



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA**



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTAGÓNICO DE
Bacillus cereus y *Bacillus thuringiensis* SOBRE HONGOS
FITOPATÓGENOS”**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

PRESENTA

MAURO ISRAEL ALMARAZ ROSAS

DIRECTOR DE TESIS

Dra. ESTIBALIZ SANSINENA ROYANO

H. PUEBLA DE Z. A 29 DE FEBRERO DE 2016

DEDICATORIA

A Dios

Por encontrar en Él la fortaleza para concluir esta tesis, por su bondad, amor y salud para lograr mis objetivos.

A mis padres

Por su confianza en mí, sus valores, sus consejos con palabras que siempre llegaron como un sostén para concluir la licenciatura, y sobre todo por su amor.

A mis hermanos

Luis, Francisco, Jesús, Pedro y Minerva, que siempre me han brindado motivación y paciencia y por ayudarme a ser mejor persona.

A mis amigos

Que siempre estuvieron en momentos especiales demostrando un cariño único, por permitirme crecer con ellos profesionalmente y personalmente.

A mis maestros

Por toda su dedicación para compartir conmigo sus conocimientos y experiencia profesional; así como su empeño por tratar de formar mentes brillantes.

A todos aquellos familiares que no mencioné, pero que forman parte de este logro en mi vida.

A todo ustedes, ¡Infinitas gracias!

AGRADECIMIENTOS

A:

Estibaliz, mi directora de tesis; así como al Dr. Aurelio que me dieron la oportunidad de formar parte del laboratorio de investigación, por su experiencia y consejos.

A mis sinodales, lo maestros: María de la Cruz, Carlos y Alejandro por su tiempo y sugerencias que hicieron posible mejorar la redacción de este documento.

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP), por el apoyo económico proporcionado durante esta tesis.

Mauro Israel Almaraz R.

ÍNDICE

1. RESUMEN	5
2. INTRODUCCIÓN	6
3. MARCO TEÓRICO	8
3.1 Control biológico	8
3.2 Utilización de <i>Bacillus</i> spp. en el biocontrol	10
3.3 Metabolitos secundarios con efecto antifúngico	12
3.4 Descripción de los hongos fitopatógenos utilizados en este estudio	16
4. MARCO DE REFERENCIA	19
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
6. JUSTIFICACIÓN	22
7. OBJETIVOS	23
8. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	24
9. METODOLOGÍA Y MATERIALES	25
9.1 Obtención de productos agrícolas o plantas infectadas	25
9.2 Descripción de los síntomas	26

9.3 Aislamiento de hongos fitopatógenos26
9.4 Caracterización morfológica26
9.5 Realización de cultivos duales <i>in vitro</i> para determinar el efecto antifúngico de las cepas de <i>Bacillus</i>28
9.6 Determinar el daño celular por microscopía29
10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN30
10.1 Aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos epífitos, presentes en productos agrícolas y plantas ornamentales30
10.2 Realización de ensayos <i>in vitro</i> mediante antagonismos duales33
10.3 Tabla de resultados derivada de los cultivos duales36
10.4 Interpretación estadística de ensayos <i>in vitro</i> mediante histogramas38
10.5 Determinación del daño celular a partir de los ensayos <i>in vitro</i>43
11 CONCLUSIONES51
12 BIBLIOGRAFÍA52

1. RESUMEN

Esta investigación fue realizada con el fin de conocer la capacidad antagónica de *B. cereus* y *B. thuringiensis* sobre hongos fitopatógenos para considerar el uso de estas especies bacterianas en el control biológico de plagas fúngicas.

Se adoptó la metodología de Gong para los enfrentamientos duales entre las cepas antagónicas y los fitopatógenos, de tal manera que se pudiera medir empíricamente la capacidad de los metabolitos secundarios y enzimas líticas que produce *Bacillus* sp. para frenar el crecimiento de los hongos aislados. Los ensayos *in vitro* se realizaron en placas con agar papa y dextrosa (PDA) con siete días de crecimiento, tiempo necesario para que las bacterias generen y secreten metabolitos.

Las pruebas estadísticas realizadas sirvieron para ubicar la población de cepas bacterianas con mayor eficacia y emplear a ellas para hacer una observación microscópica, mediante tinción, que hiciera visibles los cambios morfológicos que pudieran presentar las células fúngicas al estar en contacto con los agentes antagónicos, observando variaciones en los micelios de los hongos fitopatógenos, concluyendo así que *B. cereus* y *B. thuringiensis* tienen un futuro competente como agentes de biocontrol mediante el uso de la biotecnología y la ciencia, que permita extraer e identificar los metabolitos secundarios que sirvan para revolucionar la agricultura ante los cambios evolutivos de los fitopatógenos fúngicos.

2. INTRODUCCIÓN

La demanda de productos agrícolas ha aumentado considerablemente. Algunas de las causas son: incremento poblacional, industria alimentaria en productos agrícolas, vegetarianos, etc. Pero por otro lado, los cambios climáticos y el incremento de plagas por resistencia de los fitopatógenos a pesticidas químicos, han creado reportes de pérdidas o reducción de cosechas.

Para solucionar, parcialmente, el problema de la demanda de productos agrícolas, es importante solucionar la afección que tienen los patógenos hacia las plantas, de tal modo que se implementen tecnologías que permitan desarrollar fórmulas biológicas y componentes naturales que, al aplicarse sobre los cultivos, no comprometan al ambiente.

Los fitopatógenos son patógenos de plantas que incluyen bacterias, parásitos, hongos, nematodos, fitoplasmas y viroides. Para el control de plagas ocasionadas por los microorganismos mencionados se han usado, de manera tradicional, compuestos químicos (agroquímicos) que pueden generar un desequilibrio biológico, dañando a insectos beneficiosos, al ambiente y, ocasionalmente, la salud del hombre que los aplica.

Una alternativa para los plaguicidas químicos son los pesticidas naturales (biopesticidas), los cuales emplean microorganismos o los compuestos sintetizados por éstos de manera natural. Como ejemplo de ello, se sabe que desde la década de los 80's han sido investigados los hongos biocontroladores como *Trichoderma* sp. Posteriormente se estudiaron depredadores de especies plaga y nemátodos que parasitan insectos, así como el empleo de bacterias como *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* spp., secretoras de metabolitos importantes para el biocontrol de hongos fitopatógenos.

Diferentes especies de *Bacillus* han sido estudiadas para el biocontrol, debido a su ubicuidad y versatilidad como productoras de variedades de metabolitos secundarios, entre ellos compuestos con actividad antibiótica, sideróforos y enzimas; asimismo, sustancias que promuevan el crecimiento

vegetal. Lo anteriormente descrito, hace a *Bacillus* un género prometedor para la aplicación de éste en la agricultura.

En el presente trabajo se estudió el efecto antagónico de diferentes cepas de *Bacillus cereus* y *Bacillus thuringiensis* aisladas de diferentes suelos de la República Mexicana, frente a cinco hongos fitopatógenos aislados de productos agrícolas infectados; así como el posible mecanismo por el cual *Bacillus* frena el crecimiento de los fitopatógenos mediante la observación microscópica del daño celular derivado de los ensayos *in vitro* de cultivos duales.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Control biológico

Las características de un producto agrícola como buen olor, sabor, textura, seguridad alimentaria, etc., hablan de su calidad. Dicha calidad debe cubrir las fases de pre y pos cosecha, por lo que, la búsqueda de microorganismos que tengan un amplio espectro de biocontrol sobre los organismos plaga existentes, es digno de estudio.

Una plaga es definida como cualquier organismo que produce un daño o reduce la disponibilidad y la calidad de un recurso humano¹. El *control biológico* (biocontrol) se define como la represión de plagas mediante enemigos naturales, es decir, mediante la acción de patógenos, parásitos, predadores y competidores. Por su parte, el control biológico se considera natural, cuando se refiere a la acción de los enemigos biológicos sin la intervención del hombre, y se denomina control biológico artificial al que, de alguna manera, es afectado o manipulado por el hombre.

El biocontrol tiene algunas características considerables a mencionar, su acción se ejerce sobre grandes áreas, de acuerdo a las condiciones climáticas y biológicas predominantes; los enemigos biológicos, a diferencia de los pesticidas químicos, no deja residuos tóxicos sobre las plantas ni contamina el ambiente; los enemigos biológicos no producen desequilibrios en el sistema agrícola; las plagas no desarrollan resistencia a sus enemigos biológicos. Sin embargo, los efectos represivos del biocontrol son relativamente lentos a comparación con la acción inmediata de los insecticidas².

A nivel mundial, hay diversos programas de introducción de enemigos naturales para el control biológico de cultivos de invernadero, hortícolas, granos almacenados, plantaciones forestales y frutales; algunos ejemplos son³:

- El uso de la microavispa *Thripobius semiluteus*, un parasitoide de *Heliethrips haemorrhoidalis* (insecto), causal de la plaga de los patlos (aguacates).

- *Cotesia flavipes* (avispa) es un parasitoide aplicado para controlar las plagas de *Diatraea saccharalis* en la caña de azúcar (ver Fig. 1).
- *Phytoseiulus persimilis*, es un ácaro depredador de *Tetranychus urticae* (ácaro rojo o araña de dos manchas), aplicado en cultivos de invernadero (ver Fig. 2)
- Los entomopatógenos *Beauveria* sp., y *Metarhizium* sp., son hongos utilizados para el control de diversas plagas que incluyen orugas, termitas, moscas blancas, etc. (ver Fig. 3)



Fig. 1 Muestra el biocontrol por parasitismo de *Diatraea saccharalis* (oruga taladro) en cultivos de caña por *Cotesia flavipes*, la cual deposita sus huevos sobre la oruga.

Fuente: Revista pesquisa FAPESP⁴.

Fig. 2 Muestra el biocontrol por predación. El ácaro depredador *Phytoseiulus persimilis*, actúa sobre las plagas de ácaros *Tetranychus urticae* (dos manchas).

Fuente: Control biológico orgánico, consultado en línea⁵.

Fig. 3 Biocontrol por el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, una vez que el conidio se adhiere a la cutícula de los insectos, germina y los coloniza; en la foto se ve el desarrollo de micelio sobre un celífero.

Fuente: World Journal of Microbiology and Biotechnology⁶.

En las figs. 4 y 5 se muestra el biocontrol mediado por bacterias y hongos.

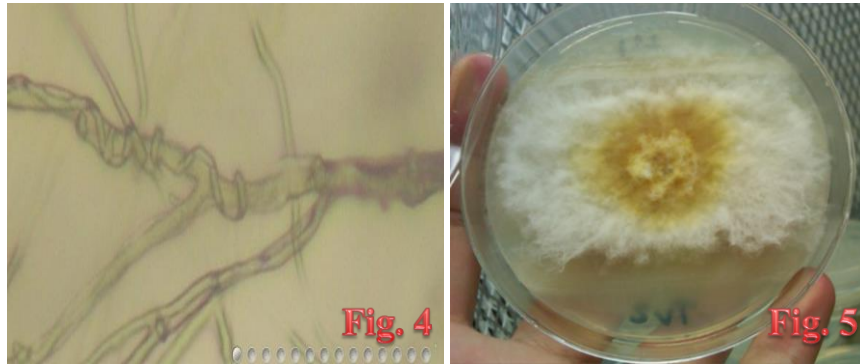


Fig. 4 Se observa el biocontrol (micoparasitismo) mediado por *Trichoderma harzianum* sobre otro hongo.

Fuente: fórmula diseñada por BIO-tri⁷.

Fig. 5 Muestra el biocontrol que ejerce *Bacillus* sp., sobre *Fusarium* sp.

Fuente: Imagen obtenida en el laboratorio de Biotecnología microbiana 105B, de la BUAP.

3.2 Utilización de *Bacillus* spp. en el biocontrol

El género *Bacillus* está definido por bacilos gram positivos, pueden medir 0.5-2.5 por 1.2-10 μm , catalasa positiva, movilidad positiva por flagelos peritricos (algunas especies), esporulados, quimiorganótrofas, aerobias o anaerobias facultativas, son positivos a la reducción de nitratos. Además, el género *Bacillus* se desarrolla en un amplio rango de temperatura, la mayoría de las especies son psicrófilas a termófilas⁸.

Bacillus cereus y *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) tienen como hábitat natural el suelo y han sido estudiados como agentes de control biológico, debido a que por sí solos promueven el crecimiento vegetal por dos mecanismos: 1) Directo: por la producción de hormonas reguladoras de crecimiento vegetal como la citoquinina,

auxinas o las giberelinas⁹ y por la fijación de nitrógeno, acción que permite nitrificar el suelo beneficiando el desarrollo de plantas; II) Indirecto: mecanismo relacionado a la producción de sustancias que actúan como antagonistas de patógenos; o bien, induciendo resistencia en la planta de forma natural.

El potencial de estos microorganismos *Bacillus* spp., para producir antibióticos ha sido reconocido durante 50 años ya que muchas especies de este género sintetizan péptidos antimicrobianos¹⁰. *B. thuringiensis* ha sido, hasta ahora, una de las bacterias de mayor interés de este género y usada para el control biológico por la producción de cristales y otros compuestos antimicrobianos. En su ciclo de vida, las esporas germinan en condiciones de temperatura, humedad y nutrientes, hasta originar células vegetativas que se reproducen por fisión binaria; en contraste, cuando los nutrientes, el oxígeno o las condiciones de reproducción son desfavorables, la bacteria esporula y durante esta etapa se generan los ya mencionados cristales, codificados por plásmidos¹¹, los cuales actúan sobre receptores de algunos parásitos.

En general, *Bt* produce tres tipos de toxinas: las toxinas insecticidas vegetativas (VIP), la δ -endotoxina (las proteínas Cry y Cyt) y la β -exotoxina. Los cristales de *Bt* poseen diferentes formas: bipiramidal, ovoide, redondo, cuadrado, triangular, etc., y éstos contienen compuestos de proteínas denominadas *Cry* y *Cyt*. Como organismo entomopatógeno, *Bt* ha sido utilizado en agricultura y en control de plagas debido a su especificidad contra insectos blanco, útil en los órdenes Lepidóptera, Coleóptera, Díptera, Himenóptera, Homóptera, Ortóptera y ácaros¹². En la actualidad se conocen más de 100 formulaciones en el mercado mundial, aplicándose alrededor de 10,000 toneladas anualmente en el planeta, siendo Dipel la marca de mayor uso.

En la Fig. 6 se observa un cristal de *Bt*. Su modo de acción consiste en tres fases, 1) Activación: Se refiere a un proceso proteolítico de la proteína Cry en el intestino medio de los organismos susceptibles, formando una protoxina de aproximadamente 130 kDa, 2) Unión: Se refiere a la asociación del núcleo de la toxina (protoxina) con proteínas específicas localizadas en las células epiteliales

del intestino medio de los insectos y después la interacción con el receptor a cadherina y 3) Señalización: la unión de la toxina con su receptor desencadena, por un lado, una vía de muerte celular y otra, la formación de oligómeros de toxinas que se asocian a glicosilfosfatidilinositol (GPI) en la membrana, facilitando la formación de poros que promueven la desregulación osmótica y con ello la muerte de las larvas ^{13,14}.

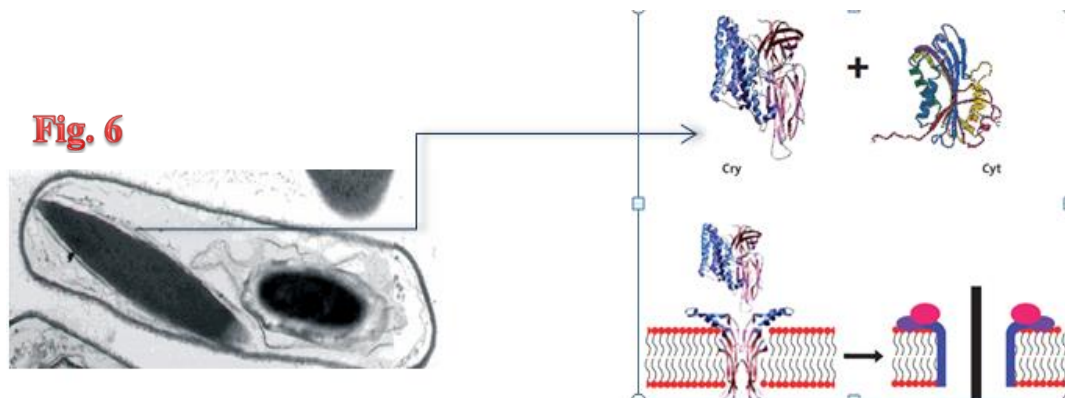


Fig. 6

Morfología de *B. thuringiensis* por microscopía electrónica de transmisión, se nota un cristal proteico romboide al lado de la endospora. Del lado derecho se muestra el afecto de la toxina Cyt1A de *B. thuringiensis* subsp. *israeliensis* que funciona como receptor para la toxina Cry11Aa, provocando un efecto sinérgico.

Fuente: Pérez C, Fernández L y cols. (2005)¹⁵.

3.3 Metabolitos secundarios con efecto antifúngico

La diversidad y variabilidad genética de las especies de *Bacillus*, hace a este género un reconocido productor de metabolitos de diferente estructura química y diversas aplicaciones en el ambiente, la agricultura y la biotecnología industrial¹⁶.

Por definición, los metabolitos primarios son los que se producen durante la fase exponencial de crecimiento, los cuales son imprescindibles para el desarrollo y sobrevivencia del microorganismo; por otro lado, los metabolitos secundarios no

son necesarios para el desarrollo del microorganismo y se producen en la fase estacionaria de crecimiento, siendo específicos para cada especie. Estos metabolitos juegan un rol importante en mecanismos de protección y supervivencia cuando el microorganismo se encuentra en un ambiente hostil.

Bacillus spp., produce una gran variedad de metabolitos secundarios de naturaleza y estructura diferentes, mostrando un amplio espectro de actividad. Estos metabolitos incluyen antibióticos, pigmentos, toxinas, promotores de crecimiento (vegetal y animal), otros compuestos bioactivos, que capacitan a la bacteria para sobrevivir en su ambiente natural¹⁷.

Los péptidos mayormente reportados del género *Bacillus* que presentan actividad antifúngica son: zwittermicina A, micobacilinas, iturinas, bacilomicinas, surfactinas, micosubtilinas, fungistatinas y subporinas. A continuación se citan algunos mecanismos de acción de estos metabolitos sobre hongos:

Las *bacteriocinas* son péptidos que actúan sobre la membrana celular formando poros, perturbando el potencial de membrana y por tanto, conduciendo a la muerte celular¹⁸. La cepa *B. thuringiensis* NEB 17, aislada de la raíz de cultivos de soya, produce bacteriocinas que han exhibido actividad antifúngica¹⁹.

La *zwittermicina A*, es un aminopoliol lineal altamente polar, con actividad antibiótica, aislado tanto de *B. cereus* como de *B. thuringiensis*. Su importancia radica en ser supresor de las enfermedades de plantas causadas por hongos²⁰.

La *fengicina* es un lipopéptido antimicrobiano proveniente de *B. subtilis*, el cual se ha utilizado para el biocontrol, adicionado con surfactinas e iturinas para aumentar el efecto fungicida. La fengicina actúa sobre la membrana celular y también puede inhibir la síntesis de ADN²¹.

La iturina A, micosubtilina y bacilomicina son antibióticos de la familia de las *iturinas* (lipopéptidos cíclicos) producidos por *Bacillus* spp. Las iturinas exhiben una fuerte actividad antifúngica²². Algunos estudios han demostrado que la iturina, por canales iónicos, forma poros los cuales aumentan la conductancia eléctrica de

las membranas lipídicas. También daña la membrana citoplasmática de levaduras, generando fugas de K^+ , paralelo a la muerte celular²³.

En la Fig. 7 se muestran las estructuras químicas de algunos péptidos fungicidas.

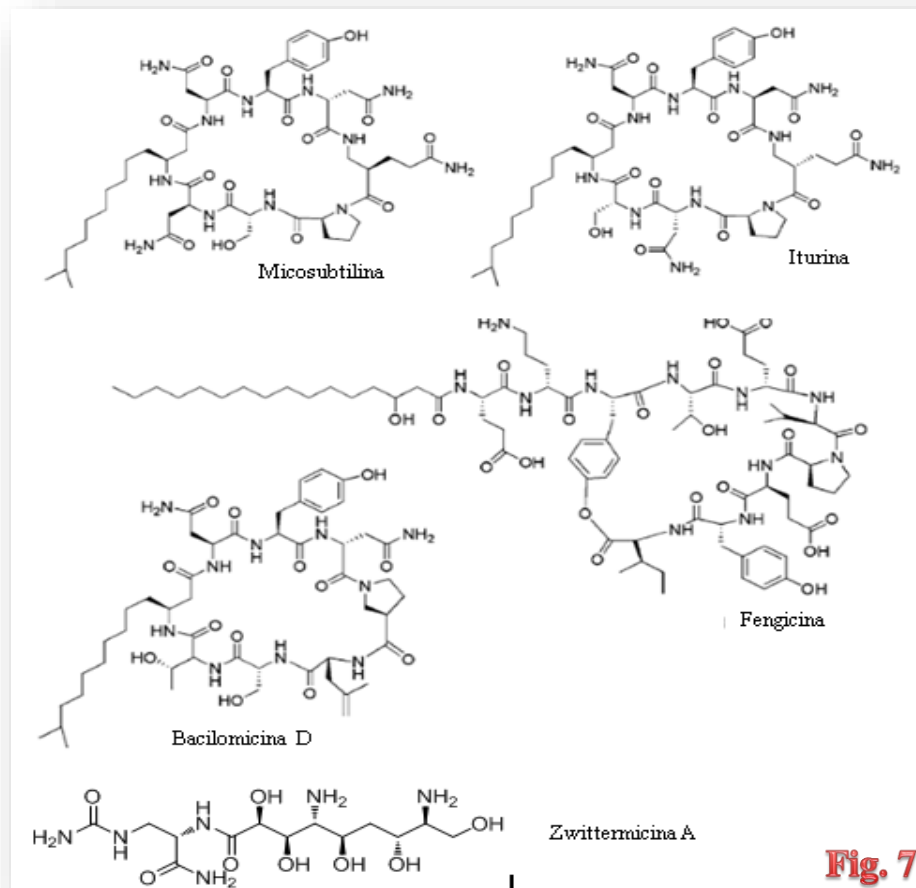


Fig. 7

Estructura química de algunos compuestos antimicrobianos de *Bacillus* spp., aislados del suelo.

Fuente: Sansinenea E y Ortíz A (2011)¹⁰.

Diferentes especies de *Bacillus* son útiles para el biocontrol y por su parte, *B. cereus* y *B. thuringiensis* como enemigos naturales tienen diversos mecanismos

por los cuales pueden disminuir el crecimiento de los hongos fitopatógenos, sobre los cuales se ha estudiado mucho, ya que al ser esporulados, pueden sobrevivir en el suelo y esto complica su erradicación. La producción de metabolitos secundarios, los sideróforos (como la Bacillibactina y petrobactina), que captan hierro y no lo dejan disponible para los hongos que no son capaces de producir cisternas de transporte de hierro comparables; las enzimas líticas como proteasas, hidrolasas, fosfolipasas, glucanasas y quitinasas (enzimas que actúan sobre la quitina, presente en la pared de los hongos), son, solos o en conjunto, los compuestos que actúan sobre los hongos fitopatógenos²⁴, sea por un mecanismo fungicida o fungistático.

La fig. 8 esquematiza el sitio de acción de los metabolitos secundarios con efecto antifúngico y las enzimas líticas de *Bacillus* sobre la célula fúngica.

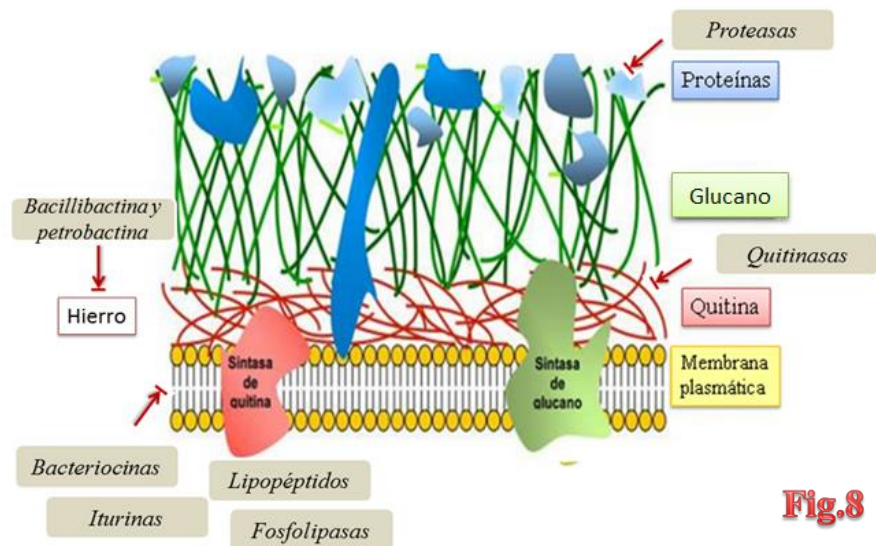


Fig. 8

Sitios de acción de los diferentes péptidos antifúngicos y enzimas líticas de *B. cereus* y *B. thuringiensis* reportadas.

Fuente: imagen modificada de Acosta J, UAP²⁵.

3.4 Descripción de los hongos fitopatógenos utilizados en este estudio

Diferentes especies de hongos constituyen grandes desequilibrios en plantas de cultivos y ornamentales, teniendo la capacidad de destruir cultivos enteros, o bien, reduciendo de forma crónica su rendimiento. Las pérdidas económicas de cultivos por estos fitopatógenos ascienden a varios millones de pesos por año.

Las formas en las que un hongo puede dañar un cultivo son diversas, las esporas pueden alcanzar y dañar tallos, hojas, raíces y productos cosechados. Se conocen tres tipos de hongos fitopatógenos denominados biotróficos, necrotróficos y hemibiotróficos, en relación al tipo de daño que generan, sea directamente a la planta (biotróficos); alterando algún estado pos cosecha (necrotróficos); o bien, teniendo un comportamiento dual (Hemibiotróficos). Lo anterior obliga a tomar medidas de control y la patología vegetal o fitopatología, es la ciencia que se encarga de estudiar las enfermedades de plantas, así como su intervención.

A continuación se describen brevemente algunos hongos de importancia agrícola:

1. *Fusarium* sp., este género se encuentra ampliamente distribuido en el suelo y las plantas. Macroscópicamente se caracteriza por ser colonias de crecimiento rápido, pigmentadas y de aspecto algodonoso. Su reproducción es asexual por conidias, microscópicamente presentan una fiálide fina en forma de botella, sobre las cuales pueden formarse microconidios. Los microconidios son esporas unilaterales, sin septos, hialinos, elipsoidales a cilíndricas; este hongo también puede presentar macroconidias y clamidosporas, en el primer caso, las macroconidias son esporas de pared delgada, largas, en forma de hoz, con varias células y de 3-5 septos transversales; las clamidosporas se forman a partir de la condensación de los contenidos de las hifas y macroconidias, de paredes gruesas, siendo estructuras de resistencia y sobrevivencia²⁶.

El género *Fusarium* es patógeno para diversos cultivos agrícolas, hortícolas y silvícolas, responsable de la fusariosis (marchitez vascular o desecación de la planta), pudriciones radicales, obstrucción de haces vasculares, clorosis foliar

leve, posterior a la defoliación; además, *F. oxysporum* produce una toxina llamada *licomarasmina* cuyo efecto sobre la fisiología de la planta incide fundamentalmente sobre el recambio hídrico. Tanto *F. oxysporum* como *F. equiseti* están relacionados con enfermedades de plantas a nivel raíz²⁷.

2. *Alternaria* sp. es un hongo dematiáceo, tiene como hábitat el suelo, plantas y el aire. Este género posee más de 50 especies descritas; morfológicamente *Alternaria* spp. genera colonias de color verde oscuro, en especial en cultivos jóvenes, de crecimiento radial y bien definido, el micelio aéreo presenta un aspecto polvoso. Microscópicamente se observan hifas septadas y fugilaginosas, la reproducción está mediada por dictioconidios que pueden observarse aislados o en cadena y caracterizados por sus tabicaciones longitudinales, transversales u oblicuas, los dictioconidios tienen una dimensión de 30-50 por 10-14 micras.

La alternariosis es una enfermedad caracterizada por la formación de manchas pequeñas y de color púrpura en las hojas al inicio de la enfermedad, luego las manchas se unen formándose grandes áreas necróticas. Tanto las hojas como el tallo de la planta pueden afectarse, originando un ahorcamiento, deshidratando los tejidos afectados e induciéndolos a la muerte, además *Alternaria* spp. puede producir toxinas que se difunden a los tejidos afectados. Las plantaciones de tomate y papa son afectados por éste género²⁸.

3. *Bipolaris* spp., género de hongos dematiáceos con más de 60 especies descritas, tienen como hábitat el suelo y los detritus vegetales. Producen colonias de color gris oliváceo a negro, el micelio aéreo presenta un aspecto algodonoso, crecimiento radial y rápido. Estos hongos se reproducen asexualmente por conidióforos simples o ramificados, sobre los que se generan conidios, los cuales son grandes, ovales o elípticos, redondeados en los extremos, de color café, la mayoría presenta de 3-5 tabiques. Las hifas son septadas y fugilaginosas.

Diferentes especies de *Bipolaris* están relacionadas con enfermedades foliares en algunas plantas ornamentales, también produce enfermedad en cultivos de arroz, caña de azúcar, trigo y maíz²⁹.



Fig.9: Se nota una considerable marchitez sobre un cultivo de *Solanum lycopersicum* (tomate) causada por *Fusarium* sp.

Fuente: González P (2006)³⁰.

Fig.10: En esta imagen se ve una zona necrótica en la hoja, rodeada por manchas cafés, propias de una alternariosis en un cultivo de *Solanum tuberosum* (papa).

Fuente: Aria S, Ávila H y cols. (2012)³¹.

Fig.11: Se presenta una infección por *Bipolaris victoriae* que originó un tizón foliar en un cultivo de *Avena sativa*.

Fuente: García E, Leyva G y cols. (2013)³².

4 MARCO DE REFERENCIA

Ariza y Sánchez, en el 2012, describieron que el uso de agentes de control biológico es una alternativa eficaz para el tratamiento de las plantas, contribuyendo a la disminución del uso de pesticidas químicos y por tanto a la reducción de la resistencia de los microorganismos fitopatógenos. Además proponen que algunas especies del género *Bacillus* son agentes de biocontrol por la amplia producción de antibióticos primarios y secundarios que son supresores de algunos fitopatógenos, incluyendo a *Fusarium* spp., *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia* spp., *Sclerotinia* spp., *Septoria* spp., y *Verticillium* spp.³³.

En otro estudio, Mojica y colaboradores en 2009, determinaron la capacidad antagonica de 64 cepas de *B. thuringiensis* sobre *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici* y *F. oxysporum*, mediante cultivos duales comprobando la existencia de 2 cepas que redujeron, aproximadamente, el 50% de crecimiento de los fitopatógenos analizados³⁴. Este resultado sugiere a *Bacillus* spp., como buen agente de biocontrol por metabolitos con efecto fungicida o fungistático, incluyendo a la zwittermicina A, fungicina, micobacilina, surfactina, entre otros^{10,35,36}.

Para comprobar que un agente de biocontrol produce compuestos antimicrobianos útiles en fitopatógenos, pueden hacerse cultivos duales *in vitro*, como un test primario, para después hacer pruebas secundarias de las cepas productoras de dichos compuestos haciendo uso de los componentes purificados, como el ensayo en placa de agar y el ensayo de difusión en agar, propuestos por Yong y colaboradores en el 2012, para aislar e identificar compuestos antifúngicos de la cepa C9 de *B. subtilis*³⁷.

La metodología para los antagonismos de cultivos *in vitro*, descrita por Gong, Wang y colaboradores en el 2006, consiste en colocar un inóculo de los hongos fitopatógenos en el centro de una placa Petri que contenga medio PDA, luego, en el borde de la placa, a 3 cm de distancia del centro, se coloca la bacteria. Si el hongo es de crecimiento lento, éste se inoculara sobre el centro de la

placa 24-48h antes de poner el inóculo bacteriano. Finalmente, las placas son incubadas a 28°C de 3-5 días. La inhibición del crecimiento fúngico se evalúa por el porcentaje de reducción del desarrollo micelial, comparado con placas control, sin el inóculo de la bacteria³⁸.

La interacción entre antagonista y patógeno (mecanismo de biocontrol) se puede deducir al hacer una observación microscópica. Kloepper y colaboradores en el año 2004, proponen los mecanismos de acción de *Bacillus* spp. frente a fitopatógenos, los cuales son: antibiosis, competencia por nutrientes, sitios de exclusión e infección, parasitismo y/o inducción de resistencia³⁹. Por su parte, Basha y Ulaganathan en el año 2002, dedujeron, bajo microscopio de luz, la interacción entre *Bacillus* sp. y hongos como *Curvularia lunata*, encontrando que la cepa de biocontrol provocó deformación de hifas, condensación, deformación y ocurrencia de malformaciones extensivas y daños al micelio⁴⁰. Asimismo, Quiroz y colaboradores en el año 2008 concluyen que la interacción patógeno-antagonista depende de las herramientas que posea la cepa antagónica para inhibir al patógeno, advirtiendo deformación, lisis y enrollamiento de conidios; alargamiento, estrangulación y fragmentación de micelio o deformación de fiálides fueron algunos de los eventos reportados en su estudio⁴¹.

5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

México cuenta con condiciones climáticas favorables que permiten la diversidad de productos agrícolas, no obstante, la inversión en la investigación para la calidad de dichos productos sobre su fase de desarrollo es deficiente. Por otro lado, existe una amplia biodiversidad microbiana en nuestro país y por lo tanto, un valioso potencial que puedan contener algunas cepas que coexistan junto a los cultivos. *Bacillus cereus* y *Bacillus thuringiensis* son bacterias del suelo las cuales producen diferentes compuestos antimicrobianos. La investigación de este género bacteriano, con actividad antifúngica, contribuye al conocimiento sobre la variedad de bacterias como controladores biológicos.

Por lo que se plantea la siguiente pregunta científica:

¿Qué cepas de *B. cereus* y *B. thuringiensis* podrán probarse *in vitro* e identificarse como productoras de metabolitos secundarios que inhiban el crecimiento de fitopatógenos de los géneros *Alternaria*, *Bipolaris* y *Fusarium*?

6 JUSTIFICACIÓN

Actualmente, la resistencia microbiana de cepas patógenas para el hombre y las plantas es un problema grave. Diferentes grupos de investigación de otros países y México, han buscado microorganismos que posean la capacidad de controlar las plagas de cultivos agrícolas de importancia económica. La incrementada pérdida de cultivos agrícolas y hortícolas por fitopatógenos puede ser controlada, parcialmente, con pesticidas naturales que además de disminuir la pérdida económica, contribuyan a la seguridad sanitaria, sean amigables con el ambiente y reduzcan la ya mencionada resistencia microbiana.

En este proyecto se buscó *in vitro*, mediante cultivos duales, cepas de *Bacillus cereus* y *Bacillus thuringiensis* capaces de inhibir en más de un cincuenta por ciento el crecimiento de hongos fitopatógenos comunes, de los géneros *Alternaria*, *Bipolaris* y *Fusarium*.

7 OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el efecto antagónico de 71 cepas de una colección de *Bacillus cereus* y *Bacillus thuringiensis* (aisladas del suelo) sobre hongos fitopatógenos.

Objetivos particulares

1. Aislar e identificar hongos epífitos presentes en productos agrícolas infectados.
2. Buscar, mediante histogramas, las cepas comunes que antagonizan en mayor porcentaje a los hongos fitopatógenos aislados.
3. Analizar microscópicamente el mecanismo antagónico de *B. cereus* y *B. thuringiensis* mediante tinción para hongos.

8 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Tipo de estudio:

Observacional, descriptivo, transversal y prospectivo.

Universo de estudio:

Cepas de *B. cereus* y *B. thuringiensis* aislados del suelo de diferentes regiones de la República Mexicana.

Tamaño de muestra:

71 cepas.

Criterios de selección de muestra:

- *Criterios de Inclusión.-*

Las cepas purificadas con características macroscópicas y microscópicas que correspondan a *B. cereus* y *B. thuringiensis*.

Hongos fitopatógenos epífitos aislados de productos agrícola que presenten crecimiento radial y que se desarrollen en una sola colonia.

- *Criterios de Exclusión.-*

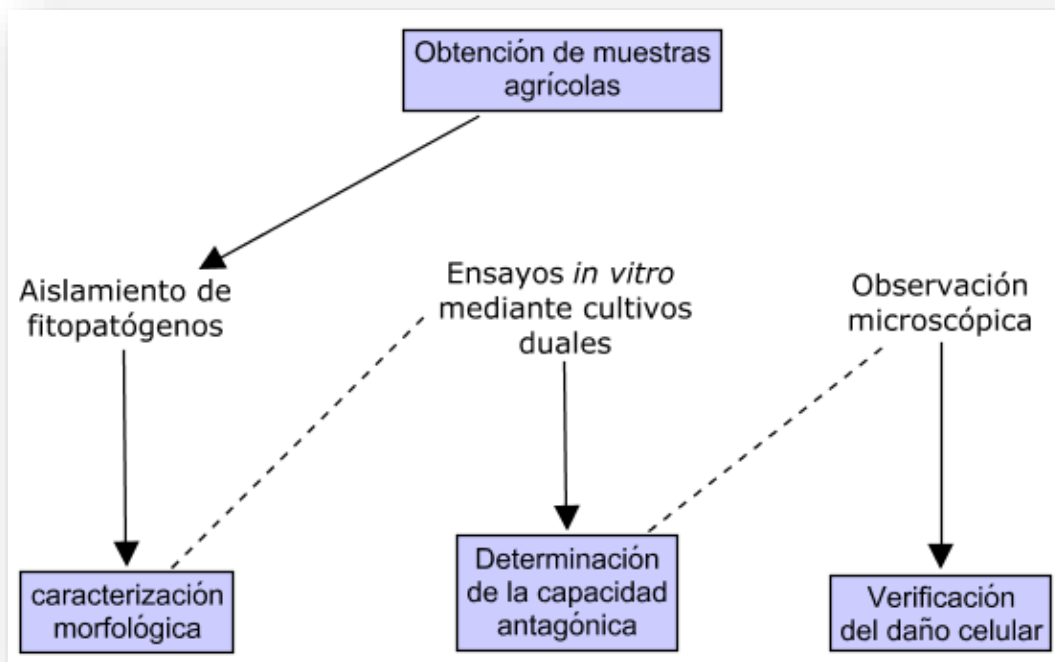
Aquellas cepas que no tengan características morfológicas de *Bacillus*, que sean de procedencia distinta a los suelos de la República Mexicana o que estén contaminadas.

Hongos fitopatógenos que sean de crecimiento lento.

9 METODOLOGÍA Y MATERIALES

El diagrama 1 que se muestra a continuación, simplifica los pasos a realizar en este proyecto.

Diagrama 1: Diagrama general de trabajo



Fuente: Diseño del estudio

9.1 Obtención de productos agrícolas o plantas infectadas

Se tomó muestra de *Euphorbia pulcherrima* (hojas de la flor de nochebuena), *Cucumis melo* (melón) y *Allium cepa* (cebolla morada) infectadas. Primero se observan las zonas infectadas, las hortalizas y los frutos pueden presentar manchas, pudriciones o deformidades, mientras las hojas de plantas pueden exhibir marchitez, áreas amarillentas o de aspecto quemado, etc.

9.2 Descripción de los síntomas

Euphorbia pulcherrima presentó crecimiento micelial color blanco, marchitez en tallo y zonas pálidas; de las tres zonas se procederá a tomar la muestra.

Cucumis melo contenía manchas color beige y deformidad; en cambio, *Allium cepa* presentó zonas necróticas oscuras, consideradas para el aislamiento.

9.3 Aislamiento de hongos fitopatógenos

El aislamiento es directo a partir del signo; es decir, se troza con ayuda de una navaja estéril la zona afectada y se depositan cinco fragmentos de tejido vegetal sobre cajas Petri que contengan medio de cultivo PDA⁴², esto se repite en cada signo de afección que presente el tejido, todo el proceso se realiza en campana de flujo laminar. Posteriormente, las placas se incuban a temperatura ambiente por cuatro días y finalmente se resiembran por separado en nuevas placas, con medio PDA, los crecimientos miceliales encontrados con el objetivo de purificar cada hongo. La incubación de las placas es nuevamente a temperatura ambiente.

9.4 Caracterización morfológica

Se deben revisar las características macroscópicas y microscópicas de los hongos aislados para su identificación. En el primer caso, se observan las características de los hongos desarrollados en medio PDA como son el color, borde, apariencia y el tipo de micelio; mientras para el segundo caso, se recurre a la técnica de microcultivo. El microcultivo tendrá como fin conocer las principales características taxonómicas de los microorganismos aislados en los diferentes tejidos.

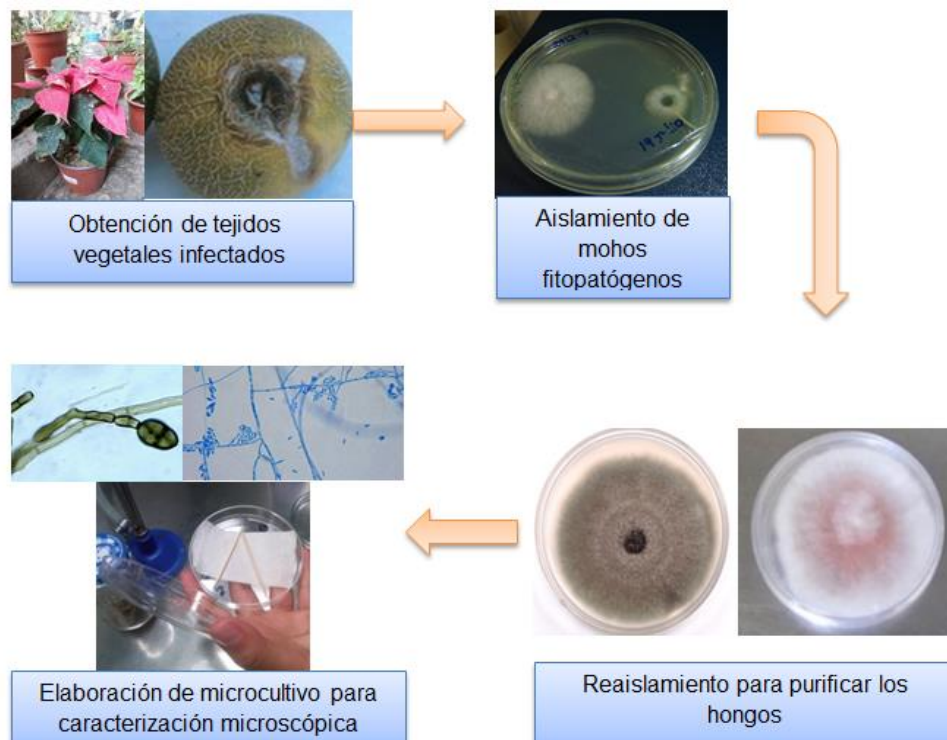
La identificación microscópica se realizó por la técnica de Ridell modificada. La técnica de Ridell consiste en colocar dentro de una caja Petri una varilla de vidrio en forma de "V" y sobre ella un portaobjetos estéril que soportará discos de medio PDA de 10 mm de diámetro por 20 mm de espesor. En este proyecto se sustituyó la varilla de vidrio por palillos estériles, y los discos de agar por cuadros de agar de 1 cm²; a continuación se procede como lo indica la técnica⁴⁰: Se tomó

con asa estéril un inóculo del moho y se inoculó por picadura cada uno de los lados del cuadro de agar, encima se colocó un cubreobjetos presionando un poco para facilitar la adherencia; enseguida, se agregaron 5 mL de glicerol al 10% y se sellan las placas con parafilm. Las placas son incubadas a 25°C hasta observar crecimiento.

Se desprendió con cuidado el cubreobjetos del cuadro de agar, luego de observó el desarrollo del micelio, se colocó sobre un portaobjetos limpio que contenía una gota de azul de lactofenol, se selló la preparación y se hizo la observación a microscopio óptico en 10X y 40X. Las características consideradas para la identificación de los mohos fue: características de las hifas (color, septos, tamaño), y sistema de reproducción sexual o asexual.

El diagrama 2 muestra el procedimiento desde la obtención de los mohos hasta su caracterización por microcultivo.

Diagrama 2: Diagrama del procedimiento para la caracterización de fitopatógenos



Fuente: Diseño del estudio

9.5 Realización de cultivos duales *in vitro* para determinar el efecto antifúngico de las cepas de *Bacillus*

Los enfrentamientos de cultivos duales se realizaron tomando como referencia la metodología de Gong, para lo cual se sembró en medio PDA los hongos de los géneros *Alternaria*, *Bipolaris* y *Fusarium* por 7 días. Por otra parte, se sembraron en agar Luria Bertani (LB) las muestras de *Bacillus* un día antes de realizar los enfrentamientos duales.

El cultivo dual se logró haciendo la siembra de cada hongo en el centro de una placa Petri que contenía medio PDA, la inoculación se realizó por picadura con asa micológica. Enseguida, con asa bacteriológica a 2.7 cm de distancia del centro de la placa, se sembró longitudinalmente una cepa de *Bacillus* (ver Fig. 12). Este ensayo *in vitro* permitió analizar dos cepas de las 71 de estudio por placa. Para terminar, las placas fueron selladas e incubadas por una semana a 28°C. Esto se hizo con el objetivo de darle el tiempo y la temperatura óptima a las cepas bacterianas para crecer y secretar los metabolitos o enzimas que sintetizan.

Después del tiempo de incubación, las placas fueron interpretadas, comparándolas con una placa control (sin inóculo bacteriano). La lectura del porcentaje de inhibición se determinó por la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhib.} = \frac{DC - DP}{DC} \times 100$$

Siendo:

*DC: El diámetro en mm del crecimiento del hongo control.

*DP: El diámetro en mm del crecimiento del hongo problema (Esto se consigue multiplicando por dos el radio del hongo previamente medido).

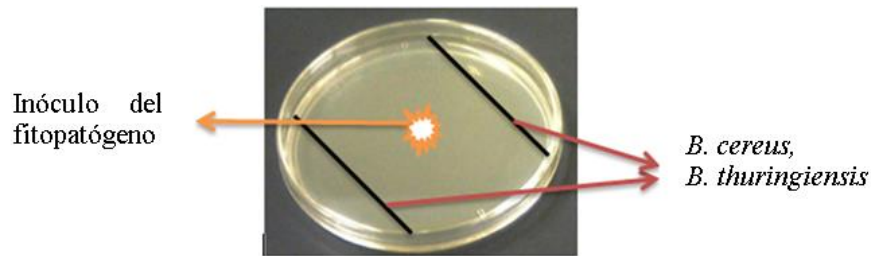


Fig. 12

Enfrentamiento de cultivos duales para determinar el efecto antagónico de las cepas de *B. cereus* y *B. thuringiensis*.

Fuente: Resultados del laboratorio.

9.6 Determinar el daño celular por microscopía

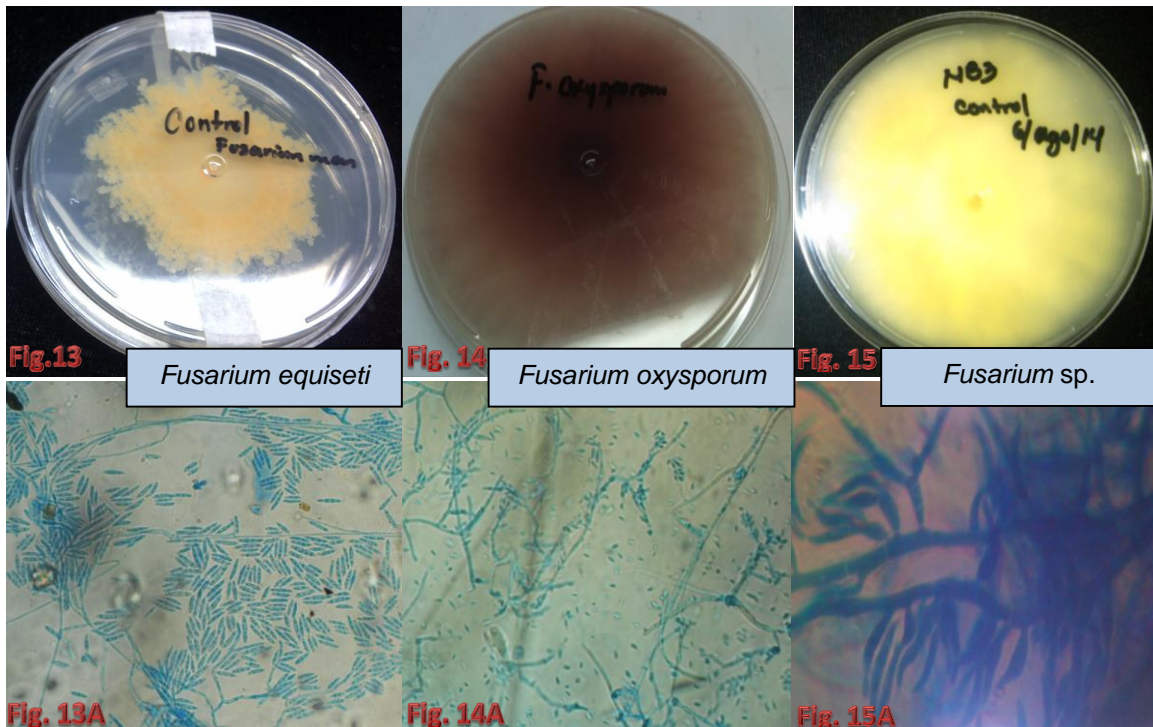
El daño celular generado por *Bacillus* se determinó por microscopía, para lo cual se seleccionaron los antagonismos *in vitro* con mayor porcentaje de inhibición. La técnica de la cinta adhesiva³⁵ se usó para la toma de muestra: se cortó un fragmento de cinta de 1.5 cm² y se colocó sobre el micelio dañado, sin presionar demasiado; se levantó la cinta y se montó sobre un portaobjetos limpio que contenga aproximadamente 10µL de azul de lactofenol; la preparación se dejó reposar por diez minutos para que los componentes del colorante actuaran, luego se observó a 40X en microscopio óptico. Al mismo tiempo, con otro fragmento de cinta se tomó una muestra de las placas control (hongos con 7 días de crecimiento) y de la misma forma se tiñeron con azul de lactofenol para representar el control. De esta manera se comparó el micelio expuesto a los *Bacillus* y el micelio que no lo estaba. Esto se repitió con cada hongo, interpretando el resultado con lo reportado en la literatura.

10 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.1 Aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos epífitos, presentes en productos agrícolas y plantas ornamentales.

A partir de *Euphorbia pulcherrima*, *Cucumis melo* y *Allium cepa* se lograron identificar los siguientes fitopatógenos, por sus características tanto macroscópicas como microscópicas:

Imágenes obtenidas en el laboratorio de biotecnología 105B de la BUAP



Fusarium equiseti (Aislado de *Cucumis melo*)

Morfología macroscópica: colonia color anaranjado, de aspecto aterciopelado, con bordes irregulares y crecimiento rápido a temperatura ambiente. Ver fig. 13.

Morfología microscópica: Hifas hialinas, macrosifonadas, septadas; reproducción asexual por células conidiógenas, se observan macroconidias fusiformes con terminación basal aplanada y conteniendo usualmente tres pseudoseptos. Ver fig. 13A, observación con microscopio óptico a 40X.

Fusarium oxysporum (Aislado de *Allium cepa*)

Morfología macroscópica: Colonias color púrpura (cultivo de 7 días), de aspecto algodonoso y blanco en la periferia, de crecimiento radial y rápido a temperatura ambiente (Fig. 14).

Morfología microscópica: Presenta hifas hialinas y septadas, se observan abundantes microconidios y escasas células conidiógenas. Los microconidios son pequeños y presentan una forma oval. (Ver fig. 14A) observación con microscopio óptico a 40X.

Fusarium sp. (Aislado de *Euphorbia pulcherrima*)

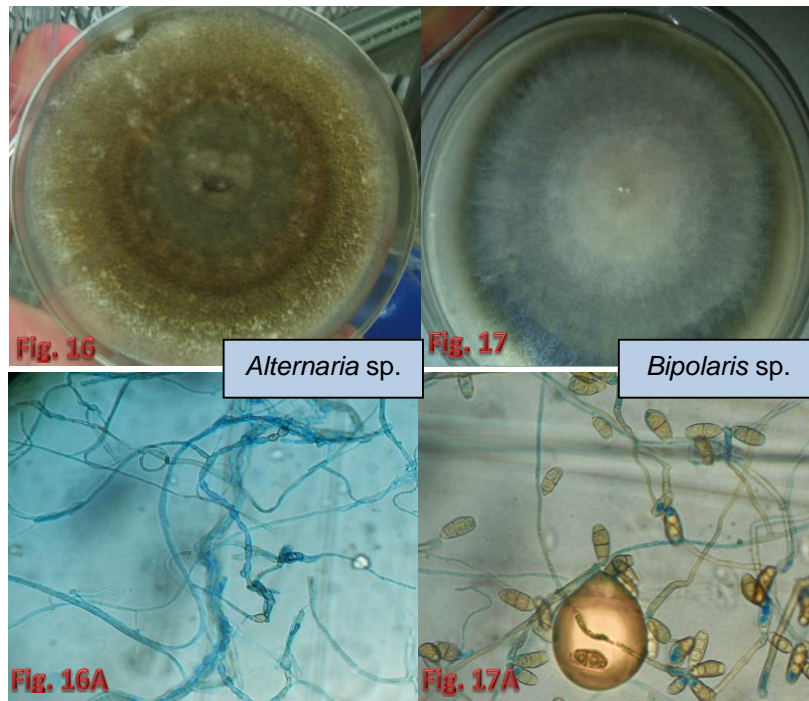
Morfología macroscópica:

Colonias color beige que con el tiempo se torna a amarillo con el centro café, de aspecto algodonoso y crecimiento radial y rápido a temperatura ambiente. El micelio vegetativo presenta un color amarillo. (Ver fig. 15).

Morfología microscópica:

Presenta hifas hialinas, septadas y macrosifonadas, se observan células conidiógenas de tipo monofiálide. Las macroconidias son alargadas de pared delgada y presentan de 3-5 pseudoseptos, las terminaciones apicales de las esporas presentan forma de ganchos. (Ver fig. 15A), observación con microscopio óptico a 100X.

Fuente: Resultados del laboratorio



***Alternaria* sp.** (Aislado de *Euphorbia pulcherrima*)

Morfología macroscópica:

Colonias color negro oliváceo, con micelio joven periférico de color blanco, tiene aspecto aterciopelado, crecimiento radial y lento a temperatura ambiente. (Ver fig. 16).

Morfología microscópica:

Hifas fugiliginosas, septadas y macrosifonadas. La reproducción es asexual por dictioconidios; las dictiosporas tienen un aspecto obpiriforme, con terminación cónica en la punta y septadas transversal y longitudinalmente, generalmente forman cadenas. (Ver fig. 16A), observación con microscopio óptico a 40X.

***Bipolaris* sp.** (Aislado de *Euphorbia pulcherrima*)

Morfología macroscópica:

Colonias color negro oliváceo en la periferia y al fondo, mientras en el centro presenta un crecimiento color blanco y de aspecto algodonoso, es un hongo de crecimiento radial y rápido a temperatura ambiente. (Ver fig. 17).

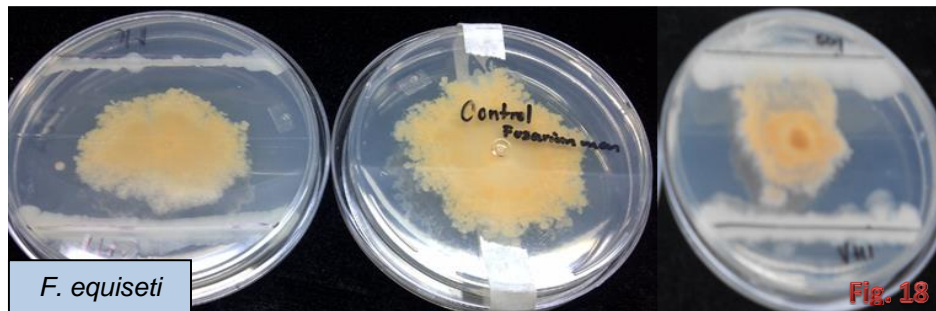
Morfología microscópica:

Hifas fugilaginosas, septadas y macrosifonadas. La reproducción es asexual por conidióforos simples geniculados, las conidiosporas son grandes, elipsoidales y rectas, con cuatro células y tres pseudoseptos. (Ver fig. 17A), observación con microscopio óptico a 40X.

Fuente: Resultados del laboratorio.

10.2 Realización de ensayos *in vitro* mediante antagonismos duales

Los ensayos *in vitro* son pruebas primarias para determinar qué cepas de *B. cereus* y *B. thuringiensis* tienen la capacidad de sintetizar metabolitos que exhiban un poder antagonico sobre hongos fitopatógenos. Los mecanismos por los cuales son controlados los fitopatógenos son: Competencia de espacio y nutrientes, antibiosis por metabolitos antifúngicos y producción de enzimas líticas. Las siguientes figuras muestran algunos ensayos mediante cultivos duales.



Fuente: Resultados del laboratorio.

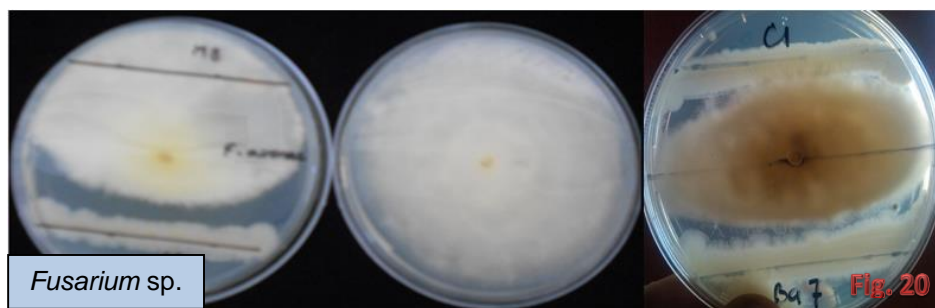
En la fig. 18 se muestran algunos ensayos *in vitro* para *Fusarium equiseti*. En el centro se colocó al hongo control y a sus lados los cultivos duales; se nota que las cepas del lado izquierdo antagonizan más a este fitopatógeno en comparación con

las del lado derecho según la placa control, a ello súmese que los inóculos de *Bacillus* que están en la placa de la izquierda son más delgados.



Fuente: Resultados del laboratorio.

En la fig. 19 se observan los ensayos *in vitro* para *F. oxysporum*, en el centro se colocó la placa control y a sus lados los cultivos duales; del lado derecho podemos ver dos cepas de *Bacillus* que antagonizan a este fitopatógeno; en contraste, del lado izquierdo de la placa control hay dos *Bacillus* que no presentan efecto antagónico, y el hongo se desarrolla sobre las cepas bacterianas.



Fuente: Resultados del laboratorio.

En la fig. 20 se exhiben algunos ensayos *in vitro* para *Fusarium* sp. En el centro se coloca la placa control, del lado derecho de ésta se observan dos cepas de *Bacillus* capaces de antagonizar al fitopatógeno. Se observó a lo largo de este

experimento que las cepas que más antagonizan a *Fusarium* sp., son capaces de intensificar el pigmento del hongo, además muestran filamentos alrededor. Por otro lado, al lado izquierdo de la placa control se observa una cepa que no antagoniza al hongo y otra que lo hace considerablemente respecto al hongo control.



Fuente: Resultados del laboratorio.

En la fig. 21 se presentan algunos antagonismos *in vitro* para *Alternaria* sp., este fitopatógeno presentó mayor resistencia contra la colección de cepas de *Bacillus* en este trabajo. Sin embargo, como se muestra en el cultivo dual de la derecha, estas cepas inhiben considerablemente el crecimiento de *Alternaria* sp. respecto al control, y es medianamente antagonizado por las dos cepas en el ensayo dual del lado izquierdo de la placa control.



Fuente: Resultados del laboratorio.

La fig. 22 se muestran algunos ensayos *in vitro* para *Bipolaris* sp. Este fitopatógeno es de crecimiento rápido, por lo que la observación de su inhibición es más clara en contraste con la de *Alternaria* sp. Al lado derecho de la placa control se muestra una cepa que antagoniza potentemente al fitopatógeno; sin embargo, esta cepa no crece de manera uniforme, por lo que fue difícil estandarizar la asada para que el crecimiento bacteriano quedara en forma lineal. Por su parte, del lado izquierdo de la placa control se observan dos cepas de *Bacillus* que antagonizan medianamente a *Bipolaris* sp.

10.3 Tabla de resultados derivada de los cultivos duales

La siguiente tabla muestra las 71 cepas de la colección, utilizadas para la determinación del efecto antagónico *in vitro* mediante el porcentaje de inhibición, calculado con la fórmula explicada en el apartado 8.5 para los hongos fitopatógenos usados en este estudio.

Tabla 1: Porcentajes de inhibición de *B. cereus* y *B. thuringiensis* sobre hongos fitopatógenos

CEPA	FITOPATÓGENOS				
	<i>Fusarium equiseti</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Bipolaris</i> sp.
Eli 1	28.0	1.3	50.0	38.5	17.8
Eli 2	24.0	6.3	-*	25.0	53.3
Eli 3	20.0	8.9	55.0	-	6.7
Eli 4	27.7	19.0	59.5	33.3	55.6
Eli 5	28.6	39.2	47.0	20.8	44.4
Eli 6	38.2	44.3	50.0	25.0	46.7
Eli 7	28.0	41.8	44.0	29.2	44.4
Eli 8	20.0	39.2	-	25.0	51.1
Eli 9	26.9	39.2	52.4	33.3	46.7
Eli 10	28.0	41.8	-	-	6.7
Eli 11	23.1	13.0	-	2.6	6.7
Eli 12	24.0	18.8	45.2	34.6	51.1
Eli 13	5.0	42.4	55.0	23.0	54.1
Eli 14	20.0	35.6	48.0	16.7	40.5
Eli 15	52.5	6.7	43.6	16.7	46.7

Eli 16	7.7	53.3	48.0	12.8	48.9
Eli 17	46.2	22.0	48.0	17.9	6.7
Eli 18	26.9	15.3	51.3	43.6	6.7
Eli 19	36.0	45.2	52.4	41.1	48.9
Eli 20	37.9	42.5	50.0	37.25	44.4
Eli 21	45.8	35.6	43.2	12.82	48.9
Eli 22	23.1	32.2	-	28.2	46.7
Eli 23	23.1	3.4	-	2.6	6.7
Eli 24	41.8	3.4	-	12.82	6.7
Eli 25	38.5	60.9	46.0	33.3	41.2
Eli 26	45.5	3.4	60.5	38.5	1.2
Eli 27	-	8.0	27.5	18.0	18.9
Eli 28	35.6	3.4	-	38.5	40.5
Eli 29	19.2	26.5	43.2	38.5	40.5
Eli 30	24.0	30.6	-	20.0	43.6
Eli 31	49.2	38.8	30.4	18.0	38.5
Eli 32	38.2	26.5	33.3	36.8	35.9
Eli 33	11.5	11.9	-	5.3	26.8
Eli 34	14.3	50.0	39.5	30.4	43.6
Eli 35	24.1	-	46.3	13.6	1.2
Eli 36	34.6	47.6	55.3	27.7	45.9
Eli 37	-	45.2	42.1	15.0	43.5
Eli 38	10.0	23.8	44.7	26.8	1.2
Eli 39	20.7	42.9	47.5	34.6	41.2
Eli 40	20.7	45.0	43.2	42.3	36.8
Eli 41	17.2	-	46.3	30.8	36.8
Eli 42	27.7	-	-	30.4	-
Eli 43	20.7	-	45	34.6	39.5
Eli 44	11.5	42.9	53.0	36.3	43.5
Eli 45	10.3	45.2	43.2	26.9	45.9
Eli 46	27.6	42.5	42.1	38.1	33.3
Eli 47	34.5	47.0	48.0	21.7	10.9
Eli 48	20.7	46.7	-	27.3	23.3
Eli 49	35.6	42.9	40.8	40.6	10.9
Eli 50	31.0	38.7	45.7	38.4	-
Eli 51	46.2	44.0	60.0	38.10	44.7
Eli 52	45.8	41.3	48.8	15.8	54.3
Eli 53	20.7	47.5	36.0	20.0	41.5
Eli 54	20.7	-	43.2	22.7	56.5
Eli 55	51.7	-	-	21.7	-
Eli 56	40.4	-	41.5	15.8	-
Eli 57	14.9	45.2	48.8	34.38	48.6
Eli 58	20.0	52.4	45.7	34.4	54.1

Eli 59	12.5	33.3	44.0	26.3	58.7
Eli 60	26.9	33.3	48.1	46.4	48.6
Eli 61	25.0	54.2	45.2	50.0	47.4
Eli 62	34.5	67.2	-	23.8	48.6
Eli 63	31.9	44.0	42.1	26.8	31.3
Eli 64	33.3	44.0	57.1	11.7	56.5
Eli 65	32.0	46.7	45.7	32.1	37.5
Eli 66	28.6	44.0	36.0	4.6	58.7
Eli 67	9.5	33.3	-	9.1	56.5
Eli 68	20.8	-	-	28.6	35.9
Eli 69	33.3	42.5	47.7	34.6	44.7
Eli 70	8.3	-	43.6	26.9	-
Eli 149	43.0	56.5	67.0	59.0	56.3

*El guion en la tabla indica que la cepa bacteriana para ese fitopatógeno no refiere un efecto antagónico, comparado con crecimiento de un hongo control.

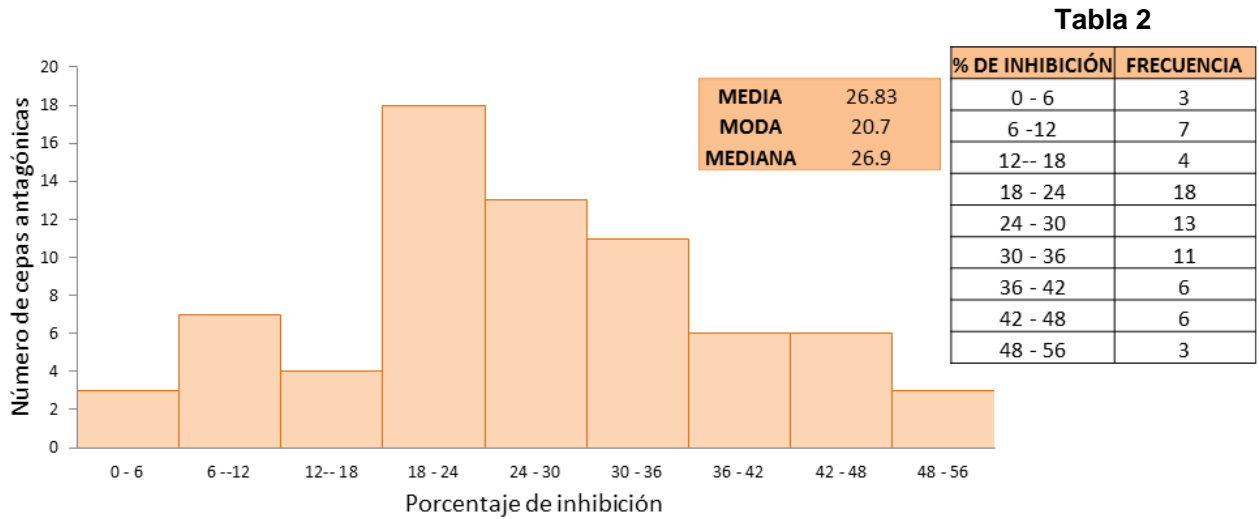
Fuente: Resultados del laboratorio.

10.4 Interpretación estadística de los ensayos *in vitro* mediante histogramas

A continuación se mostrarán los histogramas para cada uno de los fitopatógenos, con el fin de explicar el número de cepas que tienen un antagonismo bueno frente a estos hongos.

Es probable que, si las cepas de *Bacillus* inhiben en más de un cincuenta por ciento el crecimiento de los hongos, comparado con un control, sea por mecanismos como la antibiosis, mediada por los metabolitos secundarios que secreta la bacteria y por la capacidad de producir enzimas líticas y en menor medida por competencia de nutrientes y espacio.

Gráfico 1: Histograma de los cultivos duales de *F. equiseti*



Fuente: Representación gráfica de la tabla 1

En el gráfico 1 se puede ver que hay sólo tres cepas que entran dentro de la categoría de inhibición del 48 al 56%. La media aritmética de inhibición de los antagonistas es 26.83%, lo que indica que las cepas de *B. cereus* y *B. thuringiensis* tienen un efecto medio frente a este fitopatógeno debido a que la mayoría de cepas reduce el crecimiento de un 18-24%. La observación microscópica de los cambios en la morfología celular de este fitopatógeno revelará si hay una relación entre la media aritmética de inhibición y el daño que los *Bacillus* ocasionen.

Gráfico 2: Histograma de los cultivos duales de *F. oxysporum*

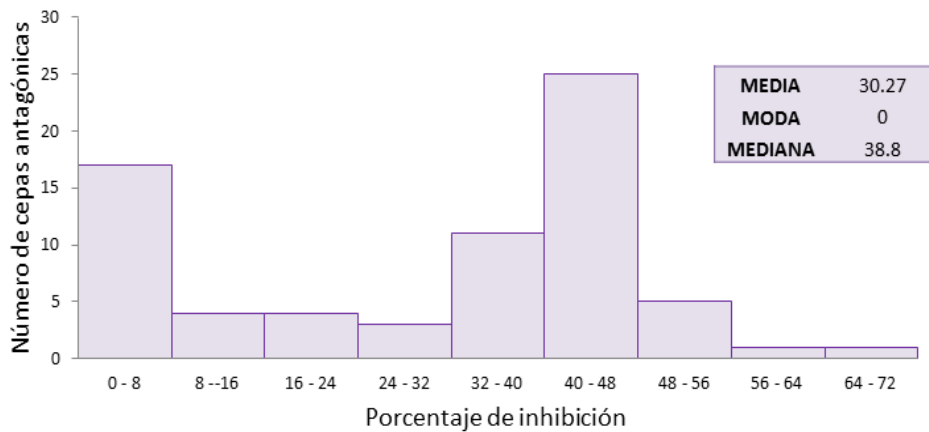
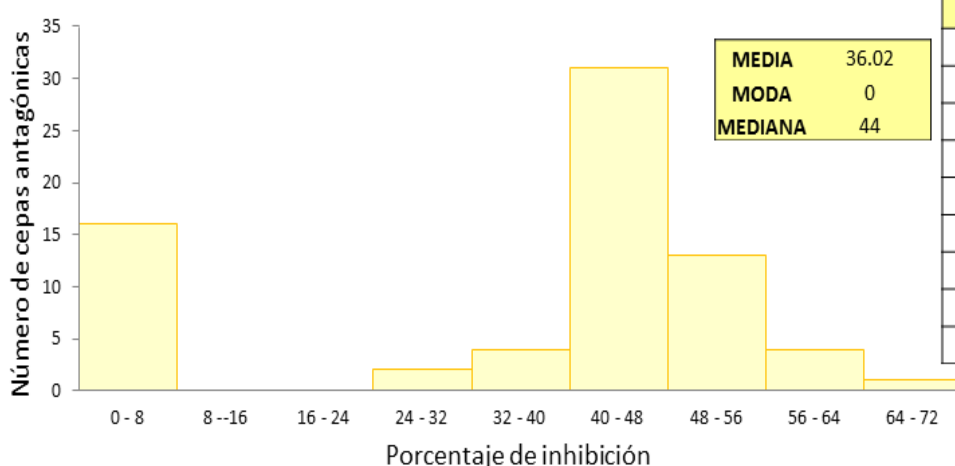


Tabla 3

% DE INHIBICIÓN	FRECUENCIA
0 - 8	17
8 -16	4
16 - 24	4
24 - 32	3
32 - 40	11
40 - 48	25
48 - 56	5
56 - 64	1
64 - 72	1

Fuente: Representación gráfica de la tabla 1

En el gráfico 2 se observa que hay 7 cepas que son capaces de inhibir el crecimiento de *F. oxysporum* entre el 48 al 72%. La media aritmética de inhibición de los antagonistas es de 30.27%, ligeramente mayor que la de *F. equiseti*, aunque a diferencia de aquel fitopatógeno, la inhibición de las cepas de *B. cereus* y *B. thuringiensis* sobre *F. oxysporum* se aprecia mejor entre el 40-48%, lo que indica que estas cepas tienen un buen efecto antagónico frente a este hongo.

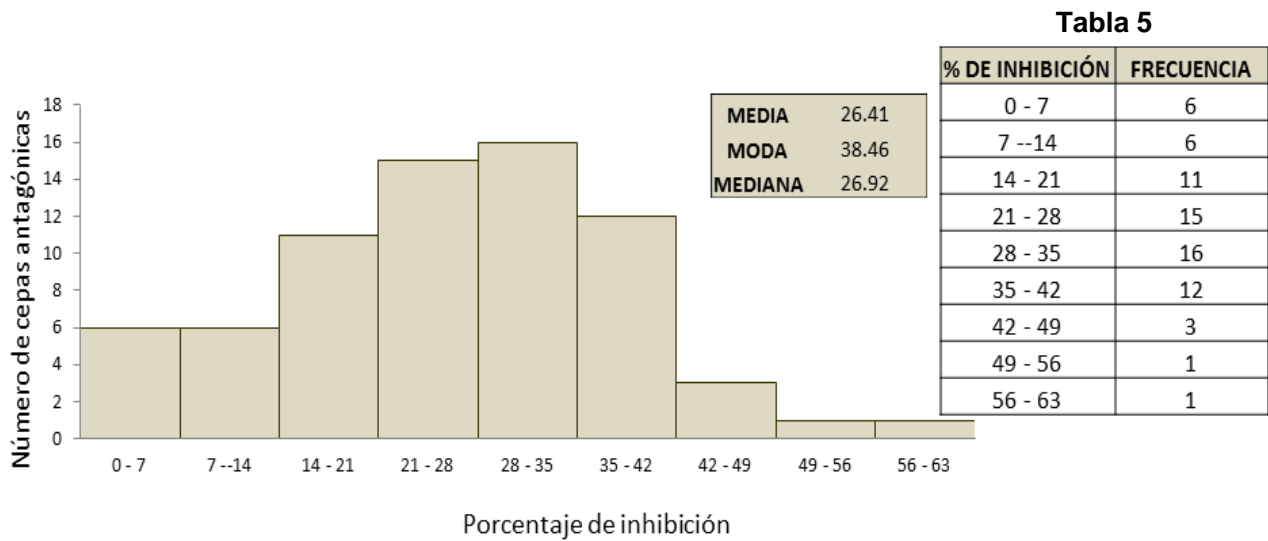
Gráfico 3: Histograma de los cultivos duales de *Fusarium* sp.**Tabla 4**

% DE INHIBICIÓN	FRECUENCIA
0 - 8	16
8 - 16	0
16 - 24	0
24 - 32	2
32 - 40	4
40 - 48	31
48 - 56	13
56 - 64	4
64 - 72	1

Fuente: Representación gráfica de la tabla 1

En el gráfico 3, se aprecian 18 cepas de la colección de *Bacillus* capaces de antagonizar exitosamente a *Fusarium* sp, en porcentaje que va de 48-72%. De los tres *Fusarium* trabajados, es *Fusarium* sp. el fitopatógeno más susceptible a los compuestos que las especies de *Bacillus* secretan. Lo mencionado con anterioridad se comprueba al observar la media aritmética de inhibición, la cual es de 36.02%, además se advierte que la mayor cantidad de agentes antagonistas inhiben en porcentajes que van del 40-48%, mismo que sugiere un buen control biológico de este fitopatógeno por *B. cereus* y/o *B. thuringiensis*.

Gráfico 4: Histograma de los cultivos duales de *Alternaria* sp.



Fuente: Representación gráfica de la tabla 1

En el gráfico 4 se nota que hay dos cepas mostrando una inhibición entre el 49-63%; por otro lado, 16 de las 71 cepas bacterianas inhiben del 28-35% y entre este último intervalo mencionado se encuentra el porcentaje promedio de inhibición el cual corresponde a 26.41%; por lo que se concluye que las cepas de *Bacillus* tienen un efecto antagónico moderado a leve sobre *Alternaria* sp.

La eficacia respecto al biocontrol de las dos cepas encontradas en este trabajo (inhibición entre 49-63%) son de suma importancia, ya que al igual que *Fusarium* spp., *Alternaria* spp. tiene la capacidad de infectar diferentes cultivos al mismo tiempo que genera toxinas que agravan más la enfermedad en la planta.

Gráfico 5: Histograma de los cultivos duales de *Bipolaris* sp.

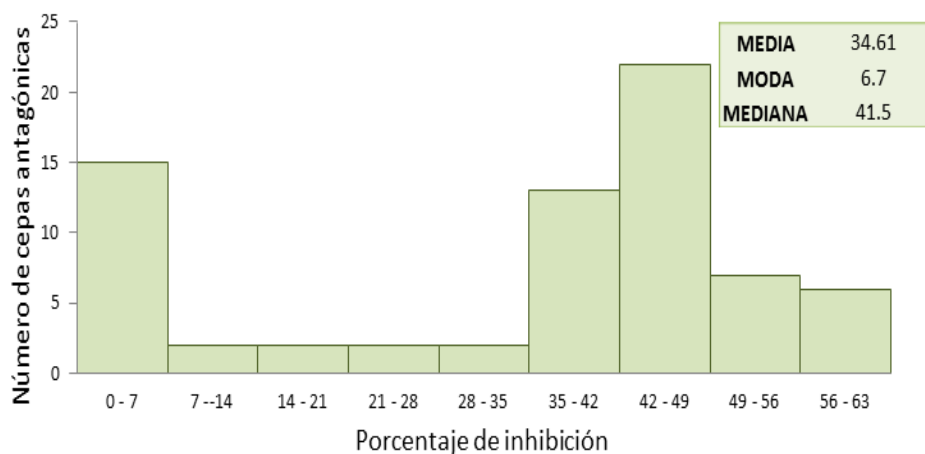


Tabla 6

% DE INHIBICIÓN	FRECUENCIA
0 - 7	15
7 -14	2
14 - 21	2
21 - 28	2
28 - 35	2
35 - 42	13
42 - 49	22
49 - 56	7
56 - 63	6

Fuente: Representación gráfica de la tabla 1

Del gráfico 5 se resaltan 13 cepas antagonistas que muestran una inhibición entre el 49-63% y se observa que la mayoría de agentes antagonistas inhiben a *Bipolaris* sp. en porcentajes que van de 42-49%, lo que sugiere un buen biocontrol de éste con el uso del género *Bacillus* y en especial *B. cereus* y *B. thuringiensis*; por su parte, se observa que el porcentaje promedio de inhibición de las 71 cepas sobre el fitopatógeno *Bipolaris* sp. es de 34.61%, siendo este número la segunda media aritmética más alta después de la señalada para *Fusarium* sp. (36.02%), por lo que se infiere que las trece cepas encontradas para este fitopatógeno son prometedoras al exhibir un buen biocontrol de este hongo.

10.5 Determinación del daño celular de los fitopatógenos a partir de los ensayos *in vitro*

Quiroz y otros investigadores³³ han señalado que la interacción entre un agente antagonista y el patógeno están en función a los mecanismos que posea el primero para frenar el crecimiento de los fitopatógenos; se han reportado diferentes

cambios en la morfología celular de los patógenos expuestos a cepas antagónicas; además, se han revisado los diferentes mecanismos de acción de los metabolitos secundarios y las enzimas líticas sobre la célula fúngica.

Es por ello que en las figs. 23, 24, 25, 26 y 27 (A y B) se pretendan observar los cambios morfológicos de los hongos contemplados en este trabajo, expuestos a cepas de *B. cereus* y *B. thuringiensis*, por microscopía óptica y tinción para hongos, de manera que pueda saberse si los metabolitos secundarios de las bacterias así como las enzimas líticas están actuando por mecanismos fungicidas y/o fungistáticos y no están inhibiendo al hongo sólo por competencia de espacio, nutrientes y estrés.

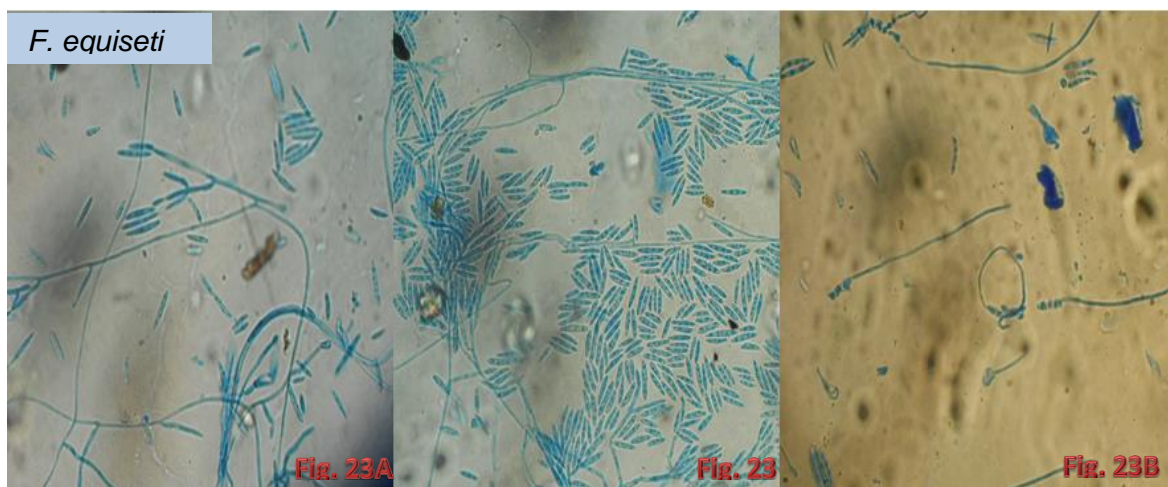


Fig. 23: Control, se observan hifas septadas, células conidiógenas y macroconidios abundantes.

Fig. 23A: Presencia de células conidiógenas, pero hay disminución de macroconidias. Observación derivada de *B. thuringiensis* como agente antagónico (Eli 15).

Fig. 23B: Reducida cantidad de hifas, además están fragmentadas y enrolladas. No hay presencia de células conidiógenas y la cantidad de macroconidios es escasa. Los macroconidios están doblados y ensanchados, además los pseudoseptos no se definen bien. Observación derivada de *B. cereus* (Eli 149) como agente antagonico

Observaciones: Objetivo 40X, tinción con azul de lactofenol. Imágenes obtenidas en el laboratorio de Biotecnología microbiana 105B, BUAP.

En la tabla 7 se indican las cepas que antagonizan en más de un cincuenta por ciento al fitopatógeno *F. equiseti*:

Tabla 7

NOMBRE DE LA CEPA	IDENTIFICACIÓN	INHIBICIÓN (%)
Eli 15	<i>B. thuringiensis</i>	52.5
Eli 55	<i>B. cereus</i>	51.7

Fuente: Resultados del laboratorio

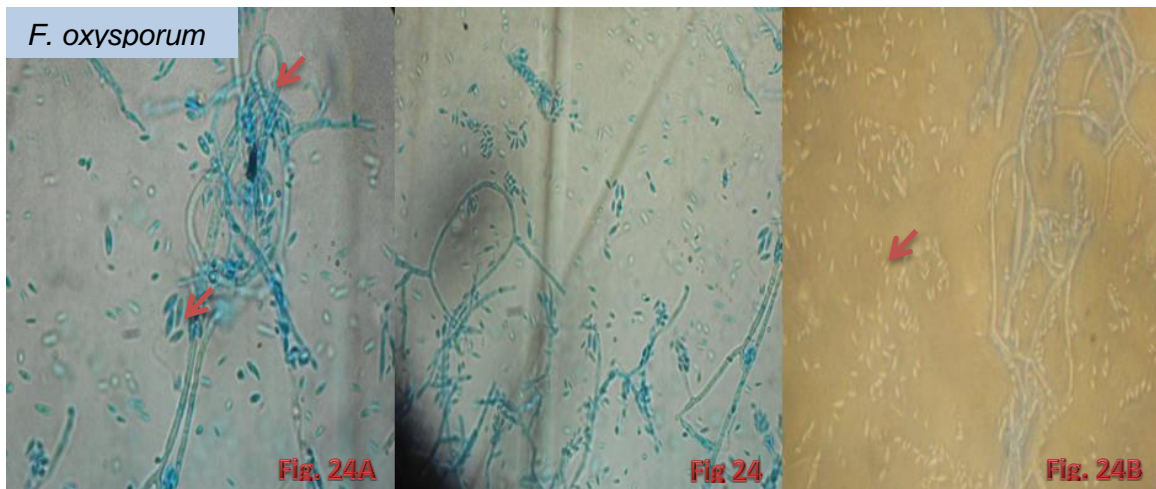


Fig. 24: Control. Se observan hifas septadas y hialinas; microconidias ovales, pequeñas y uniformes.

Fig. 24A: Pocas hifas rizadas, y ligeramente ensanchadas (ver flecha superior), microconidios más largos y anchos a comparación del control. La observación procede de *B. cereus* (Eli 149) como agente de biocontrol.

Fig. 24B: Abundantes hifas rizadas, generalmente formando cúmulos y abundantes microconidios (flecha), sin ninguna diferencia aparente respecto al control. La observación procede de *B. thuringiensis* (Eli 52) como agente de biocontrol.

Observaciones: Objetivo 40X, tinción con azul de lactofenol. Imágenes obtenidas en el laboratorio de Biotecnología microbiana 105B, BUAP.

En la tabla 8 se indican las cepas que antagonizan el crecimiento del fitopatógeno *F. oxysporum* en más de un cincuenta por ciento:

Tabla 8

NOMBRE DE LA CEPA	IDENTIFICACIÓN	INHIBICIÓN (%)
Eli 16	<i>B. cereus</i>	53.3
Eli 25	<i>B. cereus</i>	60.9
Eli 34	<i>B. cereus</i>	50.0
Eli 58	<i>B. cereus</i>	52.4
Eli 61	<i>B. thuringiensis</i>	54.2
Eli 62	<i>B. cereus</i>	67.2
Eli 149	<i>B. cereus</i>	55.6

Fuente: Resultados del laboratorio.

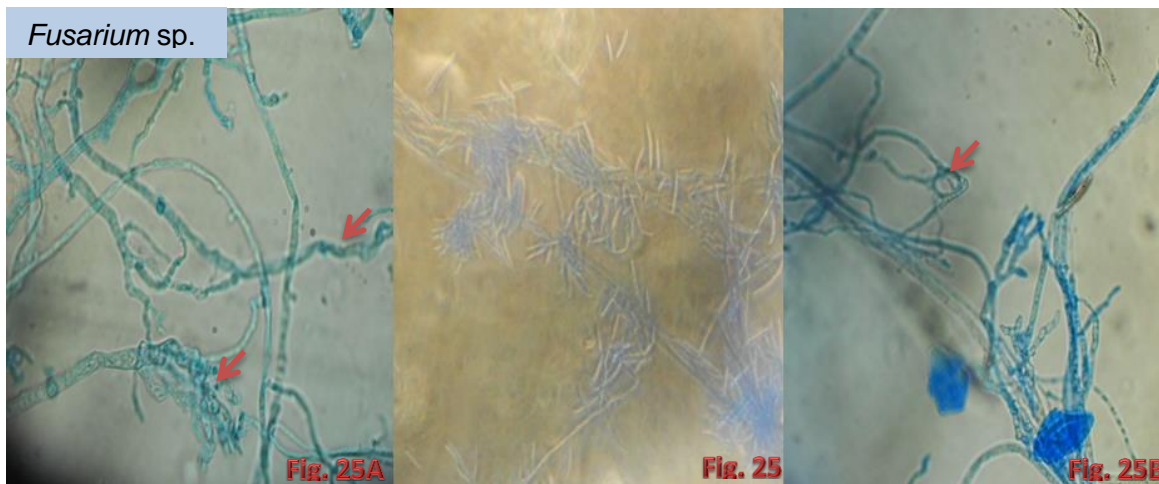


Fig. 25: Control. Se observan hifas septadas y hialinas; abundantes macroconidios largos y algunos con terminación apical en forma de gancho. También hubo presencia de células conidiógenas.

Fig. 25A: El número de macroconidios es escaso, se observan células conidiógenas, sin embargo los macroconidios desarrollados están doblados y presentan aspecto rizado (flecha inferior); por otro lado, las hifas también se muestran rizadas (flecha superior), con septos indefinidos, y de diferente tamaño, algunas inflamadas y otras muy delgadas. La imagen resulta de *B. cereus* (Eli 149) como agente antagonico.

Fig. 25B: La característica fundamental de esta preparación fue el enrollamiento de las hifas (ver flecha), además de la presencia de puntos blancos entre los septos de las hifas y débil efecto rizado; se notaron células conidiógenas dobladas. La imagen resulta de *B. thuringiensis* (Eli 6) como agente antagonico.

Observaciones: Objetivo 40X, tinción con azul de lactofenol. Imágenes obtenidas en el laboratorio de Biotecnología microbiana 105B, BUAP.

En la tabla 9 se observa la lista de cepas que antagonizan a *Fusarium* sp. en más de un cincuenta por ciento su crecimiento, respecto al control.

Tabla 9

NOMBRE DE LA CEPA	IDENTIFICACIÓN	INHIBICIÓN (%)
Eli 1	<i>B. cereus</i>	50.0
Eli 3	<i>B. thuringiensis</i>	55.0
Eli 4	<i>B. cereus</i>	59.5
Eli 6	<i>B. thuringiensis</i>	50.0
Eli 9	<i>B. thuringiensis</i>	52.4
Eli 13	<i>B. thuringiensis</i>	55.0
Eli 18	<i>B. cereus</i>	51.3
Eli 19	<i>B. thuringiensis</i>	52.4
Eli 20	<i>B. thuringiensis</i>	50.0
Eli 26	<i>B. cereus</i>	60.5
Eli 36	<i>B. cereus</i>	55.3
Eli 44	<i>B. thuringiensis</i>	53.0
Eli 51	<i>B. cereus</i>	60.0
Eli 61	<i>B. thuringiensis</i>	67.0
Eli 64	<i>B. cereus</i>	57.1
Eli 149	<i>B. cereus</i>	67.0

Fuente: Resultados del laboratorio

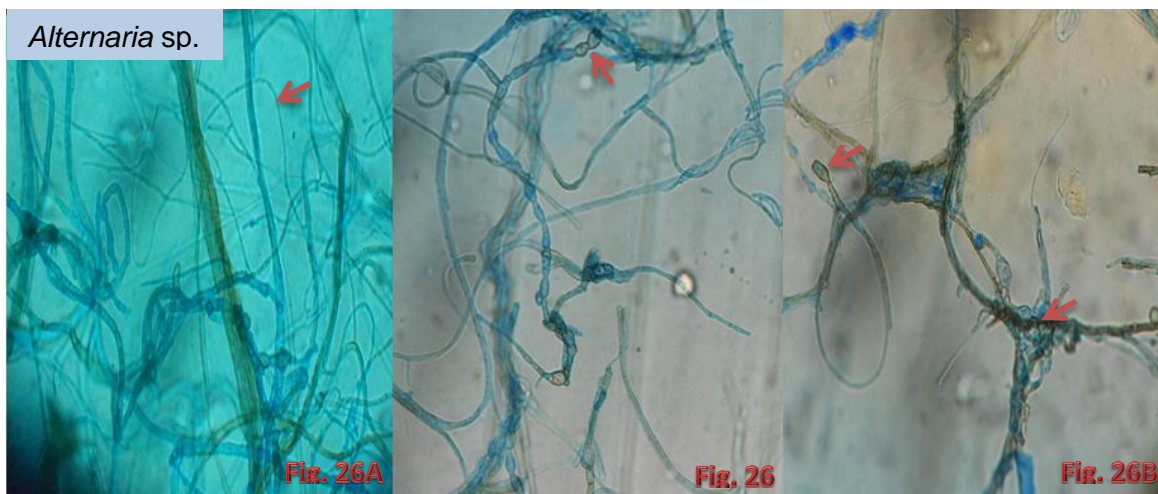


Fig. 26: Control. Se vieron hifas fugilaginosas, macrosifonadas y septadas. Las dictiosporas se encuentran en cadena (ver flecha), presentan septos transversales y longitudinales; la hifa de donde emerge la dictioconidia tiende a ser más ancha que la hifa que no la contiene.

Fig. 26A: Mayor número de hifas, algunas con enrollamiento y calibre más delgado respecto al control (ver flecha); dictioconidios presentes, con dictiosporas indefinidas, generalmente más grandes y redondas respecto al control. La imagen resulta del empleo de *B. thuringiensis* (Eli 61) como agente de biocontrol.

Fig. 26B: Hifas fugilaginosas, con presencia de algunas dictiosporas normales (flecha superior), respecto al control, y otras más anchas y redondeadas. Los dictioconidios tienen un aspecto rizado y las dictiosporas juntas y no en cadena como en el control (flecha inferior). Presencia de moderadas clamidosporas. La imagen resulta del empleo de *B. cereus* (Eli 149) como agente de biocontrol.

Observaciones: Objetivo 40X, tinción con azul de lactofenol. Imágenes obtenidas en el laboratorio de Biotecnología microbiana 105B, BUAP.

En la tabla 10 se observa la lista de cepas que antagonizan a *Alternaria* sp. en un cincuenta por ciento o más, respecto al control.

Tabla 10

NOMBRE DE LA CEPA	IDENTIFICACIÓN	INHIBICIÓN (%)
Eli 61	<i>B. thuringiensis</i>	50.0
Eli 149	<i>B. cereus</i>	59.09

Fuente: Resultados del laboratorio.

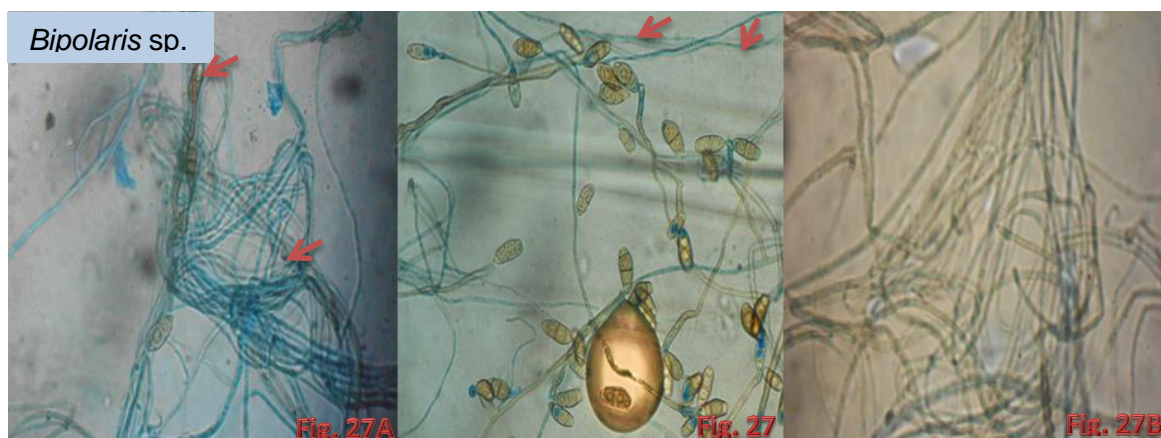


Fig. 27: Control. Se vieron hifas fugilaginosas, macrosifonadas y septadas. Se observan varios conidióforos (ver flechas) y algunas conidiosporas sueltas, avaladas y pseudoseptadas.

Fig. 27A: En la preparación se observó mayor número de hifas y menor número de conidiosporas, éstas eran diferentes a las esporas del hongo control, generalmente conservaban la forma ovalada pero mirábase más alargadas (ver flecha superior), y ligeramente dobladas a la mitad.

Algunas hifas se apreciaban inflamadas y con septos indefinidos (flecha inferior). Observación obtenida a partir de *B. thuringiensis* (Eli 52) como agente antagónico.

Fig. 27B: Hifas fugilaginosas, sin presencia de conidiosporas libres ni conidióforos. En toda la preparación se pudieron notar hifas de aspecto rizado, con septos indefinidos y con enrollamiento. Observación obtenida a partir de *B. cereus* (Eli 149) como agente antagónico.

Observaciones: Objetivo 40X, tinción con azul de lactofenol. Imágenes obtenidas en el laboratorio de Biotecnología microbiana 105B, BUAP.

En la tabla 11 se agregan las cepas de los bacilos que antagonizan favorablemente, en un cincuenta por ciento o más, al fitopatógeno *Bipolaris* sp.

Tabla 11

NOMBRE DE LA CEPA	IDENTIFICACIÓN	INHIBICIÓN (%)
Eli 2	<i>B. thuringiensis</i>	53.3
Eli 4	<i>B. cereus</i>	55.6
Eli 8	<i>B. cereus</i>	51.1
Eli 12	<i>B. cereus</i>	51.1
Eli 13	<i>B. thuringiensis</i>	54.1
Eli 52	<i>B. thuringiensis</i>	54.3
Eli 54	<i>B. cereus</i>	56.5
Eli 58	<i>B. cereus</i>	54.1
Eli 59	<i>B. thuringiensis</i>	58.7
Eli 64	<i>B. cereus</i>	56.5
Eli 66	<i>B. cereus</i>	58.7
Eli 67	<i>B. cereus</i>	56.5
Eli 149	<i>B. cereus</i>	56.3

Fuente: Resultados de laboratorio.

10 CONCLUSIONES

1. Se determinó la capacidad antagónica, mediante cultivos duales *in vitro*, de 71 cepas de *B. cereus* y *B. thuringiensis*, encontrando a las cepas Eli 58, Eli 61, Eli 64 y Eli 149 como los mejores agentes antagónicos al reducir el crecimiento de los hongos fitopatógenos: *F. equiseti*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., y *Bipolaris* sp., aislados de superficies agrícolas infectadas. La reducción del crecimiento fúngico en agar papa y dextrosa (PDA) figuró en porcentajes que van del 51.7 al 67, según los histogramas realizados para cada hongo.
2. La determinación del mecanismo de inhibición de los agentes antagónicos se realizó mediante la observación microscópica, ésta reveló diferentes cambios morfológicos en los hongos fitopatógenos, los cuales incluyeron: impedimento de la conidiogénesis, enrollamiento y adelgazamiento del micelio, pérdida en la integridad de los septos en las hifas, presencia de cuerpos extraños intracelulares e inflamación en dictioconidias; lo que demuestra que *B. cereus* y *B. thuringiensis* son especies con un amplio potencial en la agricultura debido a su poder antagónico mediado por diferentes metabolitos secretados a lo largo de su ciclo de vida.
3. Un reto de la agricultura y la ciencia misma será diseñar, en el futuro, diversos biopesticidas que desplacen completamente a los plaguicidas químicos y con ello los inconvenientes que éstos presentan, entre ellos la resistencia microbiana.

11 BIBLIOGRAFÍA

1. Hajek A. (2004). *Natural Enemies: An introduction to biological control*. Cambridge University Press, Cambridge.
2. Aguilar R, Lamas J (1980). Control integrado de plagas del algodón. *Rev. Peruana de Entomol.* 31: 1-8.
3. Van Lenteren J, Bale J, Bigler F, Hokkanen H, Loomans A (2006). Assessing risks of releasing exotic biological control agents of arthropod pests. *Annual Review of Entomology* 51:609–634.
4. Vasconcelos Y (2012). Insecto contra insecto. *Pesquisa FAPESP.* 194: 68-73.
5. Control Biológico Orgánico. Dossier de plagas y enfermedades. Consultado en línea el 03 de Septiembre de 2015 en: <http://www.cborganic.cl/tienda/dossier-de-plagas-y-enfermedades>
6. Montesinos M, Loera O, Viniegra G, Alatorre R (2011). Relationship between virulence and enzymatic profiles in the cuticle of *Tenebrio molitor* by 2-deoxy-D-glucose-resistant mutants of *Beauveria bassiana*. *World J Microbiol. Biotechnol.* 27: 2095-2102.
7. BIOtech. *Trichoderma*. Consultado en línea el 17 de Noviembre de 2015 en: <http://laboratoriobiotech.com/trichoderma/>
8. Márquez F (2007). Aislamiento y taxonomía de bacterias del género *Bacillus* recolectadas en suelos de un bosque de *Pinus radiata* y una pradera permanente en distintas épocas de muestreo. Universidad Austral de Chile, Chile.
9. Katarzyna G, Malgorzata N (2012). Antifungal activity of *Bacillus* spp. against *Fusarium* spp. *Proceeding of ECOpole.* DOI: 10.2429; 6(1)
10. Sansinenea E, Ortiz A (2011). Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnol Lett* 33:1523–1538.

11. Chang YH, Shangkuan YH, Lin HC, Liu HW. (2003) PCR Assay of the groEL Gene for Detection and Differentiation of *Bacillus cereus* Group Cells". Appl Envir Microbiol 69:4502-4510.
12. Carreras B (2005). Cuantificación por densitometría de la proteína cry de *Bacillus thuringiensis*. Fitosanidad. 9, 43-46.
13. Hua G, Masson L, Jurat L, Schwab G (2001). Binding analyses of *Bacillus thuringiensis* Cry δ -endotoxins using brush border membrane vesicles of *Ostrinia nubilalis*. Appl. Environ. Microbiol. 67, 872-879.
14. Universidad de Tennessee, disponible en línea:
<http://web.utk.edu/~jurat/Btresearchtable.html>
15. Pérez C, Fernández L, Sun J, Folch J, Gill S, Soberón M, Bravo A (2005). *Bacillus thuringiensis* subsp. *israeliensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. Agricultural sciences. 102, 18303-18308.
16. Velusamy P, Gnanamanickam SS (2008). The Effect of Bacterial Secondary Metabolites on Bacterial and Fungal Pathogens of Rice. In: Karlowsky P (ed) Soil biology, vol 14. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 93–106.
17. Stein T (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Mol Microbiol 56:845–857
18. Oscariz J, Pisabarro A (2000). Characterization and mechanism of action of cerein 7, a bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. J Appl Microbiol. 89, 361-369.
19. Gay E, Lee K, Souleimanov A, Di Falco M, Zhou X, Ly A, Charles T, Driscoll B, Smith D (2006). A novel bacteriocin, Thuricin 17, produced by PGPR strain *Bacillus thuringiensis* NEB17: isolation and classification. J. Appl. Microbiol. 100: 545-554.
20. Silo-Suh L, Stabb E, Raffel S, Handelsman J (1988). Target range of zwittermicina A, an aminopolyol antibiotic from *Bacillus cereus*. Curr Microbiol. 37, 6-11.
21. Yang T, Xiao-mei B, Feng-xia L, Hai-zhen Z, Zhao-xin L (2011). Antifungal activity and mechanism of fengycin in the presence and absence of

- commercial surfactin against *Rhizopus stolonifera*. J of Microbiology. 49, 146-150.
22. Thimon L, Peypoux F, Wallach J, Michel G (1995). Effect of the lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cell. FEMS Microbiol Lett. 128, 101-106.
23. Maget R, Ptak M, Peypoux F, Michel G (1985). Pore-forming properties of iturin A, a lipopeptide antibiotic. Biochim Biophys Acta. 815, 405-409.
24. Narayanasamy P (2003). Biological management of diseases of crops. In: Narayanasamy P (ed) Characteristics of biological control agents, Vol. 1. Springer Netherlands, India, 295-395.
25. Acosta J (2013). Pared celular y membrana plasmática. Consultado en línea el 22 de Octubre de 2015 en:
http://es.dayshare.org/Quimio_Farma/membrana-plasmatica-y-pared-celular-1era-parte.
26. Estupiñán H, Ossa J (2007). Efecto del agente causal de la marchitez vascular de la Uchuva (*Physalis peruviana* L.) el hongo *Fusarium oxysporum* Schlecht, sobre algunas soláneas y otras especies cultivadas afectadas por formas especiales del microorganismo. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
27. Camacho M, Valenzuela C, Hernández R (2014). *Fusarium* spp. asociadas a clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) en Baja California, México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 8, 1409-1415.
28. Arias J, Jerez A (2008). Elaboración de un atlas para la descripción macroscópica y microscópica de hongos fitopatógenos de interés en especies de flores de corte cultivadas en la sabana de Bogotá. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
29. Nyvall R, Percich J, Porter J, Brantner J (1995). Comparison of fungal brown spot severity to incidence of seedborne *Bipolaris oryzae* and *B sorokiniana* and infected floral sites on cultivated wild rice. Plant Disease. 79, 249-250.

30. González P (2006). Enfermedades del tomate. Consultado en línea el 22 de Octubre de 2015 en:
http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/enfermedades/Fusarium_tom.html
31. Arias S, Ávila H, Theodoracopoulos M (2012). Daños por tizón temprano en el cultivo de papa. Consultado en línea el 22 de Octubre de 2015 en:
<http://www.fundesyram.info/biblioteca/displayFicha.php?fichaID=1719>
32. García E, Leyva G, Villaseñor E, Rodríguez M, Tovar M (2013). Identificación e incidencia de tres hongos fitopatógenos, de reporte nuevo, en avena (*Avena sativa* L.) en la meseta central de México. Rev. Agrociencia. 47,8.
33. Ariza Y, Sánchez L (2012). Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* con efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. Publicación Científica en Ciencias Biomédicas. 10, 135-250.
34. Mojica M, Luna O, Sandoval C, Pereyra A, Morales R, González A, Hernández L, Alvarado G (2009). Control biológico de la marchitez del chile (*Capsicum annum* L.) por *Bacillus thuringiensis*. Revista Mexicana de Fitopatología. 78, 105-110.
35. Kluge B, Vater J, Salnikow J, Eckart K (1988). Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC 21332. FEBS Lett. 231,107–110.
36. Peypoux F, Michel G, Delcambe L (1976). The structure of mycosubtilin, an antibiotic isolated from *Bacillus subtilis*. Eur J Biochem. 63, 391–398.
37. Yong J, Rezuanul I, Yong L, Chi S (2012). Isolation and identification of antifungal compounds from *Bacillus subtilis* C9 inhibiting the growth of plant pathogenic fungi. Microbiology. 40, 59-66.
38. Gong M, Wang J, Zhang J, Yang H, Lu X, Pei Y, Cheng J (2006). Study of the antifungal ability of *Bacillus subtilis* strain PY-1 *in vitro* and identification of its antifungal substance (iturin A). Acta Biochim Biophys Sin. 38, 233-240.
39. Kloepper J, Ryn C, Zhang S (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* sp. Phytopathol. 94, 1259-1266.

40. Basha S, Ulaganathan K (2002). Antagonism of *Bacillus* species (strain BC121) towards *Curvularia lunata*. *Current Sci.* 82,1457-1463.
41. Quiroz V, Ferrera R, Alarcón A, Lara M (2008). Antagonismo *in vitro* de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan al cultivo del ajo. *Revista Mexicana de Micología.* 26, 27-34.
42. Contreras C (2006). Caracterización y Pruebas de Patogenicidad cruzada entre aislamientos de *Colletotrichum* spp. Obtenidos de frutos de Lulo (*Solanum quitoense* Lam), Tomate de Árbol (*Solanum betacea* Sendt), Granadilla (*Passiflora ligularis* Juss), mango (*Mangifera indica* L) y tallos de Mora (*Rubus glaucus* Benth) con síntomas de antracnosis. Pontificia.