en el terreno o resisten más que las otras a las altas temperaturas y a otras condiciones desfavorables (Guirau, 1985).

Los principales géneros de bacterias asociados a las enfermedades de las plantas son: *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Xilella* (Agrios, 1996; De Bauer, 1987; García, 1971; Díaz, 1993).

3.1.1.1 Características generales de los géneros de bacterias fitopatógenas.

Todas las bacterias fitopatógenas son aerobias, aún cuando existen anaerobias facultativas, actividad que ejercen dentro del tejido vegetal en donde en ocasiones prevalecen condiciones anaerobias (De Bauer, 1987). Los agentes patógenos bacterianos de las plantas a excepción de las distintas especies de *Streptomyces*, son bastoncillos que carecen de la facultad de formar esporas (Walker, 1973). Sin embargo, los caracteres generales más utilizados incluyen los

distintos tipos de desarrollo sobre agar en placas y en estrías; la reacción al método de tinción de Gram; licuación de gelatina; reducción de nitratos; producción de indol, ácido sulfhídrico y amoníaco, tipo de desarrollo en leche; producción de ácidos y gases con distintas fuentes de carbono (Walker, 1973). No obstante, aun así, se dificulta la posibilidad de realizar cualquier identificación precisa, debido a la capacidad de mutación de los cultivos, dificultad de separar cultivos mixtos, distinción entre mutaciones y mezclas (Rodríguez, 1991). En el Cuadro 1 se resumen las características más esenciales de las bacterias que tienen importancia fitopatogénica (Messiaen *et al.*, 1995).

Es importante considerar, el hecho que otros caracteres taxonómicos también pueden cambiar, lo que dificulta la caracterización y clasificación de las bacterias fitopatógenas (Walker, 1973), por lo que es necesario su constante revisión.

La sistemática natural basada sobre características morfológicas es insuficiente por que las formas bacterianas son poco numerosas y pueden variar para una misma especie según las condiciones del cultivo (Bigre *et al.*, 1987). La caracterización e identificación de las bacterias fitopatógenas incluyen la sintomatología del hospedero, la morfología celular y de la colonia medio de cultivo, especificidad de hospederos y la reacción a una amplia variación de pruebas serológicas y bioquímicas (Díaz, 1993).

Los síntomas de las enfermedades bacterianas no son típicos y pueden confundirse con los síntomas de las enfermedades criptogámicas, de las virosis, de los ataques de insectos o de alteraciones fisiológicas (Agrios, 1976; de Bauer, 1987); además de que su tamaño es pequeño y no contrastan con los tejidos afectados y es necesario lograr una purificación absoluta para conocer sus características (Sosa-Moss *et al.*, 1997).

Las bacterias patógenas de las plantas en los tejidos enfermos están embebidas en abundantes polisacáridos de los cuales, la bacteria individual puede separarse y liberarse en el aire con dificultad. Para efecto de dispersión es necesario factores como gotas de lluvia, heridas, agua, insectos y el mismo hombre (Agrios, 1976; López, 1994).

La duración del periodo de incubación está gobernado por varios factores de la bacteria patógena, como son: la especie, modo de entrada, densidad de inóculo y tipo de enfermedad; y los factores como la temperatura y la humedad (Bigre *et al.*, 1987).

La temperatura condiciona la actividad de estos patógenos. En mayoría las bacterias necesitan un calor de 20 a 35° C, donde se experimenta una multiplicación intensa que unida a las posibilidades parasitarias mas agudas provoca la muerte rápida de las plantas atacadas (López, 1994), por lo que están especializadas y se

conservan en los vegetales en la parte de éstos que presentan o han presentado síntomas de la enfermedad (Bigre *et al.*, 1987).

La identificación por medio de la evaluación de las características morfológicas de las bacterias fitopatógenas, no son suficientes, para identificarlas debido a semejanzas entre los distintos grupos de estos microorganismos (Agrios, 1996; De Bauer, 1987). La aparición de síntomas depende de la resistencia de la planta a la enfermedad, la virulencia de la bacteria, y las condiciones ambientales (López, 1994).

El ataque bacteriano incluye síntomas como pudriciones blandas, manchas foliares, amarillamientos, tizones, enfermedades vasculares y agallas (De Bauer, 1987). La transmisión por semillas también suele ser frecuente, donde las bacterias únicamente afectan el tegumento o invaden los cotiledones (Messiaen *et al.*, 1995). Estos daños se proyectan hacia la invasión de tejidos vasculares, destrucción del tejido parenquimatoso y la estimulación de la división celular sin diferenciación (hiperplasia) (García, 1971) así como síntomas de desecación y necrosis en tejidos de las hojas, como resultado de la destrucción de las membranas celulares (Agrios, 1994).

Las bacterias fitopatógenas entran en relación con sus huéspedes de muy distintas maneras a través de heridas, estomas, lenticelos y nectarinos (León, 1987) y los efectos en las plantas varían considerablemente (Walker, 1973).

Cuadro 1. Características fundamentales de los géneros bacterianos parásitos de las hortalizas¹.

Especie	Categoría	GRAM	Desarrollo	Color de las colonias	Pigmentos difusibles	Metabolismo de glucosa	Prueba de oxidasa de Kovacs
<i>Corynebacterium</i> *		+	Lento	Amarillo anaranjado	-	Débil o nulo	-
<i>Pseudomonas</i>	Fluorescentes	-	Rápido	Incoloro	(Fluorescente) +	Oxydativo	+
	No fluorescentes				-		
<i>Xanthomonas</i>	Desarrollo rápido	-	Rápido	Amarillo	A veces +	Oxydatif	-
	Desarrollo lento		Lento		(pardo)		
<i>Erwinia</i>	No pectolíticos	-	Rápido	Incoloro	-	Fermentativo	+
	Pectolíticos		Rápido				
	Saprófitos		Muy rápido	Amarillo			

¹ Cuadro tomado de Messiaen *et al.*, 1995

La presencia de agua líquida suele ser necesaria para permitir que el patógeno se multiplique y se desplace hasta un punto donde la entrada sea posible, posteriormente multiplicándose en los espacios intercelulares de la planta, y así secretar enzimas pectolíticas permitiendo agrandar el espacio donde se encuentran y moverse a través de los tejidos, finalmente reproduce la muerte celular (Manners, 1986).

3.1.1.2 Clasificación del género *Clavibacter*.

Comprende aquellas bacterias consideradas en grupo complejo llamado “bacterias coryneformes” dentro de las cuales estaba el género *Corynebacterium* (actualmente *Clavibacter*) (Sosa-Moss *et al.*, 1997), tienen forma de bastones rectos o ligeramente curvos, presentan segmentos irregularmente teñidos o gránulos e hinchamientos en forma de masa, provocando traqueobacteriosis transmisibles a las semillas (Messiaen, 1995). Por lo regular, estas bacterias son inmóviles, pero algunas especies se desplazan por medio de uno o dos flagelos polares y son Gram negativas (López, 1987; Agrios, 1996). Además son típicamente Gram (+) pero pueden decolorar fácilmente y exhibir una tinción irregular, son estrictamente aerobias, catalasa positivas, oxidasa negativas, no forman ácidos rápidamente, llegan a formar agregados en forma de “V” y “Y” (Sosa-Moss *et al.*, 1997; Schaad, 1988).

Las especies de este género inducen una gran variedad de síntomas en las plantas susceptibles, incluyendo agallas, gomosis y marchitez (Sosa-Moss *et al.*, 1997).

En México la incidencia de enfermedades causadas por *Clavibacter* es muy escasa, por citar alguno, la papa es uno de los cultivos más propensos al ataque por bacterias fitopatógenas y en el caso de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, aún no se existían registros en México. Por el contrario, en el cultivo de cebolla, identificado en Montecillo, Estado de México, la pudrición del bulbo ocasionada por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* se presentó hasta en un 30% de incidencia (Anaya, 1999).

Aunque actualmente se describe la clasificación de las bacterias en uno de los tres dominios que incluyen a los organismos vivos, descrito en el *Árbol de la vida* propuesto por Freeman (2005), se presenta la siguiente clasificación taxonómica sujeta a que la bacteria estudiada es una bacteria fitopatógena.

Clavibacter sensu George Agrios (1997).

Reino.....Prokaryotae

Bacterias

División.....Firmicutes

Clase.....Thallobacteria

Género..... *Clavibacter*

Cabe destacar, que ninguna de las bacterias corineformes fitopatológicas pertenecen al género *Corynebacterium sensu stricto*, representado por el bacilo de la difteria habiéndose creado el género *Clavibacter*, basándose en la estructura de los peptidoglucanos de la pared celular. La especie *Clavibacter michiganensis* está dividida en subespecie, que se diferencian según los resultados de la hibridación de ADN, de la electroforesis de las proteínas y de los tests bioquímicos. Sin embargo, dicho cambio taxonómico no está reconocido por todos los fitopatólogos, ya que algunos prefieren clasificar a estos organismos en especies que se basan en la especificidad del huésped. El análisis de los ácidos grasos parece confirmar dicho reagrupamiento en especies. Por mencionar un ejemplo, el huésped natural de *Clavibacter michiganensis* es la patata, aunque la bacteria haya sido aislada en remolachas azucareras y en campo sobre una especie de mala hierba, *Solanum sarachoides*. Numerosas especies de Solanáceas, entre ellas la berenjena y el tomate, pueden ser infectadas artificialmente, así como de forma natural (Rousselle y Crosnier, 1999).

Algunas incluso, pueden dispersarse a través de suelo contaminado arrastrado por el viento como se ha demostrado para *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, causante de cancro bacteriano del tomate, una de las principales enfermedades en este cultivo (León y Arosemena, 1980; Agrios, 1996). Su principal forma de transmisión es dentro y fuera de la semilla (Dhanvantari, 1989; León y Arosemena, 1980).

Para el control de este patógeno aparece como una medida fundamental el asegurarse de la calidad fitosanitaria de la semilla que se emplee, ya que esta puede constituir la principal fuente de inóculo inicial. En caso de no estar seguros, se puede recurrir a la desinfección de ésta con hipoclorito de sodio al 1% (lejía) por 20 a 25 minutos, o tratamientos con agua caliente a 56 °C por treinta minutos (León y Arosemena, 1980; Agrios, 1996).

En cuanto a control químico, se puede recurrir a aplicaciones preventivas de productos cúpricos como oxiclورو de cobre, óxido de cobre o hidróxido de cobre. Una vez que el problema está presente, estas ayudaran a reducir la velocidad de diseminación de la enfermedad (Cremllyn, 1982). Sin embargo, la lucha química es en general muy decepcionante, solamente dos tipos de materias activas pueden aconsejarse el uso de cobre anteriormente mencionado, que tiene un efecto bacteriostático frena el crecimiento de la población bacteriana pero no las mata, únicamente útil como acción preventiva; y los antibióticos que tienen una acción bactericida, y que actualmente están prohibidos en Francia, debido al riesgo de aparición de razas resistente en las bacterias y el riesgo a la fitotoxicidad en particular con la estreptomycin (Bigre *et al.*, 1987).

Es sin duda el uso de semillas saludables la condición más importante para controlar la enfermedad. Deben usarse sólo semillas que han sido extraídas (Thyr *et al.*, 1973). Una reducción sustancial de infección puede lograrse por el tratamiento químico de la semilla (Dhanvantari, 1989).

Una vez que la enfermedad aparece en una cosecha, la higiene estricta se mide en el desarraigo de plantas infectadas y aislamiento de filas infectadas que puede minimizar la pérdida del rendimiento. Las medidas profilácticas (la destrucción de residuos de la cosecha, desinfección de estructuras y equipo) son esenciales para la prevención de daños y así promover la protección de las cosechas. Las fuentes de resistencia están disponibles (Van Steekelenburg, 1985) pero no se ha incorporado todavía a cualquier grado significativo en los cultivos comerciales.

3.1.2 Bacterias fitopatógenas asociadas a semillas.

Las plagas y fitopatógenos causantes de enfermedades pueden ser transportados por recursos fitogenéticos o materiales vegetales destinados para uso y consumo humano y pecuario (Vásquez, 2008).

Entre los organismos fitopatógenos que pueden ser transportados por las semillas es el grupo de los hongos en primer lugar, seguido de bacterias, virus y algunos nemátodos (Agris, 1997; De Bauer, 1987; Vásquez, 2008). Por lo tanto, la semilla puede ser infectada externa o internamente por una bacteria patógena de plantas durante el curso de desarrollo y maduración de frutos y vainas (Agris, 1996).

Las bacterias que sobreviven en la semilla (Cuadro 2) permanecen viables por mucho tiempo entre 10 y 20 años. Así, la semilla puede infectarse o

contaminarse por varios caminos (López, 1994). La infección de la semilla puede o no presentar síntomas que la distingan. Por ejemplo en el tizón de halo del frijol causado por *Pseudomonas syringae* p.v. *phaseolicola*, cerca del 50% del total de la enfermedad es transmitido por semillas con síntomas (López, 1994).

La sobrevivencia saprofítica significa la capacidad de la bacteria fitopatógena para mantener en el suelo en ausencia de plantas o en plantas muertas o en residuos de las mismas (De Bauer, 1987). Las fitobacterias sobreviven en la fase saprofítica en un estado hipobiótico con una marcada reducción de su actividad metabólica (Agrios 1996; López, 1994).

3.1.3 Bacterias simbióticas en cultivos agrícolas.

Las legumbres (Leguminosaceae o Fabaceae) incluyen unas 18,000 especies distribuidas en aproximadamente 750 géneros entre las que se cuentan la soja, la alfalfa, el trébol y las que producen las arvejas o porotos. Las legumbres constituyen la fuente más importante de alimentos vegetales tanto para los seres humanos como para el ganado. Las legumbres además son esenciales para mantener el balance de nitrógeno del suelo debido a su capacidad de albergar bacterias que utilizan nitrógeno gaseoso que proporcionan a las plantas la fuente de este elemento sin consumir los compuestos nitrogenados presentes en el suelo (Fernández, 2005).

Cuadro 2. Fitobacterias que sobreviven en semillas¹.

Bacteria	Nombre de la enfermedad
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Cáncer bacteriano del tomate
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i>	Marchitez bacteriana de Goos y tizón del maíz
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> p.v. <i>flaccumfaciens</i>	Marchitez bacteriana del frijol
<i>Pseudomonas avenae</i>	Rayado café del arroz
<i>Pseudomonas glumae</i>	Pudrición del grano del arroz
<i>Pseudomonas syringae</i> p.v. <i>glycinea</i>	Tizón bacteriano de la soya
<i>Pseudomonas syringae</i> p.v. <i>lachrymans</i>	Mancha angular de la hojas de las cucurbitáceas
<i>Pseudomonas syringae</i> p.v. <i>pasheolicola</i>	Tizón de halo del frijol
<i>Pseudomonas syringae</i> p.v. <i>pisi</i>	Tizón bacteriano del chícharo
<i>Xanthomonas campestris</i> v.p. <i>campestris</i>	Pudrición negra de las crucíferas
<i>Xanthomonas campestris</i> p.v. <i>malvacearum</i>	Tizón bacteriano del algodón
<i>Xanthomonas campestris</i> p.v. <i>phaseoli</i>	Tizón común del frijol

¹ Cuadro tomado de López, 1994

Ésta condición se puede definir mediante el término de simbiosis, usado para designar la relación entre dos organismos que viven juntos. En algunos casos no tienen efectos unos sobre otros ni siquiera en cuanto a alimentación; en

este caso se llama simbiosis neutral (comensalismo). En otros casos ambos organismos pueden obtener sus nutrimentos uno del otro sin ocasionarse daños, este caso se denomina simbiosis mutua (mutualismo) como en el caso de las bacterias noduladoras de las leguminosas (De Bauer, 1991). Aquí las bacterias obtienen nutrimentos de las células radicales de las leguminosas, y éstas a su vez utilizan el nitrógeno fijado del aire por las bacterias. Se considera que bajo condiciones críticas especiales, las bacterias noduladoras pasan a una fase patogénica (Agrios, 1996).

Finalmente, hay casos en que el organismo vive en asociación con otro ocasionándole daños, como parásito o patógeno lo cuál constituye una simbiosis antagónica, categoría donde se ubican los fitopatógenos (De Bauer, 1991).

Un ejemplo de simbiosis es la fijación simbiótica de nitrógeno. En ella se establece una relación de este tipo entre bacterias heterótrofas de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (denominados colectivamente rizobios) y plantas leguminosas. Los microorganismos son albergados por raíces o tallos y así logran, mediante sistemas enzimáticos específicos, que el nitrógeno gaseoso (N_2) que no es aprovechable por las plantas se transforme en amonio que puede ser utilizado por ellas. La asociación es mutuamente beneficiosa porque permite que las bacterias obtengan hidratos de carbono del vegetal mientras que este se beneficia incorporando nitrógeno del aire. Esto a su vez impide que el suelo pierda sustancias con nitrógeno (Fernández, 2005).

La función clorofílica en las plántulas resulta poderosamente influida por el nitrógeno existente en el suelo: cuanto más asimilable sea la forma en que aparezcan sus compuestos, tanto más favorecida se verá la planta. Las necesidades de nitrógeno son muy variables en esta etapa, dependiendo no sólo de la especie cultivada, sino de otros muchos factores (humedad, temperatura, inoculación, reacción del suelo, etc.). Conforme la simbiosis con *Rhizobium* va proporcionando a las plantas nitrógeno asimilable en forma de compuestos del suelo por parte del sistema asimilador de las mismas; solamente en el caso de una interrupción de la actividad simbiótica, por ejemplo, por la acción de un bacteriófago, la planta puede necesitar una aportación nitrogenada del suelo (Mateo, 1961).

Por lo tanto, la fijación biológica de nitrógeno es la conversión enzimática de nitrógeno gaseoso a amonio; es una característica exclusiva de procariontes y se encuentra distribuida en muchos géneros de bacterias (Young, 1992). Además de las bacterias fijadoras de nitrógeno en vida libre, existen bacterias del suelo que se asocian a plantas y, en particular, un grupo de éstas (de los géneros *Rhizobium* y otros relacionados) se asocian a leguminosas (Mateo, 1961). La asociación *Rhizobium*-leguminosa contribuye entre un 1/3 y un 1/2 del nitrógeno fijado de la atmósfera y se basa en el intercambio de carbono por nitrógeno entre ambos simbioses ya que para las plantas el nutriente más limitante es el nitrógeno (Núñez, 2009).

3.1.3.1 Características generales de las bacterias simbióticas asociadas a cultivos agrícolas.

Existe una estrecha relación simbiótica entre vegetales superiores y colonias de bacterias nitrificantes, este género de bacterias se alojan en las raíces creando nódulos bacterianos (Pérez, 2006). Las cuales fijan el nitrógeno atmosférico y con los azúcares que obtienen de la planta, fijan el nitrógeno dentro de la biomasa bacteriana. Si las bacterias satisfacen sus necesidades de nitrógeno, entonces, el nitrógeno pasa a la planta, y pueden observarse niveles elevados de proteína en la planta. Este nitrógeno elevado no se libera al suelo hasta que muere parte de la planta, o se exuda al suelo en la rizósfera (López, 1994; Mateo, 1961).

Gracias a sus simbioses, capaces de fijar el nitrógeno atmosférico, las leguminosas no requieren abonos nitrogenados. Posiblemente, los distintos grupos de leguminosas tendrán como simbioses distintas especies del género *Rhizobium*, pero esto no es seguro (Núñez, 2009).

Todas las especies de rhizobia forman nódulos en las raíces o tallos de las leguminosas y se establecen dentro de estas estructuras en donde proliferan, se diferencian y fijan nitrógeno. Existe especificidad en esta relación, lo que significa que una especie de leguminosa establece simbiosis con un limitado número de especies de rhizobia (Muñoz y Serrato, 1995; Zavaleta, 1989).

La simbiosis entre los rizobios y las leguminosas no es debida a una especialización de un nicho ecológico particular puesto que la distribución de las leguminosas es muy amplia, sino que se trata de una relación debida a características genéticas particulares de las leguminosas que no se presentan en otros grupos de plantas y que durante la evolución no han aparecido más de una vez (Anónimo, 2008).

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, conocidas como PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), se caracterizan por ser rizobacterias que colonizan las raíces de las plantas y estimulan significativamente el crecimiento vegetal tanto de forma directa como indirecta (Fernández, 2005).

El empleo de rizobacterias en la producción agrícola de remolacha azucarera, calabaza y tomate, resulta viable y beneficioso, no sólo en el incremento de la producción agrícola, sino también en el rendimiento global, ya que posiblemente se abaraten los costos económicos. Además supone una alternativa al uso de productos fitosanitarios, ya que en ocasiones se emplean de forma abusiva. Estas técnicas de control biológico resultan más compatibles con el desarrollo de una agricultura más racional y sostenible (Pérez, 2006; Zavaleta, 1989).

3.1.3.2 Clasificación del género *Rhizobium*.

López (1994), propone la siguiente clasificación taxonómica para el género *Rhizobium*.

Reino..... Procaryotae
Phyllum..... Procariota
Clase..... Proteobacteria alfa
Orden..... Rhizobiales
Familia..... Rhizobiaceae
Género..... *Rhizobium*

La diversidad genética de *Rhizobium* aislados de nódulos de frijol disminuye considerablemente en algunas variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*), si se siembran éstas en presencia de fertilizantes nitrogenados (Mateo, 1961). El nitrógeno fijado añadido como fertilizante químico inhibe la formación de los nódulos y la fijación de nitrógeno cuando se añade a plantas noduladas. El proceso de fijación de nitrógeno es muy costoso energéticamente y esto tal vez explique la fácil pérdida de los genes de fijación de nitrógeno (Muñoz y Serrato, 1995).

3.1.3.3 Relación simbiótica bacteria-planta en agroecosistemas.

El crecimiento de la mayoría de los vegetales depende de la presencia, en el suelo, de nitrógeno en cantidad suficiente. Sin embargo, una familia de vegetales, las leguminosas, suple parcialmente esta carencia, asociándose con bacterias del suelo del género *Rhizobium*, capaces de captar el nitrógeno presente en el aire. Cuando estas bacterias entran en contacto con su hospedero vegetal, provocan a nivel de las raíces la aparición de nódulos en los cuales se refugian (Núñez, 2009). Esta relación estrecha llamada simbiosis favorece a ambos organismos: la planta proporciona elementos nutritivos a la bacteria, y esta última le restituye a cambio el nitrógeno que almacenó (Guirau, 2007).

Las bacterias viven dentro de nódulos en la raíces de las leguminosas, proporcionan a las plantas todo el nitrógeno que necesitan para producir compuestos nitrogenados como clorofilas, proteínas y ácidos nucleicos, y las leguminosas suministran a las bacterias, azúcares y otras moléculas orgánicas ricas en energía (Sáenz, 2008).

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Ensayos de Semillas del Centro de Capacitación y Desarrollo en Tecnología de Semillas, perteneciente al Departamento de Fitomejoramiento de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, ubicada en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, en conjunto con el Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional de Yautepec, Morelos, México.

- **Bioensayo con Bacterias Fitopatógenas.**

Aislamiento. El inóculo fue aislado a partir de semillas de acelga (*Beta vulgaris* var. *cuspidata*). Se utilizaron 100 semillas las cuales fueron sumergidas en una solución isotónica (Duveiller y Klaus, 1997), promoviendo el desprendimiento de cualquier propágulo para obtener una suspensión. Se tomó una alícuota de 0.5 mL de la solución madre para realizar diluciones seriadas de 10^{-1} hasta 10^{-9} en tubos de ensayo con 5 mL de agua destilada estéril, bajo condiciones asépticas. De cada dilución se transfirieron 0.2 mL. a placas Petri con medio malta-sal-agar (MSA) elaborado como se ha descrito previamente (Sosa-Moss *et. al*, 1997), depositando hacia al extremo de la placa para difundir con una asa bacteriológica previamente flameada., después se incubaron a 24 °C durante 48 horas.

Prueba de patogenicidad. A las cepas desarrolladas se les realizó la prueba de patogenicidad con trozos de zanahoria y papa. La prueba de patogenicidad se efectuó colocando trozos de papa y zanahoria en cajas Petri bajo condiciones asépticas. La papa y la zanahoria fueron lavadas y esterilizadas superficialmente sumergiéndolas en alcohol etílico al 70%, para después flamear. El cultivo bacteriano de 24 horas, fue inoculado asépticamente por punción en cada una de las rebanadas. Se incubaron a 25 °C durante 72 horas y se revisaron visualmente para detectar la presencia de tejidos de apariencia húmeda o reblandecida como indicio de la actividad fisiológica de las bacterias fitopatógenas, seleccionando aquellas cepas que hubieran generado dicha actividad.

Identificación de la cepa. La cepa fitopatógena seleccionada se analizó mediante pruebas fisiológicas y químicas, para identificarla y clasificarla a nivel género, utilizando las siguientes pruebas consideradas en la literatura (Sosa-Moss *et al.*, 1997; American Phytopathological Society, 1980), tales como tinción Gram, prueba de Ryu, prueba de catalasa, producción de H₂S y reacción de patogenicidad. La cepa obtenida fue preservada en medios generales y semi-selectivos como Papa Dextrosa Agar, Extracto de Levadura-Dextrosa-Carbonato de calcio- Agar (YDC), Medio B de King, Peptona-Extracto de Levadura Agar (PY), elaborados como previamente se ha reportado (Gilchrist *et. al*, 1995; Sosa-Moss *et. al*, 1997; Schaad, 1988).

Tinción Gram. Se realizó un frotis de la cepa seleccionada en un portaobjetos, después se aplicó la solución cristal violeta, dejándole actuar por un minuto, lavando el frotis con agua y secando al aire el exceso de agua. Se aplicó una solución de lugol dejando actuar por un minuto. El frotis se decoloró con alcohol etílico, después se enjuagó con agua; posteriormente se cubrió con safranina dejándola actuar por 30 segundos, lavando con agua y secando al aire. Se observó al microscopio compuesto a un aumento de 100x (Benson, 1998; Dhingra y Sinclair, 1995).

Prueba de Ryu. Esta prueba se realizó para corroborar los resultados obtenidos en la tinción de Gram. Se realizó con cepas jóvenes (18-28 hr) y una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 3%. Se colocó una gota de esta solución en un portaobjetos, adicionando una porción de inóculo de la cepa con un asa bacteriológico, la cual fue suspendida en la gota. Dicha gota se reposó por 13 segundos y fue levantada ligeramente para observar si se formaba una especie de hilo mucoide. Si se formaba dicho hilo se diagnosticaba como Gram negativa y en caso contrario Gram positiva (Duveiller y Klaus, 1997).

Prueba de catalasa. Se utilizó peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3%, depositando una gota de esta solución sobre un portaobjetos, mezclándola con una pequeña porción de la cepa cultivada por 24 horas; dicha mezcla se reposó por algunos segundos para inducir una reacción en la que se generaran burbujas. La presencia de burbujas revelaba una reacción positiva a la prueba de catalasa (Schaad, 1988).

Producción de H₂S. El medio de cultivo para la producción de ácido sulfhídrico, preparado como previamente se ha referido (Rodríguez, 1991).

Se tomó una cantidad de cultivo bacteriano con una aguja de disección previamente estéril, insertando hasta perforar el medio para después retirar de la misma manera y finalizar con una estría simple. Los tubos fueron sellados e incubados a temperatura ambiente ($28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$), para ser monitoreados diariamente y evaluar si se presentaba un cambio en la coloración del medio, y determinar el tiempo de la producción de ácidos.

Prueba de patogenicidad en plantas. Se utilizaron plántulas de acelga, sembradas en Peet-Moss esterilizado. Se empleó una suspensión densa de la cepa bacteriana pura en 5 mL de agua destilada estéril, hasta obtener una suspensión con una turbidez dada (Fig. 1).

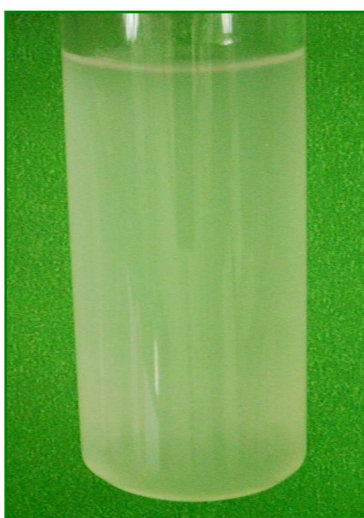


Figura 1. Suspensión de bacterias para efectuar reacción de patogenicidad.

La suspensión fue aplicada por inyección en la parte axial de los tallos. Incubando la prueba en invernadero durante 24 horas. Al terminar dicho periodo se registró la presencia o ausencia de síntomas asociados con parasitismo por bacterias, como flacidez, clorosis y manchas de apariencia húmeda (Agrios, 1996).

Desarrollo de Bioensayo con Ácidos Fúlvicos y la Bacteria Fitopatógena *Clavibacter* spp. Los ácidos fúlvicos (AF) se obtuvieron al 14 % de su concentración, extraídos de composta de gallinaza, provenientes del Departamento de Ciencias del Suelo de la UAAAN.

Se emplearon dosis de AF de 0, 500, 1500, 2500 y 3500 ppm, con 3 repeticiones, en los que se diluyeron concentraciones de inóculo bacteriano de 10^1 hasta 10^{-4} . Dichas concentraciones de inóculo se expusieron a los AF durante tiempos de 30, 60 y 90 minutos. Después de cada uno de los períodos de exposición se tomó una alícuota de 0.25 mL de cada repetición por tratamiento, depositando en cajas Petri con medio PDA, difundíendolas asépticamente con una varilla de vidrio. Las cajas se incubaron a 25 °C durante 48 horas, después de dicho periodo se realizó el conteo de las colonias viables por cada tratamiento, mediante una plantilla milimétrica con la que se estimó el total de ufc viables en la superficie de la placa, al multiplicar las colonias detectadas en promedio, considerando los cinco centímetros cuadrados distribuidos en un sistema de muestreo de 5 de oros, y cuya conversión a ufc/mL consistió en una regla de tres simple, multiplicando el promedio de las ufc desarrolladas en cada tratamiento por 1 mL entre los 0.25 mL de muestra.

Análisis estadístico. Dicho análisis se realizó bajo un diseño experimental completamente al azar con arreglo trifactorial (AxBxC), donde los factores principales fueron: A= Dosis de ácidos fúlvicos; B= Concentraciones de inóculo y C= Tiempos de exposición, co3 repeticiones; teniendo como variable el número de ufc viables por tratamiento.

Se realizó el ANOVA de los tratamientos y comparaciones apareadas de medias utilizando la prueba de Tukey con el programa SAS (Statistical Analysis System® version 8.0) bajo el siguiente modelo experimental:

$$Y_{ijklm} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \xi_{ijklm}$$

Donde:

$$i = 1, 2, \dots, A \quad j = 1, 2, \dots, B \quad k = 1, 2, \dots, C$$

Y_{ijklm} = Número de ufc viables en la ijklm-ésima unidad experimental

μ = Efecto de la media general del experimento

α_i = Efecto verdadero de la i-ésima dosis de ácidos fúlvicos (A)

β_j = Efecto verdadero de la j-ésima dilución de inóculo (B)

γ_k = Efecto verdadero del k-ésimo tiempo de exposición (C)

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Efecto verdadero de la interacción de la i-ésima dosis de ácidos fúlvicos con la j-ésima dilución de inóculo (AB)

$(\alpha\gamma)_{ik}$ = Efecto verdadero de la interacción de la i-ésima dosis de ácidos fúlvicos con el k-ésimo tiempo de exposición (AC)

$(\beta\gamma)_{jk}$ = Efecto verdadero de la interacción de la j-ésima dilución de inóculo con el k-ésimo tiempo de exposición (BC)

$(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$ = Efecto verdadero de la interacción de la i-ésima dosis de ácidos fúlvicos con la j-ésima dilución de inóculo y el k-ésimo tiempo de exposición (ABC)

ξ_{ijklm} = Error experimental en la ijklm-ésima unidad experimental

Antes de efectuar el análisis estadístico, se realizaron transformaciones estadísticas, dados a la complejidad de los datos con la función logaritmo base 10 que se realizó con la finalidad de ajustar los datos a una distribución estadística acorde al modelo utilizado en el experimento (Padrón, 2003) y que consiste de:

$$\text{Log } a(b) = c$$

- **Bioensayo con Bacterias Simbióticas.**

Aislamiento. La cepa de *Rhizobium* fue aislada de nódulos de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculadas con la cepa caracterizada correspondiente al cepario del CeProBi y colectados en el vivero experimental del Departamento de Interacciones Planta-Insecto, perteneciente al Laboratorio de Fitopatología. Se obtuvieron 9 nódulos desprendiéndolos de las raíces de las plantas, éstos fueron colocados en un vidrio siracuse para ser lavados con agua corriente quitando excesos de suelo y desinfestándolos con una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante 90 segundos. Cada nódulo fue prensado con una pinza de disección

asépticamente, hasta obtener inóculo bacteriano, cultivándolo en cajas de Petri con PDA e incubándolas a 25 °C.

Desarrollo de Bioensayo con Ácidos Fúlvicos y la Bacteria Simbiótica *Rhizobium* sp. Se tomó una porción determinada de cultivo de 48 horas de antigüedad, suficiente para realizar una solución madre con una turbidez que eventualmente fue cuantificada. Posteriormente se realizaron 3 diluciones seriadas de inóculo transfiriendo 0.5 mL en cada tubo de ensayo estéril con 5 mL de agua destilada, se emplearon concentraciones de 0, 500 y 3500 ppm de AF, con diluciones seriadas de inóculo de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} , a 2 tiempos de exposición, 30 y 90 minutos, con 4 repeticiones por tratamiento. Se aplicaron 10 μ L del inóculo procesado para cada tratamiento en placas Petri de 40 x 15 cm con medio PDA, difundiendo con una varilla metálica bajo condiciones asépticas. Fueron incubadas a 25° C, durante 48 horas, realizando conteos de las ufc viables presentes en el área total de la caja Petri, como se mencionó anteriormente en las bacterias fitopatógenas.

Análisis estadístico. Se realizó el análisis bajo un diseño experimental completamente al azar con arreglo trifactorial (AxBxC), donde los factores principales fueron: A= Dosis de ácidos fúlvicos; B= Concentraciones de inóculo y C= Tiempos de exposición, con 4 repeticiones; tomando como variable el número de ufc viables por tratamiento. Se realizó el ANOVA de los tratamientos y comparaciones de medias utilizando la prueba de Tukey con el programa SAS (Statistical Analysis System® versión 8.0). Antes de ejecutar el análisis

estadístico, se realizaron transformaciones estadísticas de los datos a la función de Logaritmo base 10, ajustándolo al procedimiento antes mencionado en el ensayo de bacterias fitopatógenas y ácidos fúlvicos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El aislamiento del extracto de semillas de acelga generó 3 colonias que fueron seleccionadas de acuerdo a su morfología colonial. En el Cuadro 1.1 se muestran las características morfológicas que presentaron cada una de ellas.

Cuadro 1.1. Morfología colonial de las cepas bacterianas aisladas de semilla de acelga.

Cepa*	Morfología colonial			
	Color	Configuración	Margen	Elevación
Acel-A	Blanco	Redonda	Liso	Plana
Acel-B1	Amarillo	Redonda	Entero	Umbonada
Acel-C1	Gris	Redonda	Liso	Plana

*Acel-A, B1 y C1 corresponden a los diferentes tipos de colonias bacterianas aisladas del extracto de semilla de acelga de la misma muestra.

La cepa Acel-B1 resultó positiva a la prueba de patogenicidad en tejido de papa, después de reaislar el tejido dañado se comprobó que era la misma cepa, considerando la morfología colonial correspondiente, la cual se procedió a caracterizar. Se utilizaron en total 6 pruebas, para identificar el género de la cepa Acel-B1, las cuales son mencionadas en el Cuadro 1.2. En la prueba de Gram aplicada a dicha cepa, fueron observadas células teñidas de color liliáceo además que presentaban forma de bastón y una ligera curvatura llegando a formar agregados en forma de “V” y “Y”, comprobando con la prueba de Ryu, donde se

observó que la presencia del hilo mucoso no se hizo evidente, dando una reacción negativa, corroborando así que se trata de una bacteria Gram positiva. Asimismo los subcultivos de la cepa Acel-B1 en medio PDA a medio YDC fue persistente la coloración amarilla de las colonias de dicha cepa (Fig. 2). Estos resultados indicaron la posibilidad de que dicha cepa correspondiera al género *Clavibacter*, los cuales concuerdan con la identificación que se hiciera para el género sinónimo *Corynebacterium* por Shaad (1988).

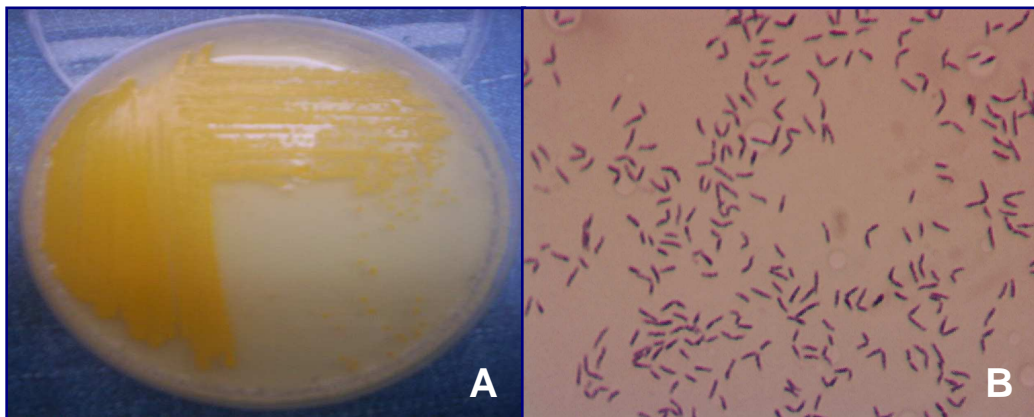


Figura 2. Cepa Acel B-1 cultivada en medio de cultivo Yeast Extract-Dextrosa-Calcium carbonate-agar (YDC) **(A)**. Tinción Gram de la cepa Acel-B1 **(B)**.

En cuanto a la prueba de la catalasa, al transcurrir algunos segundos se emanaron burbujas generando una reacción positiva. En la producción de H_2S , la reacción obtenida concuerda con lo reportado por Sosa-Moss *et al.*, (1997), en el sentido de que la bacteria produce ácidos lentamente, observando que el medio de cultivo cambió de beige a café oscuro.

En la reacción de patogenicidad realizada para comprobar los postulados de Koch, se observó cambios en el tejido inoculado a las 24 horas, esta prueba dio positivo al diagnóstico (Fig. 3).

Cuadro 1.2. Reacciones diferenciales¹ inducidas en pruebas determinativas para género por la cepa bacteriana fitopatogénica Acel-B1.

Pruebas Determinativas	Reacciones en la cepa aislada	Reacciones en <i>Clavibacter</i>	Reacciones en <i>Xanthomonas</i>	Reacciones en <i>Erwinia</i>	Reacciones en <i>Pseudomonas</i>
Gram	+	+	-	-	-
Ryu	+	+	-	-	-
Catalasa	+	+			
Producción de H ₂ S	+ ^a	+ ^a	+ ^b		
Oxidasa	*	-	-	+	+
Aerobiosis y anaerobiosis	*	+, -		+,-	
Reacción de patogenicidad	+	+	+	+	+
Colonia amarilla en YDC ^c	+	+	+	-	-

¹ Reacciones diferenciales reportadas por Sosa *et al.*, (1997) y Duveiller *et al.* (1997)

a La producción de H₂S es lenta

b La producción de H₂S es dentro de los 21 días según el método de Dye (1962) (citado por Rodríguez, 1991)

c Reportado por Shaad (1988)

* Estas pruebas no se aplicaron a la cepa Acel-B1

Se observaron síntomas como desecación y necrosis de los tejidos de las hojas, como resultado de la destrucción de todas las membranas celulares que se encontraban en contacto con las bacterias inoculadas (Agrios, 1994).



Figura 3. Resultado de la reacción de patogenicidad en plántulas de acelga, 24 horas después de la inoculación con la cepa Acel-B1.

En base a los resultados obtenidos se considera que la cepa Acel-B1 potencialmente corresponde al género *Clavibacter*; dichos resultados concuerdan con lo reportado por Sosa-Moss *et al.*, (1997) y Schaad (1988). No obstante la realización de las pruebas para la identificación de la cepa Acel- B1, se propone continuar en futuras investigaciones con dicho proceso hasta confirmar todo el rango de pruebas para identificar el género *Clavibacter* y si es posible determinar la especie correspondiente. Dicho género se ha reportado en hortalizas tales como jitomate, papa y pimiento pertenecientes a la familia Solanaceae (Messiaen, 1995), actualmente poco se sabe de su incidencia en el cultivo de la acelga, aunque en Europa se ha reportado *Corynebacterium betae* en betabel (Neergard, 1977).

Bioensayo con Ácidos Fúlvicos y la Bacteria Fitopatógena *Clavibacter* spp.

Los resultados obtenidos indican que los ácidos fúlvicos (AF) tienen actividad bactericida, considerando sus efectos en la bacteria *Clavibacter* spp. De acuerdo a la comparación visual de medias generales de ufc viables/ml obtenidas en la dosis de ácidos fúlvicos, la que resultó con mayor efecto fue la de 3500 ppm, en comparación con el resto de los tratamientos (Fig. 1.1).

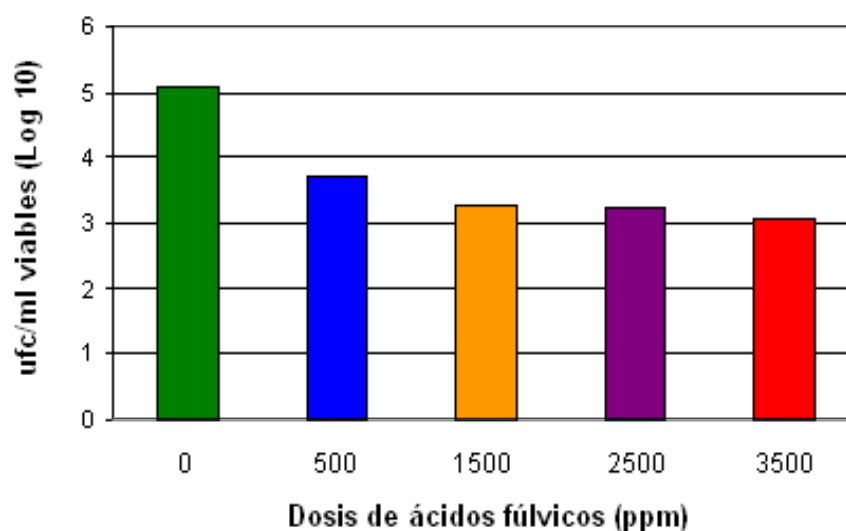


Figura 1.1. Medias generales de los tratamientos con ácidos fúlvicos en *Clavibacter* spp.

Cabe señalar que todos los tratamientos probados fueron estadísticamente diferentes que en relación a las diferencias entre los tratamientos y considerando a los factores: Dosis de AF, Concentración de inóculo y Tiempo de exposición, resultaron altamente significativas ($P= 0.0001$). Las interacciones que influyeron en la eliminación de ufc fueron Dosis de AF x Concentración de inóculo; Dosis de AF x Tiempo de exposición siendo altamente significativas; sin embargo la interacción Concentración de inóculo x Tiempo de exposición ($P= 0.0992$) y la

interacción de los tres factores ($P= 0.5677$), no tuvieron un impacto sobresaliente en la disminución de ufc viables, ya que éstas resultaron no significativas (Cuadro 1.3).

Cuadro 1.3. Análisis de varianza para la variable viabilidad de ufc/mL de *Clavibacter* spp. tratada con ácidos fúlvicos.

FV	GL	CM	FC
Dosis de ácidos fúlvicos	4	13.67809951	256.82**
Concentración de inóculo	3	32.28851372	606.25**
Tiempo de exposición	2	0.26178200	4.92**
Dosis x Conc	12	0.38588502	7.25**
Dosis x Tiempo	8	0.25296981	4.75**
Conc x Tiempo	6	0.09734387	1.83 ^{NS}
Dosis x Conc x Tiempo	24	0.04929995	0.93 ^{NS}

** Diferencia altamente significativa (0.01); ^{NS} Diferencia no significativa

Coefficiente de variación= 4.928919 %

En el Cuadro 1.4 se observó la dosis de AF más efectiva en relación con el tiempo de acción y la concentración de inóculo que propiciaron a dicha efectividad perteneciente a la dosis de 3500 ppm, a una concentración de inóculo de 10^{-4} y a un tiempo de acción de 30 minutos. Cabe señalar que las medias B, C y D del factor Dosis de AF presentaron incidencia mínima comparadas con el grupo A. Por otra parte, la tendencia en el factor Concentración de inóculo presentó una diferencia en todos los grupos, que por lo contrario en el Tiempo de exposición, los grupos A y B están diferenciados por una mínima referencia.

Cuadro 1.4 Comparación de medias¹ de los factores principales en el bioensayo de ácidos fúlvicos e inóculo de *Clavibacter* spp.

Dosis de ácidos fúlvicos (ppm)	ufc/mL viables	Concentración de inóculo (ufc/mL)	ufc/mL viables	Tiempo de exposición (minutos)	ufc/mL viables
0	5.08289 A	10 ⁻¹	4.96663 A	60	3.76055 A
500	3.70707 B	10 ⁻²	3.96663 B	90	3.65540 B
1500	3.27147 C	10 ⁻³	2.96663 C	30	3.61066 B
2500	3.23076 C	10 ⁻⁴	2.77559 D		
3500	3.05215 D				

¹ Tukey $P=0.05$

Medias con diferentes letras en la columna son estadísticamente diferentes.

En cuanto al porcentaje de inhibición de las ufc/ml evaluadas a los 30 minutos de exposición a diferentes dosis de AF, indican que aquellas concentraciones de inóculo tratadas con AF comparadas con las no aplicadas, las ufc se ven reducidas en todos los tratamientos aplicados; este efecto se logra desde la dosis mínima (500 ppm) al permanecer un 14.86% de la primera dilución de inóculo de un total de 311,068 ufc/mL, aunque en la dilución de inóculo de 10⁻² a la misma dosis permaneció el 95.27% de ufc viables, lo que indica que aún no se ha manifestado el efecto de los AF sobre el inóculo bacteriano. No obstante, conforme la dosis de AF se incrementa el porcentaje de ufc/mL viables disminuye

gradualmente hasta llegar a obtener un porcentaje de control del 99.19% en la dosis máxima de AF en las dilución de 10^{-4} (Cuadro 1.5).

La tendencia de las ufc/mL viables expresada en porcentaje a los 60 minutos de exposición, indica que el efecto de los ácidos fúlvicos aumenta, la mayor efectividad se obtiene en la dosis máxima de AF con interacción de las tres primeras concentraciones de inóculo que responde a un porcentaje de hasta de 99.27% en la última dilución de 10^{-4} (Cuadro 1.6). Sin embargo, el máximo porcentaje de control es más notable ante la dosis de 1500 ppm en la última dilución, quedando como inóculo sobreviviente el 99.56%. No obstante la dilución de 10^{-2} muestra una fluctuación en el porcentaje de inóculo sobreviviente, es la dilución que mantiene un porcentaje por encima de la dilución de 10^{-1} (Cuadro 1.6).

El intervalo de cada uno de los tratamientos, se ve conducido a la misma tendencia de eliminación de ufc, puesto que el efecto de los AF influye al porcentaje de las ufc viables desde la dosis mínima y al máximo tiempo de exposición (90 min.). La máxima efectividad se obtiene en la dosis de 3500 ppm y a las diferentes concentraciones de inóculo. El efecto en la dilución de 10^{-4} no obtiene el mismo grado de certidumbre que los tratamientos donde si hubo control, la fluctuación en el porcentaje de las ufc/mL viables persiste, sin embargo, el control más efectivo en esta dilución se presenta a la dosis de 3500 ppm, donde el porcentaje de ufc/mL viables es de 0.42% en la dilución de 10^{-4} (Cuadro 1.7).

Cuadro 1.5. Porcentaje de sobrevivencia de inóculo bacteriano en diferentes diluciones de ufc de *Clavibacter* spp. tratadas con ácidos fúlvicos a diferentes dosis a los 30 minutos de exposición¹.

Diluciones de ufc	Dosis de ácidos fúlvicos (ppm)									
	0		500		1500		2500		3500	
	ufc/mL	% ufc viables	ufc/mL	% ufc viables	ufc/mL	% ufc viables	ufc/mL	% ufc viables	ufc/mL	% ufc viables
10 ⁻¹	2093077	100	311068	14.86	179901	8.59	133936	6.39	88761	4.24
10 ⁻²	1113694	100	1061018	95.27	170590	15.31	126405	11.35	84252	7.56
10 ⁻³	557425	100	84008	15.07	81280	14.58	60029	10.76	40345	7.23
10 ⁻⁴	95496	100	2096	2.19	889	0.93	1565	1.63	781	0.81

¹ Tiempo de exposición se refiere al tiempo del tratamiento de las ufc con los ácidos fúlvicos.

Cuadro 1.6. Porcentaje de sobrevivencia de inóculo bacteriano en diferentes diluciones de ufc de *Clavibacter* spp. tratadas con ácidos fúlvicos a diferentes dosis a los 60 minutos de exposición¹.

Diluciones de ufc	Dosis de ácidos fúlvicos (ppm)									
	0		500		1500		2500		3500	
	ufc/mL	% ufc viables	ufc/mL	% ufc viables	ufc/mL	% ufc viables	ufc/mL	% ufc viables	ufc/mL	% ufc viables
10 ⁻¹	2334800	100	252024	10.79	190205	8.14	121652	5.21	84005	3.59
10 ⁻²	1609236	100	242908	15.09	145761	9.05	107980	6.71	74097	4.60
10 ⁻³	988594	100	119672	12.10	110848	11.21	47865	4.84	32533	3.29
10 ⁻⁴	282926	100	7533	2.66	1804	0.63	1269	0.44	2149	0.75

¹ Tiempo de exposición se refiere al tiempo del tratamiento de las ufc con los ácidos fúlvicos.

Cuadro 1.7. Porcentaje de sobrevivencia de inóculo bacteriano en diferentes diluciones de ufc de *Clavibacter* spp. tratadas con ácidos fúlvicos a diferentes dosis a los 90 minutos de exposición¹.

Diluciones de ufc	Dosis de ácidos fúlvicos (ppm)									
	0		500		1500		2500		3500	
	ufc/mL	% ufc viables	ufc/mL	% ufc viables	ufc/mL	% ufc viables	ufc/mL	% ufc viables	ufc/mL	% ufc viables
10 ⁻¹	4450865	100	137436	3.08	148597	3.33	123633	2.77	40417	0.90
10 ⁻²	2795262	100	155498	5.56	150577	5.38	108062	3.86	31304	1.11
10 ⁻³	633229	100	88564	13.98	77050	12.16	46808	7.39	11414	1.80
10 ⁻⁴	107646	100	4161	3.86	1102	1.02	1424	1.32	460	0.42

¹ Tiempo de exposición se refiere al tiempo del tratamiento de las ufc con los ácidos fúlvicos.

Los efectos bactericidas observados en *Clavibacter* spp. en el número de ufc eliminadas, fue notoria a partir de los 30 minutos de exposición, en la dosis de 3500 en la que se eliminaron hasta un 99% de ufc (Fig. 1.2, Cuadro 1.5). Dicho efecto se observó también en la máxima concentración de inóculo de 10^{-4} , donde las ufc fueron eliminadas en un 99.19% en comparación con el tratamiento sin aplicación (Fig. 1.2, Cuadro 1.5). Sin embargo, el efecto que tuvieron los AF hacia las ufc durante los 30 minutos se expuso un tanto irregular en la dosis de 500 ppm con dilución de 10^{-2} , donde se observa un 95.27% de ufc viables, sin embargo, en todas las dosis se conserva la tendencia de que la eliminación de ufc aumenta de manera progresiva a medida que la densidad de inóculo disminuye en las diluciones respectivas y las dosis de AF se incrementan (Fig. 1.2).

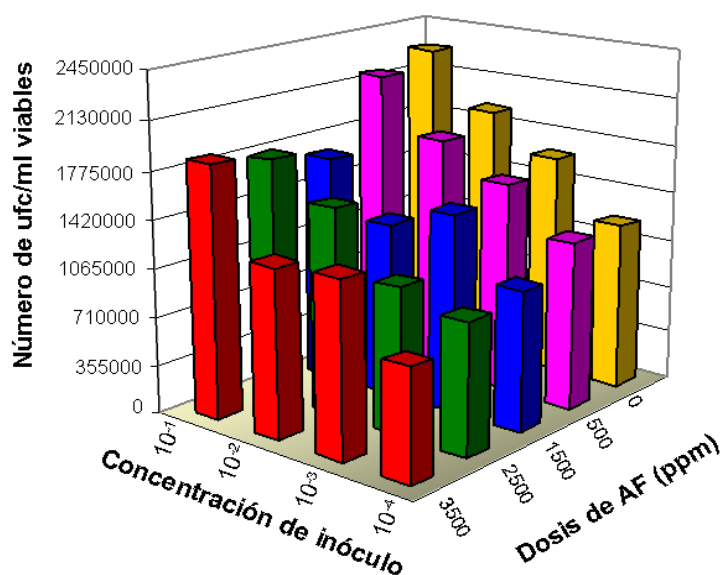


Figura 1.2. Efecto de los ácidos fúlvicos en ufc de *Clavibacter* spp. a los 30 minutos de exposición.

El efecto bactericida de los AF observado en *Clavibacter* spp. a los 60 minutos, persiste en cuanto a la presencia de eliminación de las ufc comparando los tratamientos de AF con respecto a los de no aplicación. La dosis de 3500 ppm permanece como la más efectiva y es la de 3500 ppm en tanto a la dilución de 10^{-4} . La carga microbiana se deriva también a factores de manipulación, que pueden interactuar en este tipo de bioensayos e influir en los resultados obtenidos (Fig. 1.3).

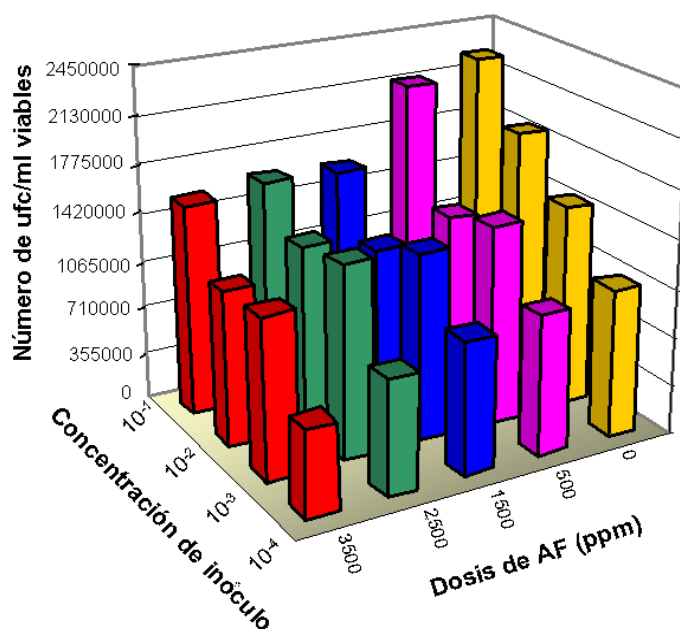


Figura 1.3. Efecto de los ácidos fúlvicos en ufc de *Clavibacter* spp. a los 60 minutos de exposición.

La dosis menos efectiva ante el máximo tiempo de exposición (90 minutos) fue la de 500 ppm (Fig. 1.4), controlando en un 8.02% en la dilución de 10^{-3} . El efecto bactericida se expone desde la dosis de 1500 ppm que incluso de manera general se aprecia una tendencia parecida a la dosis de 2500 ppm y en todas las

concentraciones de inóculo. Por lo tanto, la dosis que más efectividad mostró fue la de 3500 ppm, lo que indica que a una dosis alta y aun tiempo de exposición de 90 minutos, la concentración de inóculo se ve disminuida en un 99.58% (Cuadro 1.6).

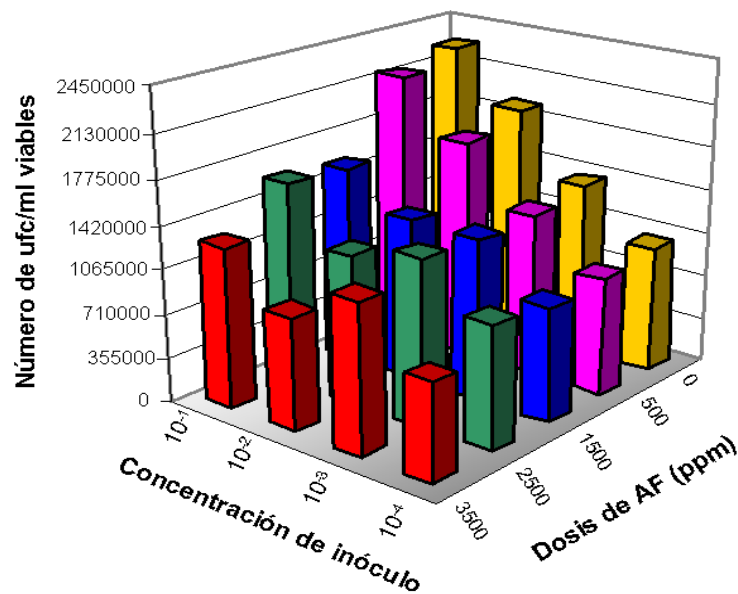


Figura 1.4. Efecto de los ácidos fúlvicos en ufc de *Clavibacter* spp. a los 90 minutos de exposición.

Bioensayo con Ácidos Fúlvicos y la Bacteria Simbiótica *Rhizobium* sp.

Los resultados indican que los ácidos fúlvicos tienen un efecto bactericida hacia la bacteria *Rhizobium* sp., sin embargo la comparación de medias generales de ufc/mL viables obtenidas en las tres dosis de ácidos fúlvicos empleadas, la que resultó con un efecto mayor fue la de 3500 ppm; en cuanto a la dosis de 500 ppm la

carga microbiana se ve incrementada incluso sobrepasando a la dosis del testigo (0 ppm) (Fig. 1.5).

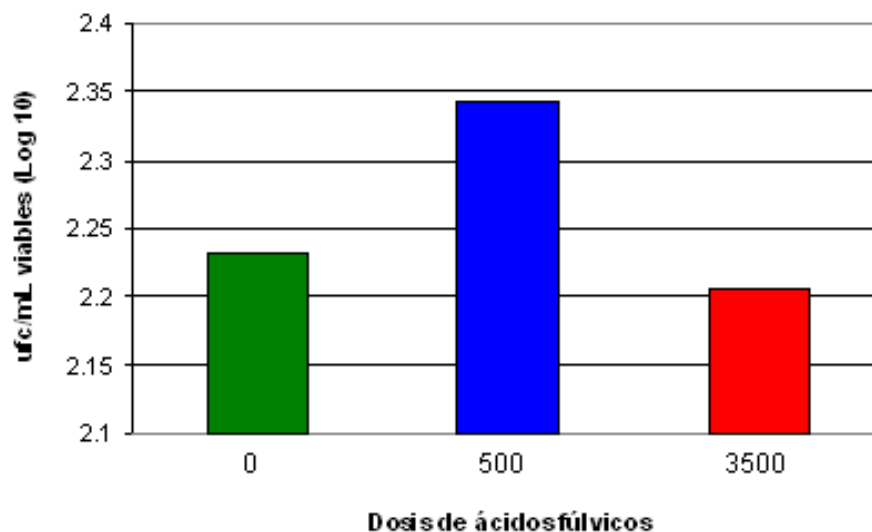


Figura 1.5. Medias generales de los tratamientos con ácidos fúlvicos en *Rhizobium* sp.

Todos los tratamientos probados fueron estadísticamente diferentes que en relación a las diferencias entre los tratamientos y considerando a los factores (Cuadro 1.8) Dosis de AF ($P= 0.0839$) y Concentración de inóculo ($P= 0.0016$) resultaron significativas, en cambio al factor Tiempo de exposición, resaltó una diferencia altamente significativa ($P= 0.0001$). Aquellas interacciones que influyeron en la eliminación de ufc fueron Dosis de AF x Concentración de inóculo ($P= 0.0102$) y Dosis de AF x Tiempo de exposición ($P= 0.0086$), siendo altamente significativas (Cuadro 1.10). La interacción Concentración de inóculo x Tiempo de exposición no influyó en la disminución de ufc viables, ya que ésta resultó no significativa ($P=$

0.5321). La interacción de los tres factores no produjo alguna influencia en la eliminación de las ufc, puesto que resultó no significativa ($P= 0.7538$).

Cuadro 1.8. Análisis de varianza para la variable viabilidad de ufc/ml de *Rhizobium* sp. tratada con ácidos fúlvicos.

FV	GL	CM	FC
Dosis de ácidos fúlvicos	2	0.12337129	2.60 ^{NS}
Concentración de inóculo	2	0.34727372	7.31 ^{**}
Tiempo de exposición	1	1.17596408	24.74 ^{**}
Dosis x Conc	4	0.17470332	3.68 [*]
Dosis x Tiempo	2	0.24700000	5.20 ^{**}
Conc x Tiempo	2	0.03034413	0.64 ^{NS}
Dosis x Conc x Tiempo	4	0.02258569	0.48 ^{NS}

^{**}Diferencia altamente significativa (0.01); ^{*} Diferencia significativa (0.05);

^{NS} Diferencia no significativa

Coeficiente de variación= 9.645688 %

El Cuadro 1.9 reveló que en el factor de Dosis de AF no hubo diferencia entre medias generales y que aún así en términos numéricos la dosis que afecta a la carga microbiana del suelo es de 3500 ppm; en el caso del factor de Concentración de inóculo el grupo A representa a la cantidad de inóculo de más baja concentración. En cuanto al factor de Tiempo de exposición si existe una diferencia de medias generales el grupo B representada por 30 minutos de exposición resulta el tiempo en el que se ven afectada dicha microbiota.

Cuadro 1.9 Comparación de medias¹ de los factores principales en el bioensayo de ácidos fúlvicos e inóculo de *Rhizobium* sp.

Dosis de ácidos fúlvicos (ppm)	ufc/mL viables	Concentración de inóculo (ufc/mL)	ufc/mL viables	Tiempo de exposición (minutos)	ufc/mL viables
0	2.23260 A	10 ⁻¹	2.34154 A	30	2.13254 B
500	2.34176 A	10 ⁻²	2.31733 A	90	2.38814 A
3500	2.20665 A	10 ⁻³	2.12214 B		

¹ Tukey $P=0.05$

Medias con diferentes letras en la columna son estadísticamente diferentes.

El porcentaje de inhibición de las ufc/mL evaluadas a los 30 minutos de exposición a diferentes dosis de AF, demuestra que en aquellas concentraciones de inóculo tratadas con AF comparadas con las de no aplicación, las ufc se reducen en los tratamientos aplicados con dosis de 3500 ppm, este efecto demuestra que existe una afectación de un 49.89% para la dilución de 10⁻¹ y de un 55.56% para 10⁻², si embargo, la concentración de inóculo de 10⁻³ expone una tendencia diferente a las anteriores, incrementando la carga microbiana hasta un 102.29%. Cabe señalar que para la dosis de 500 ppm las concentraciones de inóculo aumentaban llegando a alcanzar en l de 10⁻³ un 158.62% de ufc/mL viables (Cuadro 1.10).

Cuadro 1.10. Porcentaje de sobrevivencia de inóculo bacteriano en diferentes diluciones de ufc de *Rhizobium* sp. tratadas con ácidos fúlvicos a diferentes dosis a los 30 minutos de exposición¹.

Diluciones de ufc	Dosis de ácidos fúlvicos (ppm)					
	0		500		3500	
	ufc/mL	% ufc viables	ufc/mL	% ufc viables	ufc/mL	% ufc viables
10 ⁻¹	1252	100	640	51.11	500	39.93
10 ⁻²	1044	100	892	85.44	464	44.44
10 ⁻³	348	100	552	158.62	356	102.29

¹ Tiempo de exposición se refiere al tiempo del tratamiento de las ufc con los ácidos fúlvicos.

El porcentaje de ufc viables a los 90 minutos de exposición, adquiere un sentido diferente puesto que las ufc viables a una concentración de inóculo de 10⁻¹, expuesta a la dosis de 500 y 350 ppm permanece el 70% de la carga microbiana (Cuadro 1.11). En cuanto a la concentración de inóculo de 10⁻² a las 500 ppm la población aumenta abruptamente hasta alcanzar una viabilidad de un 403.16%. Asimismo para la concentración de 10⁻³ en ambas dosis la ufc/ml viables se ve duplicado el porcentaje de la viabilidad de éstas, en tanto que para la dosis de 500 ppm alcanza hasta un 206.03% y para la de 3500 ppm se obtiene un 279.31%.

Cuadro 1.11. Porcentaje de sobrevivencia de inóculo bacteriano en diferentes diluciones de ufc de *Rhizobium* sp. tratadas con ácidos fúlvicos a diferentes dosis a los 90 minutos de exposición¹.

Diluciones de ufc	Dosis de ácidos fúlvicos (ppm)					
	0		500		3500	
	ufc/mL	% ufc viables	ufc/mL	% ufc viables	ufc/mL	% ufc viables
10 ⁻¹	1424	100	1076	75.56	1012	71.06
10 ⁻²	632	100	2548	403.16	1068	168.98
10 ⁻³	464	100	956	206.03	1296	279.31

¹ Tiempo de exposición se refiere al tiempo del tratamiento de las ufc con los ácidos fúlvicos.

El efecto bactericida de los AF en las ufc de *Rhizobium*, fue evidente a los 30 minutos de exposición en la dosis de 3500 ppm, donde el porcentaje de ufc viables fueron afectadas en casi un 60%, tanto para las concentraciones de 10⁻¹ y 10⁻², sin embargo en la dilución de 10⁻³, el porcentaje de ufc se ve incrementada hasta en la dosis más alta (Figura 1.6, Cuadro 1.10).

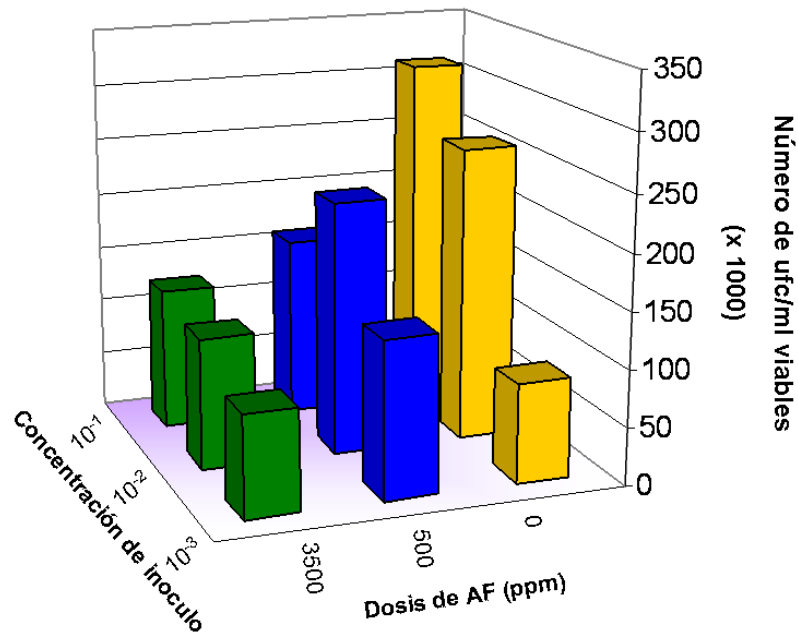


Figura 1.6. Efecto de los ácidos fúlvicos en ufc de *Rhizobium* sp. a los 30 minutos de exposición.

Sin embargo, el número de ufc viables a los 90 minutos (Fig. 1.7) de exposición se incrementa abruptamente en la dosis de 500 ppm únicamente a la concentración de inóculo de 10^{-2} , sobrepasa a la población contenida en el tratamiento de no aplicación. La dosis de 3500 tampoco conserva la acción bactericida contra las ufc, puesto que la población se incrementa en la concentración de 10^{-3} sobrepasando en un 279.31% (Fig. 1.7).

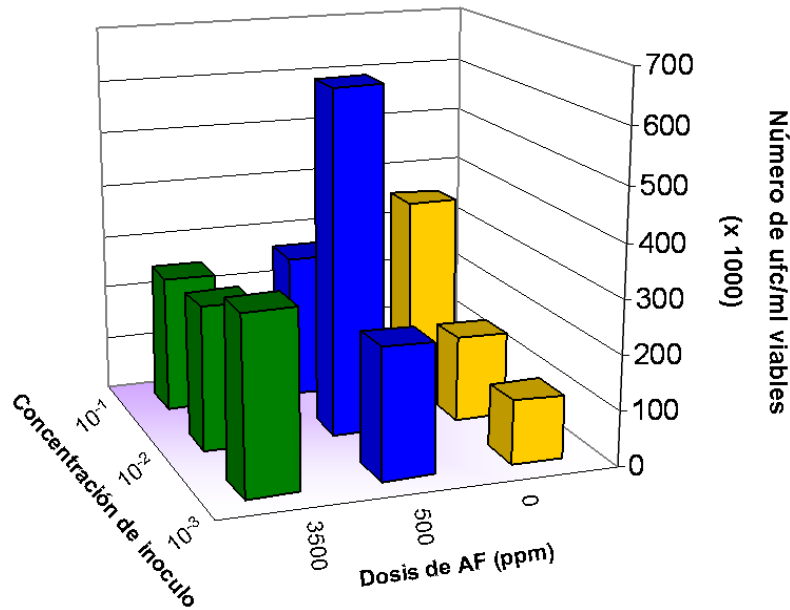


Figura 1.7. Efecto de los ácidos fúlvicos en ufc de *Rhizobium sp.* a los 90 minutos de exposición.

Con la aplicación de los ácidos fúlvicos se han obtenido incrementos de producción de hasta de 50 por ciento en diferentes cultivos y zonas del país y Centroamérica. Se les atribuye el mejoramiento de la calidad de cultivos, como en papa, donde mejora la distribución de los almidones y el tamaño de la misma es más uniforme; en trigo aumenta los contenidos de proteínas; en el tomate, chile y otras hortalizas aumenta el porcentaje de fruto de exportación (Lampkin, 2001). En general existen testimonios de que incrementan la resistencia al ataque de enfermedades, las plantas soportan mejor cualquier tipo de estrés (sequía, heladas, inundaciones, sobredosis de producto, por ejemplo). La recuperación de cultivos es más eficaz con aplicaciones repetitivas de ácidos fúlvicos (Torres y Trápaga, 2000).

Cabe destacar que de acuerdo a los resultados obtenidos en el bioensayo con *Rhizobium* sp. la implicación en la estimulación para el incremento poblacional de organismos benéficos, atribuido a una condición de los AF en ser absorbidos por las células bacterianas a un tiempo dado, que influyeron en su incremento poblacional ya referido.

CONCLUSIONES

- 1) Se aisló una cepa bacteriana fitopatógena identificada como *Clavibacter* spp.
- 2) Los ácidos fúlvicos poseen acción bactericida contra bacterias fitopatógenas, los cuales redujeron la población de hasta un 99.58% aplicando una dosis de 3500 ppm.
- 3) Los ácidos fúlvicos revelaron una tendencia de efecto bactericida diferencial en bacterias simbióticas del suelo como *Rhizobium* sp., en base a las dosis aplicadas, en la que a 500 ppm incrementó la población y a 3500 ppm la redujo de 1,252 a 500 ufc/mL sobrevivientes.
- 4) Los ácidos fúlvicos poseen la condición de inducir el incremento de la carga microbiana de organismos benéficos del suelo como *Rhizobium* sp. creando un equilibrio entre el ambiente del suelo y dicha población de microorganismos. Por lo que se considera que en futuras investigaciones se manejen dosis de equilibrio para explorar posibles tratamientos a la semilla en el control de fitopatógenos asociados al suelo y por otro lado respetar a la microflora benéfica del suelo.

LITERATURA CITADA

Agrios, G. N. 1996. Fitopatología. Segunda edición. Editorial Limusa. México, D.F.
838 pp.

Agrios, G. N. 1997. Plant pathology. Academic Press. San Diego, California, EE.UU.
635 pp.

Altieri, M. y Nicholls, C. 2000. Agroecología: Teoría y Práctica para una Agricultura
Sostenible. Serie Textos Básicos para la Formación Ambiental. ONU-PNUMA.
Montevideo, Uruguay. p. 24-28.

American Phytopathological Society. 1980. Laboratory Guide for Identification of
Plant Pathogenic Bacteria. Shaad, N. W. Ed. Bacteriology Committee APS.
Minnesota, E.E. U.U.

Anaya, R. S. 1999. Hortalizas. Plagas y enfermedades. Editorial Trillas. México, D. F.
544 pp.

Anónimo. 2008. Curso de Microbiología general. Departamento de Producción agrícola. Universidad Pública de Navarra. Pamplona, España. Lección 4. Genética molecular de la infección de las leguminosas por *Rhizobium*. <http://www.unavarra.es/genmic/curso%20microbiologia%20general/53-rhizobium%201.htm>

Bautista, M. N. y Díaz, G. O. 2001. Bases para realizar estudios de efectividad biológica de plaguicidas. Colegio de Postgraduados. Texcoco, Edo. de México. 148 pp.

Benson, H. J. 1998. Microbiological Applications. Laboratory Manual in General Microbiology. Mc GrawHill. EE. UU. 468 pp.

Bigre, J. D., Morand, J. C. y Tharaud, M. 1987. Patología de los cultivos florales y ornamentales. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 233 pp.

Bohn, H. L., Mc Neal, B. L. y O'Connor, G. A. 1993. Química del suelo. Editorial Limusa. México, D. F. 370 pp.

Bloomfield, M. M. 2001. Química de los organismos vivos. Editorial Limusa. México, D.F. 767 pp.

- Buol, S. W., Hole, F. D. y McCracken, R. J. 2004. Génesis y clasificación de suelos. Editorial Trillas. México, D.F. 417 pp.
- Cremllyn, R. 1990. Plaguicidas modernos y su acción bioquímica. Editorial Limusa. México, D.F. 356 pp.
- Costa, J. J., Margheritis, A. E. y Marsico, O. J. 1974. Introducción a la terapéutica vegetal. Editorial Hemisferio Sur, S. R. L. Buenos Aires, Argentina. 533 pp.
- De Bauer, M. L. 1987. Fitopatología. Editorial Limusa. México, D.F. 383 pp.
- Del Bosque, R. F. H. 2004. Química orgánica. Segunda edición. Mc Graw Hill Interamericana Editores. México, D. F. 236 pp.
- De la Cruz, A. 2002. Química orgánica vivencial. Mc Graw Hill Interamericana Editores. México, D.F. 312 pp.
- De la Garza, G. J. L. 1999. Fitopatología general. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Agronomía. Marín, Nuevo León. 515 pp.
- Dhanvantari, B. N. 1989. Effect of seed extraction methods and seed treatments on control of tomato bacterial canker. Canadian Journal of Plant Pathology No. 11, p. 400-408.

Díaz, F. A. 1993. Enfermedades infecciosas de los cultivos. Editorial Trillas. México, D. F. 288 pp.

Dickinson, C. H. y Lucas, J. A. 1987. Patología vegetal y patógenos de plantas. Editorial Limusa. México, D. F. 312 pp.

Dinghra, D. O., Muchove, J. J. J. y Cruz, F. J. 1980. Tratamiento de semillas: Control de patógenos. Imprens Universitaria. Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, Brasil. 121 pp.

Dinghra, D. O. y Sinclair, B. J. 1995. Second edition. Basic Plant Pathology Methods. Lewis Publishers. EE. UU. 432 pp.

Dorronsoro, C. 2008. Departamento de Edafología y Química Agrícola. Universidad de Granada, España. Unidad docente e investigadora de la Facultad de Ciencias. Lección 2. Constituyentes del suelo. Fase sólida. Libros electrónicos y monografías. <http://edafologia.ugr.es/introeda/tema02/susthum.htm>

Duveiller, E., Fucikovsky, L. and Klaus, R. 1997. The bacterial diseases of wheat. Concepts and methods of disease management. CIMMYT. Montecillo, Edo. de México. 78 pp.

Félix, H. J., Sañudo, T. R. R., Rojo, M. G. E., Martínez, R. R. y Olalde, P. V. 2008.

Importancia de los abonos orgánicos. Ra Ximhai 4:1: 57-67.

Fernández, L. A. 2005. Revista ciencia hoy en línea. La fijación simbiótica de nitrógeno en soja. Departamento de Agronomía. Universidad Nacional del Sur.

Vol. 15. p. 34-39, Núm. 85. Buenos Aires, Argentina.

<http://www.cienciahoy.org.ar/ln/hoy85//soja.htm>

FitzPatrick, E. A. 1985. Suelos, su formación, clasificación y distribución. Compañía

Editorial Continental, S. A. de C. V. México, D. F. 430 pp.

Freeman, S. 2005. El origen y la evolución temprana de la vida. En: Biological

Science. Second edition, Edición para instructores. Pearson Prentice Hall. New

York, EE.UU.

García, A. M. 1971. Patología vegetal agrícola. 1984. Segunda edición. Editorial

Limusa. México, D. F. 254 pp.

García, N. A. 2005. Área de edafología y química agrícola. Facultad de ciencias.

Lección 4. Componentes del suelo. Fase sólida. Componentes orgánicos.

Humificación. <http://www.unex.es/edafo/ECAP/ECAL4FSCOHumificacion.htm>

Gilchrist, S., L., Fuentes, D., G. y Martínez, C. C.1995. Guía practica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. CIMMYT. México, D.F. 64 pp.

Gliessman, S. R. 2002. Agroecología. Procesos ecológicos en agricultura sostenible. Centro Agronómica Tropical de Investigación y Enseñanza. San José, Costa Rica. 38 pp.

Guerrero, A. 1996. El suelo, los abonos y la fertilización de los cultivos. Ediciones Mundi-Prensa. Bilbao, España. 206 pp.

Guirau, E. 2007. Un nuevo mecanismo simbiótico planta-bacteria prometedor para la agronomía. Actualidad científica. Institut de recherche pour le développement. 269:1-8.

Labrador, M. J. 1996. La materia orgánica en los agroecosistemas. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 174 pp.

Lampkin, N. 2001. Agricultura ecológica. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 724 pp.

León, G. M. H. 1987. Enfermedades de cultivos en el estado de Sinaloa. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro de Investigaciones del Pacífico Norte. Confederación de Asociaciones Agrícolas del Estado de Sinaloa. México. 213 pp.

León, G. H. M. y Arosemena, B. M. 1980. El cultivo del tomate para consumo fresco en el valle de Culiacán. SARH-INIA. México. 80 pp.

López, F. M. C. 1994. Los caminos de la fitobacteriología. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Edo. de México. 216 pp.

Manners, J. G. 1986. Introducción a la fitopatología. Editorial Limusa. México, D. F. 295 pp.

Messiaen, C. M., Blancard D., Frouxel F. y Lafon R. 1995. Enfermedades de las hortalizas. Ediciones Mundi-prensa. Madrid, España. 576 pp.

Muñoz, O. A, Mirada, C. S. y Serrato, C. L .M. 1995. Diversidad genética y patología del frijol. Eds. Pérez, M. J., Ferrera, C. R. y García, E. R. Simposio Latinoamericano de Patología del frijol. XXXV Aniversario 1959-1994. Colegio de Postgraduados en ciencias agrícolas. Montecillo, Edo. de México. p. 1-9

Neergaard, P. 1977. Seed Pathology. First Edition. Rev. ed. 1979. The Macmillan Press LTD. New York, EE. UU. 839 pp.

Núñez, B. J. 2009. Micorrizas y nódulos bacterianos.

<http://ilpoteredellasimbiosi.blogspot.com/2008/12/micorrizas-y-nodulos-bacterianos.html>

Odum, E. P. 1971. Ecología. Nueva Editorial Interamericana. México, D.F. 639 pp.

Padrón, C. E. 1996. Diseños experimentales con aplicación a la agricultura y la ganadería. Editorial Trillas. México, D.F. 215 pp.

Pérez, M. G., S. 2006. Caracterización microbiológica de bacterias implicadas en la sanidad y producción vegetal. Universidad de Burgos, España.

http://www.kriptia.com/CIENCIAS_AGRARIAS/FITOPATOLOGIA_AGRICOLA/CONTROL_BIOLOGICO_DE_ENFERMEDADES_DE_LAS_PLANTAS/1

Pimentel, D. 1980. Handbook of energy utilization in agriculture. CRC Press. New York, EE.UU. 475 pp.

Porta J., López-Acevedo M. y Roquero C., 2003. Edafología para la agricultura y el medio ambiente. Tercera edición. Ediciones Mundi-Prensa. México, D. F. 929 pp.

Rodriguez, M. Ma. L. 1991. Manual de identificación de bacterias fitopatógenas. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Parasitología Agrícola. Texcoco, Edo. de México. 91 pp.

Rousselle, P. R. y Crosnier, J. 1999. La patata. Ediciones Mundi-Prensa. Barcelona, España. 601 pp.

Sáenz, P. C. 2008. Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Ciencias Agrarias. Hipertextos del área de la biología. República de Argentina.
<http://www.biologia.edu.ar/ecologia/ECOLOGIA%20DE%20LAS%20COMUNIDADES.htm>

Soil Improvement Committee California Fertilizer Association. Manual de fertilizantes para horticultura. 2004. Editorial Limusa, México, D.F. 297 pp.

Schaad, N. W. 1988. Second edition. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS PRESS The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, EE. UU. 164 pp.

Sosa-Moss, C., Perdomo, R. F., Brathwaite, W. D. C. y Salazar, C. J. J. 1997. Manual de técnicas para el diagnóstico de las enfermedades de las plantas. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. México, D.F. 223 pp.

- Taylor, G. A. and Harman, G. E. 1993. Concepts and technologies of selected seed treatments. *Annual Review of Phytopathology* 28: 331-339.
- Thyr, B. D., Webb, R. E., Jaworski, C. A. and Ratcliffe, T.J. 1973. Tomato bacterial canker: control by seed treatment. *Plant Disease Reporter* No. 57, Florida, EE.UU. p. 974-977.
- Torres, F. y Trápaga, Y. 2000. La agricultura orgánica. *Teorema Ambiental Revista Técnico Ambiental* Publicación de 3W. México, D.F.
http://www.teorema.com.mx/articulos.php?id_sec=47&id_art=2166&id_ejemplar=80
- Van Steekelenburg, N. A. M. 1985. Resistance to *Corynebacterium michiganense* in tomato genotypes. *Euphytica* 34: 245-250.
- Vásquez, S. L. M. 2008. Impacto del tráfico internacional en la sustentabilidad de los agroecosistemas. *Tecnologías sustentables de semillas*. Eds. Ruíz, T. N. A. y Lira, S. R. H. Centro de Capacitación y Desarrollo en Tecnología de Semillas. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México. p. 104-119.
- Walker, J. C. 1973. *Patología vegetal*. Ediciones Omega. Barcelona, España. 818 pp.

Young, J. P. W. 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms.

Stacey, B. Ed. Biological Nitrogen Fixation. Chapman & Hall, New York, U.S.A.

p. 43-86.

Zavaleta, M. E. 1989. Modificadores del suelo y su efecto sobre los fitopatógenos del

suelo. Ecología de la raíz. Ed. Ferrera, C. R. Sociedad Mexicana de

Fitopatología. Colegio de Postgraduados. Texcoco, Edo. de México. p. 116-

128

APÉNDICE

Cuadro A.1. Concentración de ufc/mL viables de *Clavibacter* spp. después de tratarse a diferentes dosis de ácidos fúlvicos durante 30 minutos.

Concentración de inóculo (ufc/mL)	Dosis de ácidos fúlvicos (ppm)				
	0	500	1500	2500	3500
10^{-1}	2093077	311068	179901	133936	88761
10^{-2}	1113694	1061018	170590	126405	84252
10^{-3}	557425	84008	81280	60029	40345
10^{-4}	95496	2096	889	1565	781

Cuadro A.2. Concentración de ufc/mL viables de *Clavibacter* spp. después de tratarse a diferentes dosis de ácidos fúlvicos durante 60 minutos.

Concentración de inóculo (ufc/mL)	Dosis de ácidos fúlvicos (ppm)				
	0	500	1500	2500	3500
10^{-1}	2334800	252024	190205	121652	84005
10^{-2}	1609236	242908	145761	107980	74097
10^{-3}	988594	119672	110848	47865	32533
10^{-4}	282926	7533	1804	1269	2149

Cuadro A.3. Concentración de ufc/mL viables de *Clavibacter* spp. después de tratarse a diferentes dosis de ácidos fúlvicos durante 90 minutos.

Concentración de inóculo (ufc/mL)	Dosis de ácidos fúlvicos (ppm)				
	0	500	1500	2500	3500
10^{-1}	4450865	137436	148597	123633	40417
10^{-2}	2795262	155498	150577	108062	31304
10^{-3}	633229	88564	77050	46808	11414
10^{-4}	107646	4161	1102	1424	460

Cuadro A.5. Concentración de ufc/ml viables de *Rhizobium* spp. después de tratarse a diferentes dosis de ácidos fúlvicos durante 30 minutos.

Concentración de inóculo (ufc/mL)	Dosis de ácidos fúlvicos (ppm)		
	0	500	3500
10^{-1}	1252	640	500
10^{-2}	1044	892	464
10^{-3}	348	552	356

Cuadro A.6. Concentración de ufc/ml viables de *Rhizobium* spp. después de tratarse a diferentes dosis de ácidos fúlvicos durante 90 minutos.

Concentración de inóculo (ufc/mL)	Dosis de ácidos fúlvicos (ppm)		
	0	500	3500
10^{-1}	1424	1076	1012
10^{-2}	632	2548	1068
10^{-3}	464	956	1296

* Para calcular la cantidad de ufc/ml se multiplicó la media de los 5 cuadrantes de la plantilla por el área total de la caja Petri. La cantidad de cm² de la placa se multiplicó por 1 ml entre los 0.25 ml depositados del inóculo procesado.

Cuadro A.6. Promedio de las ufc/ml viables de *Clavibacter* spp. de todos los tiempos a diferentes dosis de ácidos fúlvicos.

Concentración de inóculo (ufc/mL)	Dosis de ácidos fúlvicos (ppm)				
	0	500	1500	2500	3500
10^{-1}	2959580	233509	172901	126407	71061
10^{-2}	1839397	486474	155642	114149	63217
10^{-3}	726416	97414	89726	51567	28097
10^{-4}	16022	4596	1265	1419	1130

Cuadro A.7. Promedio de las ufc/ml viables de *Rhizobium* sp. de todos los tiempos a diferentes dosis de ácidos fúlvicos.

Concentración de inóculo (ufc/mL)	Dosis de ácidos fúlvicos (ppm)		
	0	500	3500
10^{-1}	1338	858	756
10^{-2}	838	1720	761
10^{-3}	580	754	826