

(Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo, A. C.)

COMPATIBILIDAD DE FUNGICIDAS Y
BACTERICIDAS CON MICROORGANISMOS
ANTAGONISTAS DEL SUELO Y SU EFECTO
SOBRE HONGOS FITOPATÓGENOS
RADICULARES DE TOMATE

Por

Mirella Romero Bastidas

Tesis aprobada por la

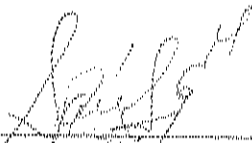
Universidad Cuiac (del CIA!) en Ciencias y Tecnología de Productos
Agrícolas de Zonas Tropicales y Subtropicales

como requisito parcial para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias

APROBACIÓN

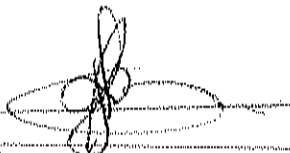
Los miembros del comité designado para evaluar la tesis de MIRELLA ROMERO BASTIDAS, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



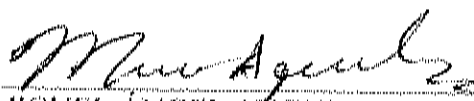
DR. RAYMUNDO SAÚL GARCÍA ESTRADA
Director de Tesis



M.C. JOSÉ ARMANDO CARRILLO FASIO
Asesor



DR. JOSÉ BENIGNO VALDEZ TORRES
Asesor



DR. MIGUEL ÁNGEL ÁNGULO ESCALANTE
Asesor

DECLARACION INSTITUCIONAL.

Se permiten y agradecen citas breves del material contenido en la presente tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la producción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

La publicación en comunidades científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director o directora del trabajo de tesis.

DR. ALFONSO A. GARDEA BÉJAR
Director General

CONTENIDO

Pág

AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIAS	iii
ÍNDICE DE CUADROS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
RESUMEN.....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVO GENERAL.....	3
III. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
IV. HIPÓTESIS.....	5
V. META.....	6
VI. REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
6.1. Las hortalizas en México.....	7
6.1.1 El cultivo de tomate.....	7
6.1.1. Problemas fitopatológicos del tomate	8
6.1.2. Fitopatógenos radiculares en tomate	8
6.2. Control químico.....	9
6.2.1. Los fungicidas	10
6.2.1.1. Sitios de acción de los fungicidas.....	11
6.2.1.2. Clasificación de los fungicidas.....	11
6.2.1.3. Fungicidas sistémicos.....	12
6.2.1.4. Principales fungicidas de los benzimidazoles	12
6.2.1.4.1. Benomil.....	13
6.2.1.4.2. Carbendazim.....	13
6.2.1.5. Principal fungicida derivado de las fenilamínas....	13
6.2.1.5.1. Metalaxyl.....	14
6.2.1.6. Fungicidas preventivos.....	14
6.2.1.7. Fungicidas preventivos de las ftalimidas.....	15
6.2.1.7.1. Captan	15
6.2.1.8. TCMTB	15
6.2.2. Antibióticos o bactericidas	16
6.2.2.1. Hidróxido de cobre.....	16
6.2.2.2. Estreptomicina.....	17
6.2.2.3. Oxitetraciclina	18
6.2.2.4. Gentamicina.....	18
6.2.2.5. Kasugamicina	19
6.3. Control biológico.....	20
6.4. Hongos y bacterias como antagonistas de fitopatógenos del suelo.....	21
6.5. <i>Trichoderma</i> spp como agente de control biológico	22
6.5.1. Tipo de reproducción.....	22
6.5.2. Rango de hospederos.....	23
6.5.3. Biología	24
6.5.4. Mecanismos de acción.....	25
6.5.4.1. Antibiosis.....	25
6.5.4.2. Competencia por nutrientes y espacio.....	26
6.5.4.3. Inducción de resistencia	26

	6.5.4.4. Micoparasitismo	27
	6.5.5. Especies de <i>Trichoderma</i> utilizadas para el control biológico de hongos fitopatógenos.....	28
	6.5.5.1. Características generales de <i>T. harzianum</i>	28
	6.5.5.2. Características generales de <i>T. lignorum</i>	28
6.6.	<i>Bacillus</i> spp como agente de control biológico.....	29
	6.6.1. <i>Bacillus subtilis</i>	30
	6.6.1.1. Clasificación taxonómica de <i>B. subtilis</i>	31
	6.6.1.2. Modo de acción de <i>B. subtilis</i>	31
	6.6.1.3. Formación de endosporas en <i>B. subtilis</i>	32
	6.6.1.4. Morfología de la espora de <i>B. subtilis</i>	33
	6.6.2. <i>Bacillus stearothersophilus</i>	34
	6.6.2.1. Taxonomía de <i>B. stearothersophilus</i>	35
	6.6.2.2. Morfología de la espora de <i>B. stearothersophilus</i>	37
6.7.	Productos biofungicidas a base de bacterias y hongos antagonistas ...	38
	6.7.1. Formulaciones a base de <i>Trichoderma</i> spp	41
	6.7.2. Formulaciones a base de <i>Bacillus subtilis</i>	42
	6.7.3. Control de calidad de los productos biofungicidas	43
6.8.	Efectos de los fungicidas-bactericidas en microorganismos del suelo.....	44
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	46
	7.1. Localización del experimento	47
	7.2. Microorganismos biológicos	47
	7.3. Microorganismos fitopatógenos.....	47
	7.4. Productos fungicidas y bactericidas	47
	7.5. Experimento <i>in vitro</i>	50
	7.5.1. Fungicidas y bactericidas en el medio de cultivo con los hongos (<i>Trichodermas</i> y fitopatógenos).....	50
	7.5.2. <i>Bacillus</i> con discos de papel filtro impregnados con los fungicidas y bactericidas	51
	7.5.3. Efecto biocontrolador de las dos especies de <i>Bacillus</i> utilizando el método de rayado en los cuatro extremos de la caja petri	52
	7.5.4. Pruebas de porcentaje de viabilidad de los bioplaguicidas (<i>Trichodermas</i> y <i>Bacillus</i>).....	52
VIII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	54
	8.1. Fungicidas contra hongos fitopatógenos	54
	8.1.1. <i>Rhizoctonia solani</i>	54
	8.1.2. <i>Pythium aphanidermatum</i>	59
	8.1.3. <i>Fusarium oxysporum</i>	63
	8.1.4. <i>Phytophthora capsici</i>	67
	8.2. Fungicidas y bactericidas sobre las dos especies de <i>Trichodermas</i>	73
	8.2.1. Fungicidas	73
	8.2.2. Bactericidas	80
	8.3. Fungicidas y bactericidas contra <i>B. subtilis</i> y <i>B. stearothersophilus</i> ..	86
	8.3.1. Fungicidas	86
	8.3.2. Bactericidas	90
	8.4. <i>B. subtilis</i> y <i>B. stearothersophilus</i> contra hongos fitopatógenos	96

8.4.1.	<i>Phytophthora capsici</i>	96
8.4.2.	<i>Fusarium oxysporum</i>	101
8.4.3.	<i>Pythium aphanidermatum</i>	105
8.4.4.	<i>Rhizoctonia solani</i>	108
6.5.	Porcentaje de viabilidad de los productos biofungicidas a base de hongos y bacterias antagonistas	113
6.5.1.	<i>Trichoderma</i> spp.....	113
6.5.2.	<i>Bacillus</i> spp	115
IX.	CONCLUSIONES.....	118
X.	LITERATURA CITADA.....	121

AGRADECIMIENTOS

La elaboración de una tesis, es un proceso arduo que requiere mucho tiempo y esfuerzo no solo de quien la realiza, si no de la gente que la rodea. Es por esto que agradezco todas a aquellas personas que me apoyaron durante estos años y gracias a los cuales este trabajo ha sido posible.

Mi más especial agradecimiento al director de esta tesis el **Dr. Raymundo Saúl García Estrada** por la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación, por su dedicación y apoyo, mil gracias.

A mis asesores; el **M.C. José Armando Carrillo Fasio, Dr. Miguel Ángel Angulo Escalante y el Dr. José Benigno Valdez Torres**, por su enorme disposición y ayuda en la realización de mi tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT), por su gran apoyo económico, que facilitó el término de este trabajo durante el programa de maestría.

A los técnicos del laboratorio de Fitopatología el **Ing. Isidro Márquez Zequera y Beatriz Ibarra**, por su colaboración en el trabajo experimental de laboratorio.

A **Fundación Produce Sinaloa** por el apoyo económico brindado durante el transcurso de este proyecto.

A **CIAD A.C. Unidad Culiacán** por haberme permitido realizar mis estudios en sus instalaciones, así como a sus investigadores y técnicos por brindarme apoyo a cada momento.

DEDICATORIA

A mis padres, **Ma. Del Carmen Bastidas Barraza** y **Leobardo Romero Ríos** con mucho amor y agradecimiento, por apoyarme en todo momento de una manera incondicional al darme todo a cambio de nada.

A mi esposo **Julio Martín Tirado Jara**, por soportar mi mal humor después de un mal día de trabajo, por su gran amor y paciencia durante todo este tiempo.

A mi tía **Adelaida Barraza González**, por ser una de las personas más importantes en mi vida, apoyándome siempre en la realización de esta tesis y por haberme inculcado siempre buenas costumbres.

A mis hermanos **María Esther, Alma Delia, Verónica, Leobardo, Julio César, Isabel, Beatriz Celene, Brenda Karina** y **Jesús Iván**, por estar siempre animándome en los momentos más difíciles haciéndolos más amenos y divertidos.

A mis amigos y compañeros de maestría, especialmente a: **Juan Ramón Sánchez Puga, Armenia Velásquez Gurrola, Jorge Dávila Aviña** y **Guillermo Niño Medina** de quienes me llevo gratos recuerdos y buenos momentos.

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>Trichoderma</i> spp.....	23
Cuadro 2. Formulación y concentración de productos biológicos	48
Cuadro 3. Nombre comercial, ingredientes activos, dosis recomendadas y tipo de formulaciones de los productos fungicidas y bactericidas evaluados	49
Cuadro 4. Resultados obtenidos del ANOVA, referente al crecimiento micelial de <i>Rhizoctonia solani</i> en la aplicación con los fungicidas	55
Cuadro 5. Resultados obtenidos del ANOVA, referente al crecimiento micelial de <i>Pythium aphanidermatum</i> en la aplicación con los fungicidas	59
Cuadro 6. Resultados obtenidos del ANOVA, referente al crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> en la aplicación de los fungicidas	63
Cuadro 7. Resultados obtenidos del ANOVA, referente al crecimiento micelial de <i>Phytophthora capsici</i> en la aplicación con los fungicidas.....	67
Cuadro 8. Resultados obtenidos del ANOVA, referente al crecimiento micelial de las dos especies de <i>Trichodermas</i> en la aplicación de los fungicidas	73
Cuadro 9. Resultados obtenidos del ANOVA, referente al crecimiento micelial de <i>Trichoderma harzianum</i> en la aplicación de los bactericidas.....	80
Cuadro 10. Resultados obtenidos del ANOVA, referente al crecimiento micelial de <i>Trichoderma lignorum</i> en la aplicación de los bactericidas	81
Cuadro 11. Resultados obtenidos del ANOVA, referente al crecimiento micelial de las dos especies de <i>Bacillus</i> en la aplicación de los fungicidas.....	86

Cuadro 12. Resultados obtenidos del ANOVA, referente al crecimiento micelial de las dos especies de <i>Bacillus</i> en la aplicación de los bactericidas	90
Cuadro 13. Resultados obtenidos del ANOVA, referente al crecimiento micelial de <i>Phytophthora capsici</i> con las dos especies de <i>Bacillus</i>	97
Cuadro 14. Resultados obtenidos del ANOVA, referente al crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> con las dos especies de <i>Bacillus</i>	101
Cuadro 15. Resultados obtenidos del ANOVA, referente al crecimiento micelial de <i>Pythium aphanidermatum</i> con las dos especies de <i>Bacillus</i>	105
Cuadro 16. Resultados obtenidos del ANOVA, referente al crecimiento micelial de <i>Rhizoctonia solani</i> con las dos especies de <i>Bacillus</i>	109
Cuadro 17. Formulación y concentración de los productos biológicos evaluados a base de <i>Trichoderma</i> spp (UFC/mL)	114
Cuadro 18. Formulación y concentración de los productos biológicos evaluados a base de bacterias (UFC/mL)	116

Cuadro 12. Resultados obtenidos del ANOVA, referente al crecimiento micelial de las dos especies de <i>Bacillus</i> en la aplicación de los bactericidas	90
Cuadro 13. Resultados obtenidos del ANOVA, referente al crecimiento micelial de <i>Phytophthora capsici</i> con las dos especies de <i>Bacillus</i>	97
Cuadro 14. Resultados obtenidos del ANOVA, referente al crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysparum</i> con las dos especies de <i>Bacillus</i>	101
Cuadro 15. Resultados obtenidos del ANOVA, referente al crecimiento micelial de <i>Pythium aphanidermatum</i> con las dos especies de <i>Bacillus</i>	105
Cuadro 16. Resultados obtenidos del ANOVA, referente al crecimiento micelial de <i>Rhizoctonia solani</i> con las dos especies de <i>Bacillus</i>	109
Cuadro 17. Formulación y concentración de los productos biológicos evaluados a base de <i>Trichoderma</i> spp (UFC/mL)	114
Cuadro 18. Formulación y concentración de los productos biológicos evaluados a base de bacterias (UFC/mL)	116

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Inducción de resistencia de <i>Trichoderma</i> spp en la planta	27
Figura 2: El ciclo de esporulación de <i>Bacillus subtilis</i>	33
Figura 3. Árbol filogenético del genero <i>Bacillus</i> y el nuevo genero <i>Geobacillus</i> , basado en los alineamientos de los genes 16S rRNA.....	37
Figura 4. Fluctuación de poblaciones del fitopatógeno con diferentes métodos de control	39
Figura 5. Interacción del crecimiento micelial de <i>Rhizoctonia solani</i> con los diferentes fungicidas evaluados	56
Figura 6. Efectos principales del crecimiento micelial en <i>Rhizoctonia solani</i> en la aplicación con los fungicidas	58
Figura 7. Interacción en el crecimiento micelial de <i>Pythium aphanidermatum</i> con los fungicidas	60
Figura 8. Efectos principales del crecimiento micelial de <i>Pythium aphanidermatum</i>	62
Figura 9. Interacción en el crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> con los fungicidas	64
Figura 10. Efectos principales del crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i>	66
Figura 11. Interacción en el crecimiento micelial de <i>Phytophthora capsici</i> con los fungicidas	68
Figura 12. Efectos principales del crecimiento micelial de <i>Phytophthora capsici</i>	70
Figura 13. Efectividad de los fungicidas a nivel <i>in vitro</i> sobre los cuatro fitopatógenos evaluados.....	72
Figura 14. Interacción en el crecimiento micelial de <i>Trichoderma harzianum</i> con los fungicidas	74

Figura 15. Interacción en el crecimiento micelial de <i>Trichoderma lignorum</i> con los fungicidas	75
Figura 16. Efectos principales del crecimiento micelial de las dos especies de <i>Trichodermas</i>	78
Figura 17. Efecto de los fungicidas a nivel <i>in vitro</i> sobre las dos especies de <i>Trichoderma</i> (<i>harzianum</i> y <i>lignorum</i>).....	79
Figura 18. Interacción en el crecimiento micelial de <i>Trichoderma. harzianum</i> con los bactericidas	82
Figura 19. Interacción en el crecimiento micelial de <i>Trichoderma lignorum</i> con los bactericidas	82
Figura 20. Efectos principales del crecimiento micelial de <i>Trichoderma harzianum</i>	84
Figura 21. Efectos principales del crecimiento micelial de <i>Trichoderma lignorum</i> .	85
Figura 22. Bactericidas sobre el desarrollo micelial de las dos especies de <i>Trichoderma</i> (<i>harzianum</i> y <i>lignorum</i>)	85
Figura 23. Interacción en la inhibición bacteriana de los <i>Bacillus</i> con los fungicidas	87
Figura 24. Efectos principales de la inhibición bacteriana de las dos especies de <i>Bacillus</i>	88
Figura 25. Efecto de los fungicidas sobre el crecimiento bacteriano de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus stearothermophilus</i>	89
Figura 26. Interacción de la inhibición bacteriana de los <i>Bacillus</i> con los bactericidas.	91
Figura 27. Efectos principales de la inhibición bacteriana en las dos especies de <i>Bacillus</i>	94

Figura 28. Bactericidas sobre el crecimiento bacteriano de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus stearothermophilus</i>	95
Figura 29. Interacción del crecimiento micelial de <i>Phytophthora capsici</i> con las dos especies de <i>Bacillus</i>	98
Figura 30. Efectos principales del crecimiento micelial de <i>Phytophthora capsici</i>	99
Figura 31. Bioensayo <i>in vitro</i> del efecto de las dos especies de <i>Bacillus</i> sobre <i>Phytophthora capsici</i>	100
Figura 32. Interacción del crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> con las dos especies de <i>Bacillus</i>	102
Figura 33. Efectos principales del crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> ..	103
Figura 34. Efecto de las dos especies de <i>Bacillus</i> sobre <i>Fusarium oxysporum</i>	104
Figura 35. Interacción del crecimiento micelial de <i>Pythium aphanidermatum</i> con las dos especies de <i>Bacillus</i>	106
Figura 36. Efectos principales del crecimiento micelial de <i>Pythium aphanidermatum</i>	107
Figura 37. Efecto de la inhibición de los <i>Bacillus</i> sobre <i>Pythium aphanidermatum</i>	108
Figura 38. Interacción del crecimiento micelial de <i>Rhizoctonia solani</i> , con las dos especies de <i>Bacillus</i>	110
Figura 39. Efectos principales del crecimiento micelial de <i>Rhizoctonia solani</i>	111
Figura 40. Bioensayo <i>in vitro</i> del efecto de los <i>Bacillus</i> sobre el crecimiento micelial de <i>R. solani</i>	112
Figura 41. Porcentaje de viabilidad de productos bioplaguicidas a base de <i>Trichoderma</i> spp más utilizados en el método de control biológico	115
Figura 42. Porcentaje de viabilidad de productos bioplaguicidas a base de bacterias antagonistas más utilizados en el método de control biológico	117

RESUMEN

Sinaloa es el principal estado productor de tomate a nivel nacional debido a su volumen de exportación a los mercados de Norteamérica, además de ser un producto especialmente demandado por las características de sabor, presentación, calidad y larga vida de anaquel. Sin embargo, esta hortaliza es afectada fuertemente por hongos y bacterias fitopatógenas provocando fuertes pérdidas económicas en la producción. Para su control se utilizan fungicidas y bactericidas, requiriendo al menos 2 ó 3 aplicaciones por semana. Estos plaguicidas no solo interfieren con las reacciones bioquímicas y fisiológicas de los patógenos, si no también en actividad de otros microorganismos del suelo no patógenos como lo son microorganismos del género *Trichoderma* y *Bacillus*, los cuales son aplicados como agentes biocontroladores de hongos fitopatógenos del sistema radicular en las plantas. Debido a esta problemática, Se evaluó in vitro el efecto de los fungicidas comerciales Busan 30 W (TCMTB), Caption (Captan), Benlate (Benomil), Ridomil (Metalaxyl) y Bavistin (Carbendazim) y los bactericidas Agrygent plus (sulfato de gentamicina + clorhidrato de oxitetraciclina), Cuprimicin 100 (Sulfato de estreptomycin + Clorhidrato de oxitetraciclina), Cuprimicin 500 (Sulfato de estreptomycin + Clorhidrato de oxitetraciclina + sulfato tribásico de cobre), Ko-Hydro (Hidróxido cúprico) y Kasumin (Kasugamicina), sobre el desarrollo de tres biofungicidas comerciales a base de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma lignorum*, *Bacillus subtilis*, además de una cepa obtenida del laboratorio de Fitopatología del CIAD identificada como *Bacillus stearothermophilus*.

inhibición de las dos especies de *Bacillus* sobre cuatro hongos filopatógenos y el porcentaje de viabilidad de los biofilms. Los resultados mostraron que el único fungicida que no inhibió el crecimiento de las dos especies de *Bacillus* (*B. subtilis* y *B. pumilus*), el cual presentó un crecimiento relativo de 88% y 64%, respectivamente. A las 96 hrs, los tratamientos correspondientes a TCNTB y Captan, probablemente se habían degradado completamente en el medio de cultivo, por lo que las dos especies (*B. subtilis* y *B. pumilus*) crecieron, mostrando estos fungicidas un efecto fungistático en los antagonistas. Por las dos especies de *Bacillus*, el TCMTI y Captan fueron los únicos fungicidas que inhibieron el crecimiento de los bactericidas, solo Kasurnin no inhibió el crecimiento de estos antagonistas, presentándose un crecimiento bacteriano. El hidróxido de cobre y la mezcla de oxitetraciclina + streptomycin + sulfato tribásico de cobre y Clotrimazol 500, fueron los que más inhibición presentaron. Las dos especies de *Bacillus* estudiadas no inhibieron el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*, el cual presentó 100% de crecimiento medio, pero si el resto de los fitopatógenos. En porcentaje de viabilidad, se observó que el producto T-2 fue el único que cumplió con las dosis establecidas en la etiqueta del producto, el resto de los biofilms comerciales no cumple con la concentración de propágulos requerida, en la etiqueta y en algunos de los productos, la cantidad de propágulos viables es casi nula.

I. INTRODUCCIÓN

La calidad de los productos hortícolas producidos en México es reconocida a nivel internacional. Esto ha permitido que México exporte estos productos a los mercados de la Unión Americana, Canada, Europa y Asia, donde el tomate sobresale históricamente dentro de otras hortalizas como el de mayor importancia, debido a su volumen de exportación a los mercados de Norteamérica y a su gran demanda, especialmente por las características de sabor, presentación, calidad y larga vida de anaquel que los agricultores han sabido mantener en esta hortaliza. El cultivo de tomate es la hortaliza de mayor superficie sembrada en Sinaloa, sin embargo, también es una de las hortalizas que presentan mayor problema de enfermedades, principalmente ocasionadas por hongos y bacterias a nivel radicular ocasionándoles anualmente al productor agrícola importantes pérdidas económicas (Barretro, 1999).

Los plaguicidas tienen un papel clave en la agricultura moderna para el control de estas enfermedades. En la mayoría de los casos, los niveles de productividad y rentabilidad de un cultivo, sólo se pueden alcanzar mediante la aplicación intensiva de diferentes productos químicos, como son los fungicidas y bactericidas (Yanggen *et al.*, 2003). Sin embargo, el uso indebido de estos productos implica un riesgo para la salud de los agricultores que los aplican, para los consumidores de los productos agrícolas y el medio ambiente. Uno de las principales efectos nocivos que han provocado en el suelo las constantes aplicaciones de fungicidas y bactericidas, es el crear ambientes inhabitables para otro tipo de microorganismos presentes en la rizosfera, los cuales actúan de manera

benéfica eliminando aquellos que dañan al sistema radicular de las plantas (Seminario Internacional conjunto JICA – INTA, 2004).

Por ello, es importante que los riesgos asociados con el uso de fungicidas y bactericidas, sean estimados y evaluados minuciosamente para autorizar si son recomendados para su aplicación al suelo, sin dañar a otros microorganismos que ayuden a la eliminación de fitopatógenos.

Las intervenciones en la política agrícola para proteger el medio ambiente utilizando estrategias de control biológico, mediante aplicaciones al suelo de productos biofungicidas a base de microorganismos antagonistas, pueden ser implementadas por medio de regulaciones basadas en valores máximos permitidos en cuanto a la cantidad de fungicidas y bactericidas presentes en el medio ambiente, que el sector agrícola debe cumplir.

Estos valores máximos deben tener como fundamento investigaciones que permitan determinar el nivel de concentraciones que pueden ser toleradas por los microorganismos y por el medio ambiente, sin que éstas causen riesgos mayores. Debido a este tipo de problemática, se realizó la presente investigación con los siguientes objetivos.

II. OBJETIVO GENERAL

Determinar la compatibilidad de fungicidas y bactericidas con microorganismos antagonistas y sus efectos sobre hongos fitopatógenos radiculares de tomate

III. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Evaluar *in vitro* la compatibilidad de los biofungicidas a base de *T. harzianum* (T-22), *T. lignorum* (Biotrol), *Bacillus subtilis* (Biologic) y una cepa de *B. stearothersophilus* con cinco fungicidas (Captan, Benomil, Carbendazim, TCMTB y Metalaxyl).

- ❖ Evaluar *in vitro* la compatibilidad de los biofungicidas a base de *T. harzianum* (T-22), *T. lignorum* (Biotrol), *Bacillus subtilis* (Biologic) y una cepa de *B. stearothersophilus* con cinco bactericidas Ko-Hydro (Hidróxido cúprico), Kasumin (Kasugamicina), Cuprimicin 100 (Sulfato de estreptomycin + clorhidrato de oxitetraciclina), Cuprimicin 500 (Sulfato de estreptomycin + clorhidrato de oxitetraciclina + sulfato tribásico de cobre) y Agrygent plus (sulfato de gentamicina + clorhidrato de oxitetraciclina).

- ❖ Determinar si existe la misma actividad biocontroladora en *B. stearothermophilus* y *Bacillus subtilis* (Biologic) contra los hongos fitopatógenos: *Phytophthora capsici*, *Pythium aphanidermatum*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*.

- ❖ Conocer la efectividad biológica de los fungicidas Captan, Benomil, Carbendazim TCMTB y Metalaxyl para el control de los hongos fitopatógenos: *Phytophthora capsici*, *Pythium aphanidermatum*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*.

- ❖ Validar la calidad de biofungicidas comerciales más utilizados a base de *Trichoderma harzianum* (T-22, Trichodef, Lithan y Tricho-sin), *Trichoderma lignorum* (Biotrol) y *Bacillus subtilis* (Probacil, Biopack, Biologic y Macrobe plus).

IV. HIPÓTESIS

- 1) Los biofungicidas a base de *Trichoderma* spp y *Bacillus* spp muestran compatibilidad con los fungicidas químicos utilizados en el control de fitopatógenos.
- 2) Los biofungicidas a base de *Trichoderma* spp y *Bacillus* spp muestran compatibilidad con los bactericidas químicos utilizados en el control de fitopatógenos.
- 3) *Bacillus subtilis* y *Bacillus stearothermophilus* muestran el mismo efecto de inhibición micelial sobre *Phytophthora capsici*, *Pythium aphanidermatum*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*.
- 4) Los fungicidas controlan eficazmente a los hongos fitopatógenos; *Phytophthora capsici*, *Pythium aphanidermatum*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*.
- 5) Los biofungicidas a base de *Trichoderma harzianum* (T-22, Trichodef, Lithan y Tricho-sin), *Trichoderma lignorum* (Biotrol) y *Bacillus subtilis* (Probacil, Biopack, Biologic y Macrobe plus) no presentan el porcentaje de viabilidad señalada en la etiqueta del producto comercial.

V. META

Generar información que conjunte el uso de productos químicos con productos biocontroladores, dentro del Manejo Integrado de Enfermedades.

VI. REVISIÓN DE LITERATURA

6.1. Las hortalizas en México

México es un país apto para la explotación de un gran número de especies hortícolas (García y Osorio, 2000), ya que cuenta con una superficie destinada a su cultivo de aproximadamente 386,000 ha que incluyen los ciclos de riego y temporal, destacando como principales estados productores; Sinaloa, Guanajuato, Baja California, Veracruz, Michoacán, Tamaulipas, Morelos, Nayarit, Jalisco, Colima y Guerrero. Las hortalizas más importantes desde el punto de vista de producción son: papa, tomate, chile, calabaza, pepino, brócoli, col, elote, zanahoria y cebolla (Rodríguez, 2000). Esta situación favorece la entrada de divisas al país y una gran oferta de trabajo. Por lo antes señalado, nuestro país tiene una participación del 98% de las exportaciones realizadas a Estados Unidos (Barreto, 1999).

6.1.1. El cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill)

El cultivo de tomate en México sobresale históricamente de entre otros productos, debido a su volumen de exportación a los mercados de Norteamérica, siendo especialmente demandado por las características de sabor, presentación, calidad y larga vida de anaquel (Barreto, 1999). Esta hortaliza es una de las más importantes en el estado de Sinaloa debido a su volumen, valor de producción y superficie de siembra. Durante el ciclo 2004-2005 se sembró una superficie de 25, 729 ha de tomate, de las

cuales se obtuvo una producción de 317,536 toneladas (SIAP, 2005), colocándolo como el principal estado productor de este cultivo a nivel nacional y así mismo el principal producto hortícola de exportación y el sostén principal de la estructura productiva y comercial de este sector (Stanley y Geralson, 1991).

6.1.2. Problemas fitopatológicos del tomate

Todos los cultivos agrícolas son hospedantes de un amplio rango de organismos que en su mayoría les causan efectos adversos en su desarrollo, induciendo severos daños económicos. Dentro de estos organismos se encuentran las plagas, enfermedades y malezas principalmente. Estos microorganismos provocan anualmente hasta un 30% de pérdidas en la producción, sin considerar las pérdidas en la calidad, ni el costo de las medidas de control. De este total, el 10% corresponde a pérdidas por fitopatógenos y de dicho porcentaje, el 6.5% a enfermedades fungosas y bacterianas. En el caso de tomate, debido a sus grandes extensiones de siembra, se ha generado una gran proliferación de problemas fitosanitarios, destacando la presencia de enfermedades radiculares, que han llegado a alcanzar grandes pérdidas económicas en esta hortaliza (Mendoza, 2000).

6.1.3. Fitopatógenos radiculares en tomate

El buen estado sanitario del sistema radicular, es quizás el factor más importante en el estado general de una planta. Las enfermedades de la raíz son uno de los problemas más graves, las cuales son causadas principalmente por hongos fitopatógenos que habitan en la rizósfera. Al presentarse las condiciones favorables para ellos, atacan el sistema

radicular, pudiendo subsistir largos periodos como saprófitos sobre material vegetal muerto (López y Gallo, 2000). Esto es debido a que las raíces producen exudados tales como aminoácidos y azúcares, que sirven al microorganismo patógeno como fuente de alimento y éstos provocan a la planta deficiencias en la obtención de agua y nutrientes, debido a inducción de anomalías en la morfología y/o fisiología de la raíz (Neher, 1999)

En el estado de Sinaloa, durante los últimos 25 años, se ha demostrado que el tomate es afectado por más de 35 enfermedades, que afectan tanto la calidad como la cantidad de producción. De estas enfermedades, 24 son causadas por hongos y con frecuencia reducen la producción y/o calidad en un 20%. Algunas de las principales especies de hongos fitopatógenos que atacan el sistema radicular en tomate son; *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Phytophthora capsici*, *Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani*, entre otros (Sánchez *et al.* 1996).

6.2. Control químico

El control químico es uno de los métodos más utilizados actualmente, el cual se realiza a través del uso de plaguicidas, dentro de los que se encuentran; herbicidas, fungicidas, insecticidas, nematocidas, moluscocidas, acaricidas, entre otros. Dichos químicos pueden ser sustancias de origen natural o sintéticas, y son utilizados para proteger a las plantas contra la invasión de plagas y enfermedades (Mendoza, 2000).

6.2.1. Los fungicidas

Un fungicida es un compuesto tóxico que inhibe la germinación, crecimiento o multiplicación de un hongo; varían en su origen modo de acción y en su espectro de acción (Mendoza, 2000). En el caso de los fungicidas, se menciona que alrededor de doscientos tipos de hongos son patógenos importantes de los cultivos y de éstos, unos diez tipos consumen la mayor parte de los fungicidas utilizados en todo el mundo. En México, hasta 1998, se registraron para su uso 97 ingredientes activos con actividad fungicida y/o bactericida, los cuales representaron el 25.86% del total de plaguicidas; y el número de registros hasta esa fecha fue de 392 para fungicidas de uso agrícola (Mendoza, 2000).

La evolución del gasto en fungicidas sigue en los últimos años una tendencia claramente ascendente, provocando una gran derrama económica (San *et al.*, 2002). En primer lugar se encuentra el sector hortícola, con casi el 40% del gasto total en fungicidas, siendo los cultivos más importantes tomate, cucurbitáceas y papa. En 1996 el gasto en fungicidas alcanzó cerca de los 120, 2 millones de pesos, representando más del 20% del gasto total fitosanitario (Barreto, 2001).

6.2.1.1. Sitios de la acción fungicida. La toxicidad de un fungicida se debe a la interferencia sobre un proceso enzimático indispensable. Los fungicidas selectivos no fitotóxicos actúan sobre los sistemas enzimáticos del hongo patógeno y no sobre la de las plantas huésped (Prakasam, 1998). Algunas de los mecanismos de acción se mencionan a continuación:

- 1) Alteran la estructura celular por una acción físico-química selectiva sobre la membrana de los hongos.
- 2) Inhiben los procesos enzimáticos relacionados con el metabolismo energético, sobre todo la producción de ATP.
- 3) Bloquean el punto inicial del metabolismo (la oxidación del piruvato y la fosforilación oxidativa del adenosin difosfato (ADP)).
- 4) Inhiben las enzimas pépticas de los hongos.
- 5) Inhiben la biosíntesis de algún metabolito indispensable para el desarrollo del hongo.
- 6) Inhiben la síntesis de ácidos nucleicos.

6.2.1.2. Clasificación de los fungicidas. Existen dos principales tipos de fungicidas:

1) los preventivos, los cuales no atraviesan la cutícula de la planta y no son translocados dentro de ella y 2) los fungicidas sistémicos, que son absorbidos por la planta a través de la raíz, hojas o semillas, y son transpuestos en el interior de la planta (Prakasam, 1998).

6.2.1.3. Fungicidas sistémicos. Desde 1960 se ha dado un desarrollo sustancial en fungicidas sistémicos. Estos compuestos son capaces de traslocarse libremente después de penetrar a la planta. Un fungicida sistémico se define como compuesto fungi-tóxico que controla a un hongo patógeno removiéndolo de su punto de aplicación y que puede ser detectado e identificado, pudiendo erradicar una infección establecida y proteger las nuevas partes de la planta (Prakasam, 1998).

6.2.1.4. Principales fungicidas sistémicos derivados del benzimidazol. Los químicos de este grupo presentan una amplia actividad contra una gran variedad de hongos, demostrando de esta forma que no son efectivos contra bacterias. Se conocen dos tipos de fungicidas que derivan de los benzimidazoles. El primer tipo incluye fungicidas como: tiabendazoles y fuberidazole. El segundo tipo es metil-2-benzimidazol carbamato (MBC). Los fungicidas de este grupo pueden ser simples, tales como Carbendazim o complejos como Benomil, los cuales son muy utilizados actualmente en la agricultura (Prakasam, 1998). Su modo de acción es por inhibición de la formación de los polímeros de la beta-tubulina utilizados por la célula durante la división nuclear, otros autores mencionan que son inhibidores de la síntesis del ergosterol (principal componente de la membrana celular de los hongos), el cual provee estabilidad estructural, permeabilidad selectiva a compuestos químicos, y fluidez a la membrana citoplasmática (Agrios, 2001).

6.2.1.4.1. Benomil. El Benomilo o Benlate (1-(metilcarbamoil)-2-benzimidazolcarbamato de metilo) es un producto sólido, blanco, insoluble en agua y soluble en disolventes orgánicos. Es un fungicida de amplio espectro y erradicante que tiene acción sistémica. Su toxicidad es muy baja. $DL_{50} = 9600$ mg/Kg. Cuando Benomil se descompone se transforma a un metabolito relativamente estable llamado carbendazim (metil 2- benzimidazolcarbamato), el cual tiene aproximadamente el mismo orden de toxicidad que Benomil. El Benomil tiene una vida media de dos meses, su solubilidad en agua es de 2 mg/L a pH de 9 y 3.6 mg/L a pH de 5 y al estar presente en el suelo, este perdura de seis a once meses (Siepmann y Bruhn, 1999).

6.2.1.4.2. Carbendazim. Carbendazim (Metil (1H-benzimidazol-2-yl) carbamato) es un polvo blanco cristalino, esencialmente insoluble en agua, estable en pH de 7 y a 25°C, es un fungicida de amplio espectro, su estabilidad en la planta es durante varias semanas, tiene poco efecto sobre la actividad microbiana del suelo. La toxicidad de Carbendazim a través de ingestión es baja, la DL_{50} en ratas es de 10,000 mg/kg. Carbendazim inhibe el desarrollo del hongo al interferir con la división celular (Minta *et al.*, 2004).

6.2.1.5. Fungicidas sistémicos derivados de las fenilaminas. Son fungicidas selectivos usados para controlar específicamente a fitopatógenos como *Pythium* spp y *Phytophthora* spp. Estos fungicidas inhiben el crecimiento de los hongos oomicetes por la alteración de la síntesis de ARN polimerasa (Damicone, 1990).

6.2.1.5.1. Metalaxyl. Metalaxyl-M (metil N- (2,6-dimetilfenil)-N-(metoxiacetil)-D-alaninato), fue el primer fungicida de este grupo y se introdujo al mercado bajo varias formulaciones, una de ellas es Ridomil Gold (Demanou *et al.*, 2004). También es conocido por ser un fungicida sistémico y puede ser aplicado a nivel foliar, semilla y suelo. Su DL₅₀ es de 669 mg/kg. Estos fungicidas crearon una gran expectativa por su acción post-infeccional y actividad sobresaliente bajo condiciones muy favorables para la enfermedad. Metalaxyl tiene efecto en la germinación del esporangio o de las zoosporas, así como en la movilidad de las zoosporas y ejerce su efecto fungitóxico solo en el interior de la planta. Estos tipos de fungicidas inhiben severamente la esporulación y en menor grado el desarrollo micelial interfiriendo en la síntesis de ARN e inhibiendo a la enzima ARN polimerasa. La mejor redistribución y la mayor persistencia de las fenilamidas en las plantas se logran en las plantas jóvenes y en crecimiento activo (Fernández, 1999).

6.2.1.6. Fungicidas preventivos. También llamados de contacto, actúan principalmente como fungistáticos inhibiendo la germinación de esporas, pueden aplicarse sobre las hojas, o recubriendo las semillas para protegerlas del ataque de los hongos patógenos. En general, no curan una infección establecida. Los fungicidas preventivos no penetran apreciablemente la cutícula de la planta y no son transpuestos dentro de ella (Butzen *et al.*, 2005).

6.2.1.7. Fungicidas preventivos derivados de las ftalimidas. La estructura típica de las ftalimidas es un anillo de benceno condensado con un heterociclo con nitrógeno, en el que hay dos grupos cetona. Uno de los tipos de ftalimidas son: las alquilmercaptoftalimidas, dentro de este grupo se encuentra el captan (López, 1998).

6.2.1.7.1. Captan. El Captan (*N*-(triclorometilíto) ciclohex-4-ene-1,2-dicarboximida), es un compuesto carboximida sólido e insoluble en agua. Es usado como protector o erradicante en hortalizas, ornamentales y tratamiento a la semilla. Tiene gran actividad contra un gran número de hongos patógenos que atacan a diversos cultivos frutales y hortícolas. Sin efecto fitotóxico. Es menos persistente y una cualidad interesante es que no mancha los frutos y no tiene efectos secundarios que afecten a la calidad de la cosecha. Tiene baja toxicidad para mamíferos. DL_{50} es de 15000 mg/kg. La solubilidad en agua es de 5.1 mg/L a temperatura de 20 a 25°C, además tiene bajo potencial de lixiviación y se degrada rápidamente en el suelo con una vida media de uno a diez días en suelos húmedos (Siepmann, 1999). El modo de acción de captan es que inhibe el proceso de respiración de numerosas especies de hongos y bacterias (NPIC, 2002).

6.2.1.8. TCMTB. El TCMTB (2-(tiocianometilíto) benzotiazol), es un fungicida-bactericida utilizado en la aplicación al suelo y semilla, su DL_{50} es de 1590 mg/kg, largo efecto protector, amplio espectro de contacto y con cierta acción fungistática, reducción del ataque de hongos y algunas bacterias de suelo. Efectivo para prevenir y controlar los principales hongos fitopatógenos que se encuentran en el suelo y que afectan los

cultivos, provocando serias enfermedades que ocasionan pudrición o la secadera (Damping off) de las plantas como: *Fusarium* spp, *Phytophthora* spp, *Verticillium* spp, *Rhizoctonia* spp, *Pythium* spp y *Sclerotium cepivorum*. Otros microorganismos sobre los cuales el TCMFB también es efectivo son: *Xanthomonas* spp, *Sclerotinia* spp y *Pseudomonas* (Rosenstein, 2005).

6.2.2. Antibióticos o bactericidas

El término *antibiótico* significa “*destructor de vida*” y es una sustancia sintetizada por un organismo apta para inhibir el desarrollo de otro organismo, aún a bajas concentraciones. Tiene amplia especificidad de acción contra los fitopatógenos, es de baja fitotoxicidad, su absorción es a través del follaje y la traslocación sistémica. El uso de antibióticos ha tenido un uso muy eficiente en el manejo de varias enfermedades en las plantas, particularmente en el caso de enfermedades causadas por bacterias fitopatógenas. Sin embargo son pocos los bactericidas que están disponibles, tal es el caso de compuestos a base de cobre y antibióticos tales como estreptomycinas, oxitetraciclinas y gentamicinas (Wilson y Lindow, 1993).

6.2.2.1. Hidróxido de cobre Cu (OH). En los compuestos de cobre “fijos” o “insolubles”, solo el ion cobre es ligeramente soluble, por lo tanto son menos fitotóxicos que la mezcla del caldo bordelés, pero también menos efectivos como fungicidas (Agrios, 2001). Cualquiera que sea el producto utilizado, la acción fúngica se debe al metal cobre, según la teoría clásica aceptada, el cobre actúa provocando la coagulación

del protoplasma celular, lo que da lugar a la muerte de las esporas en los hongos y las células bacterianas (Irwin, 1997).

El sulfato tribásico de cobre es utilizado con restricción en los sistemas de cultivo para el control de enfermedades en las plantas, de manera que se minimice la acumulación de cobre en el suelo. También es utilizado como micronutriente (USDA, 2001).

6.2.2.2. Estreptomícina. La estreptomícina es un antibiótico perteneciente al grupo de los aminoglucósidos y fue aislado de cepas de *Streptomyces griseus* en 1944, por Waksman y colaboradores, convirtiéndose en el primer aminoglucósido disponible en el mercado. Este grupo de antibióticos actúan contra un amplio rango de fitobacterias y es usado a concentraciones de 100 a 500 ppm. La mezcla con oxitetraciclina le confiere un sinergismo que garantiza un mejor control de todo tipo de bacterias fitopatógenicas. Algunos de los productos comerciales a base de estreptomícina y oxitetraciclina que son muy utilizados en las hortalizas son: Cuprimicin 100, Agrimicin 100 e Intremicin 100. El Cuprimicin 500, Agrimicin 500 e Intermicin 500, son una combinación de los antibióticos antes mencionados más sulfato tribásico de cobre, el cual controla enfermedades fúngicas y bacterianas (Brugueras y Morejón, 1998).

6.2.2.3. Oxitetraciclina. A finales de la década de los años cuarenta y como resultado de la necesidad de nuevos y potentes antibióticos, se desarrollaron las primeras tetraciclinas obtenidas a partir de microorganismos del género *Streptomyces* presentes en muestras de suelos recogidos en diferentes partes del mundo. En el año de 1948 aparece el primero de estos compuestos, la clortetraciclina, y se da a conocer 2 años más tarde la oxitetraciclina, la cual se aisló del producto *Streptomyces rimosus* en 1950. Este antibiótico es similar en su fórmula a la clortetraciclina $C_{22}H_{24}N_2O_9H_2O$ (Rodríguez, 1998).

A pesar de que pueden establecerse diferencias específicas (origen y estructura química) entre las tetraciclinas, sus características generales como el mecanismo de acción, espectro, y otras, permite describirlas como un solo grupo. Las tetraciclinas inhiben la síntesis de proteínas y son bacteriostáticas para muchas bacterias gram + y gram -. Actúan a nivel del ribosoma bacteriano, pero para que las mismas tengan acceso a los ribosomas es necesario su difusión pasiva por la membrana celular exterior a través de los poros hidrófilos (Rodríguez, 1998).

6.2.2.4. Gentamicina. La gentamicina es otro antibiótico de tipo aminoglucósido y es una partícula empleada recientemente en la agricultura, que a diferencia de otros antibióticos, dada su estructura molecular, no presenta resistencia al ser utilizada frecuentemente. Debido a lo anterior, prácticamente todas las cepas bacterianas son sensibles a ella. Es usada en la agricultura desde hace 10 años, pero se ha constituido

como uno de los productos líderes en el mercado, ahora con el nombre comercial de AgryGent Plus 800, el cual es una mezcla de Sulfato de gentamicina más clorhidrato de oxitetraciclina. Este antibiótico es de tipo sistémico y de contacto, capaz de prevenir y controlar bacterias fitopatógenas que atacan cultivos de importancia económica. Su acción es bloquear e inhibir la biosíntesis de proteínas que son precursoras de enzimas bacterianas que degradan los tejidos vegetales. La gentamicina tiene gran estabilidad y no es afectada por altas temperaturas en su aplicación. Su excelente actividad sistémica, le permite penetrar rápidamente en el cultivo a los sitios de acción de las bacterias, transportándose activamente a través de la membrana de la célula bacteriana inhibiendo la síntesis de proteínas (Brugueras y Morejón, 1998).

6.2.2.5. Kasugamicina. La Kasugamicina (S-amino-2metil)-6-(2,3,4,5,6,-pentahidroxiciclohexiloxi) tetrahydro-piran-3-yl) amino- α -acido-iminoacetico), es producida por *Streptomyces kasugaensis*, aislada por primera vez de una muestra de suelo de los alrededores del templo de Kasuga, en la ciudad de Nara antigua capital de Japón. Actualmente se comercializa un producto llamado Kasumin a base de este microorganismo, el cual es de acción fungicida-bactericida. Tiene una fuerte efectividad preventiva y curativa contra enfermedades fungosas y bacterianas a dosis bajas y no pierde su efectividad debido a su acción sistemática y translocativa dentro de los tejidos de las plantas después del tratamiento. La kasugamicina inhibe la incorporación de los

aminoácidos a la síntesis de las proteínas en bacterias y hongos impidiendo la unión del complejo *f* met-RNAF a la subunidad RNA-30S del ribosoma (Agrios, 2001).

6.3. Control biológico de hongos

En la actualidad se requiere manejar las hortalizas desde un punto de vista sustentable (Ocampo *et al.*, 2001). Una alternativa que permite disminuir la cantidad de agroquímicos utilizados para la producción de hortalizas es el método de control biológico, el cual consiste en la utilización de microorganismos antagonistas que tienen un efecto de inhibición sobre el patógeno de plantas en el suelo, entre ellos: *Pythium* spp, *Phytophthora* spp, *Fusarium* spp, *Rhizoctonia* spp, *Sclerotium* spp, *Sclerotinia* spp, etc. (Wafaa y Haggag, 2002; Raaijmakers, 2002). Esta alternativa además de contribuir a bajar costos, permite la producción sin un grave deterioro del ecosistema, manteniendo adecuadamente los recursos naturales (Sandoval, 2004).

Los biocontroladores son selectivos y no dañan los tejidos de la planta, las cuales se relacionan con células metabólicamente activas de las raíces y depositan el 20% de carbono que es alojado en las raíces (Handesman, 1996). Cuando las raíces son colonizadas por los microorganismos, estos viven en células epidérmicas muertas y pelos radiculares y se alimentan de metabolitos excretados por las raíces tales como; asimilatos y aminoácidos (Killian *et al.*, 2000).

En la agricultura intensiva de México, el control biológico depende en gran parte del uso de pesticidas, ya que por sí solo no elimina por completo a los microorganismos fitopatógenos; sin embargo, el uso indiscriminado de estos plaguicidas ha ocasionado la contaminación de suelos y mantos freáticos (Zavaleta, 2000). Además la variabilidad genética de los microorganismos es tal que eventualmente surgen organismos resistentes, lo que trae como consecuencia un incremento en las dosis o bien el desarrollo o evaluación de nuevos plaguicidas (UNPH, 2002). Es por ello que la mayoría de los microorganismos antagonistas no muestran efectos consistentes de biocontrol, por lo tanto es necesario reducir la variabilidad y garantizar la persistencia de los antagonistas en el campo para convertir a los biocontroladores en una alternativa atractiva al uso de pesticidas químicos (Zavaleta, 2000).

6.4. Hongos y bacterias como antagonistas de fitopatógenos del suelo

Los productos comerciales para el control biológico de enfermedades están basados en aplicaciones prácticas de pocas especies competentes de la rizósfera como lo son bacterias y más de 10 especies de hongos (Viterbol *et al.*, 2002). Existe un grupo importante de hongos y bacterias que presentan efectos antagónicos a patógenos que atacan al sistema radicular de las plantas y esta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos vegetales. Entre los microorganismos más importantes se encuentran las bacterias del género *Bacillus* y hongos del género *Trichoderma*. Actualmente, estos son los microorganismos más utilizados para el control de un grupo importante de patógenos del suelo (Orietta y Larrea, 2001).

6.5. *Trichoderma* spp como agente de control biológico

Trichoderma es un tipo de hongo anaerobio facultativo que se encuentra naturalmente en un número importante de suelos agrícolas y otros tipos de medios, capaz de controlar a un gran número de patógenos (Sandoval, 2004). El uso de *Trichoderma* como agente de biocontrol es principalmente de uso preventivo, ya que si todavía no ha habido ataque, la planta está preparada y protegida para impedir la infección fúngica, y si ésta se ha producido ya, la acción de *Trichoderma* proporciona a la planta una ayuda fundamental para superar dicha infección, llegando en algunos casos a controlarla. El desarrollo del género *Trichoderma* spp se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, las cuales son colonizadas rápidamente por estos microorganismos (Benítez *et al.*, 2004).

6.5.1. Tipo de reproducción

La mayoría de las cepas de *Trichoderma* spp no poseen etapa sexual, por lo que se reproducen principalmente formando esporas asexuales. Sin embargo, se conoce la etapa sexual de unas pocas cepas, pero no han sido consideradas para propósitos de biocontrol. Cuando está presente la etapa sexual, se encuentra incluida en la clase ascomycetes, dentro de la cual sobresale el género *Hypocrea* (Cuadro 1). El crecimiento vegetativo de *Trichoderma* spp es en forma de hifas y la reproducción asexual ocurre vía producción de conidióforos y clamidosporas, la esporulación está influenciada por factores como: nutrición, pH y luz (Harman, 2000).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Trichoderma* spp

	Asexual (Conidial)	Sexual (Ascosporas)
Sub división	Deuteromicota	Ascomicotina
Clase:	Hypomycetes	Pirenomyces
Orden:	Moniliales	Sphaeriales
Familia:	Moniliaceae	Hypocreaceae
Género	<i>Trichoderma</i>	<i>Hypocrea</i>

6.5.2. Rango de hospederos

Diferentes cepas de *Trichoderma* pueden controlar a cada hongo patógeno para el cual se ha diseñado un programa de biocontrol. Sin embargo, la mayoría de las cepas de *Trichoderma* spp son más eficientes para controlar a ciertos patógenos, pudiendo ser ineficaces contra algunos hongos. Se ha descubierto recientemente que algunas cepas pueden inducir a las plantas para que "enciendan" su mecanismo nativo de defensa, esto hace pensar que se podrían controlar a otros patógenos a parte de los hongos. Generalmente, *Trichoderma* spp controla a los patógenos *Armillaria mellea*, *Phytophthora* spp, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Pythium* spp, *Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp y *Verticillium* spp entre otros (Hermosa *et al.*, 2000).

6.5.3. Biología

El hongo visto al microscopio parece un árbol pequeño, que produce esporas o conidias asexuales (3 a 5 μm de diámetro), las cuales son similares a semillas que aseguran la sobrevivencia del hongo en la próxima generación y lo que da la apariencia de algodón son ramificaciones del cuerpo del hongo llamado micelio compuesto por hifas, que van desde 5 a 10 μm de diámetro. *Trichoderma* produce en el micelio unos ensanchamientos que luego toman forma globosa u ovoide llamadas clamidosporas, las cuales son bastante tolerantes a condiciones ambientales adversas y son consideradas estructuras de sobrevivencia, ya que pueden perdurar a través del tiempo (Hermosa *et al.*, 2000).

La mayoría de las células poseen numerosos núcleos (heterocarióticas) y algunas células pueden llegar a tener más de 100. Varios factores genéticos asexuales, como la combinación parasexual, mutación y otros procesos contribuyen a la variación de este género. Especies de *Trichoderma*, ampliamente difundidas en la comunidad microbiana de los suelos y con marcadas propiedades antagonistas, poseen representantes caracterizados por su alta producción de sustancias gaseosas. Según algunos investigadores, lo que permite diferenciar a estas últimas especies es un aroma a coco que desprenden del cultivo (Hermosa *et al.*, 2000).

6.5.4. Mecanismo de acción

En general, los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de éstos es una característica importante para su selección como agentes de control biológico, ya que reduce los riesgos de desarrollo de resistencia en el patógeno. El efecto principal de las diferentes especies de *Trichoderma* es por micoparasitismo, aunque algunas especies pueden producir metabolitos bioactivos volátiles y no volátiles (ácido harziánico, alameticinas, tricholina, peptaiboles, antibióticos, 6-pentil-á-pirona, masoilactona, viridina, gliovirina, glisopreninas y ácidos heptelídicos), que incrementan su acción (Orrieta y Larrea, 2001). Además de la producción de antibióticos (Trichodermin, trichodermol, harzianum A y harzianolide), y/o enzimas hidrolíticas (quitinasas, glucanasa, proteasas, quitobiosidasas, hidrolasas, etc.), que están asociadas con la competencia por nutrientes en la rizósfera (Viterbo *et al.*, 2002; Kucuk, 2004). Recientemente, se han demostrado varios mecanismos con los cuales actúan las especies de *Trichoderma* como biocontrolador y como colonizador de las raíces (Monte, 2001).

6.5.4.1. Antibiosis. La antibiosis es la producción de sustancias tóxicas (metabolitos) o antibióticos por parte de un microorganismo reprimiendo la actividad de otros, los cuales actúan en bajas concentraciones (menores a 10 ppm). Muchos microorganismos tienen la capacidad de producir antibióticos en cultivos puros, lo cual es la evidencia más fuerte de la posible acción de este tipo de compuestos como mecanismo de ataque de *Trichoderma* bajo condiciones de campo. No obstante para este hongo en particular, la

producción de metabolitos está fuertemente ligada a la producción de enzimas propias del proceso de micoparasitismo (Mondino y Silvera, 2003).

6.5.4.2. Competencia por nutrientes y espacio. La competencia es el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. Un factor esencial para que exista competencia es que haya escasez de un elemento, si hay exceso no hay competencia. Las competencias más comunes entre las especies de *Trichoderma* y los demás microorganismos se dan por nutrientes, oxígeno y espacio (Mondino y Silvera, 2003).

6.5.4.3. Inducción de resistencia. Varias cepas de *Trichoderma* inducen resistencia sistémica en las plantas, dichas cepas se localizan en las raíces, probablemente por la acción de un compuesto inductor. Cuando los patógenos atacan las hojas o tallos de la planta, ésta responde rápidamente produciendo enzimas y compuestos antimicrobiales de defensa que están relacionadas con fragmentos de la pared celular de la hifa del patógeno, la cual aumenta la relación de enzimas adicionales. Dicha interacción se da antes de que los dos organismos entren en contacto (Figura 1). El siguiente paso es el parasitismo y la producción de enzimas degradadoras de la pared celular y otras sustancias, seguida de la muerte del hongo. Así en ausencia de patógenos o enfermedad y en la presencia de *Trichoderma*, las plantas tienen grandes raíces y altos niveles de productividad (Harman, 2004).

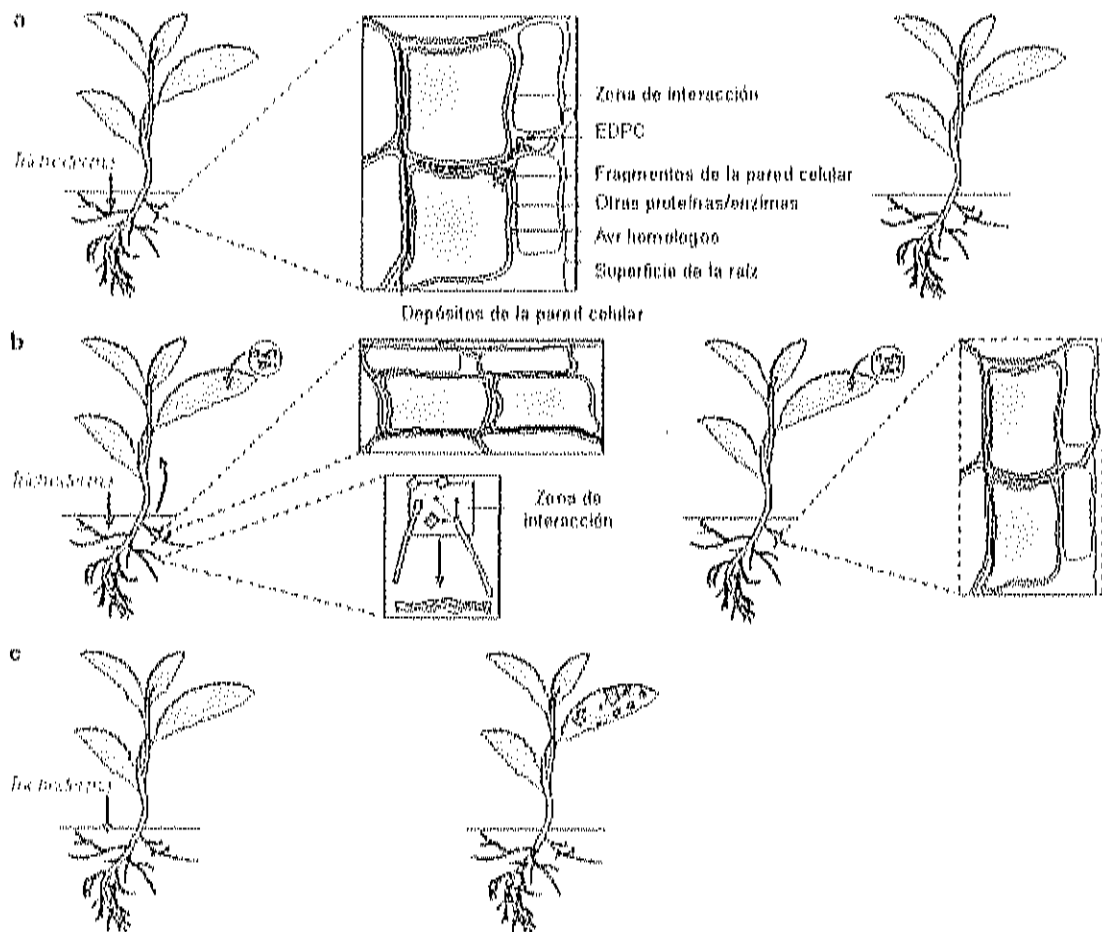


Figura 1. Inducción de resistencia en la planta por *Trichoderma* (Viterbol *et al.*, 2002).

6.5.4.4. Micoparasitismo. El primer paso para que se de el micoparasitismo es cuando *Trichoderma* detecta al hongo fitopatógeno y crece hacia él, disminuyendo parcialmente la expresión secuencial de las enzimas degradadoras de la pared celular. *Trichoderma* entra en contacto con el hongo, al cual se le enrolla y va formando apresorios en la superficie del hospedante realizando agujeros, y posteriormente entra directamente al lumen de dicho hongo para alimentarse de su contenido celular, el cual finalmente muere (Viterbol *et al.*, 2002).

6.5.5. Especies de *Trichoderma* utilizadas para el control biológico de hongos fitopatógenos.

El género agrupa a 33 especies de *Trichoderma* que se han identificado con el tiempo, sin embargo en la actualidad *T. harzianum* y *T. lignorum* son las dos especies que se han utilizado dentro de la alternativa de control biológico de fitopatógenos (Domsch *et al.*, 1980).

6.5.5.1. Características generales de *Trichoderma harzianum*. Esta especie, se caracteriza por formar conidias subglobosas y cortas, midiendo de 2.8 a 3.2 μm de diámetro, sin embargo su crecimiento es muy rápido, el cual llega a medir hasta 9 cm de diámetro en cinco días a 20°C. *T. harzianum* está presente en suelos con pH de 3.7 a 4.7, tolerando temperaturas de 15-35°C (Domsch *et al.*, 1980).

6.5.5.2. Características generales *Trichoderma lignorum*. Las conidias de *T. lignorum* son globosas y miden 3.6 a 4.5 μm . Las conidias del hongo llegan a medir de 4.5 a 7.5 cm en cinco días. *T. lignorum* se puede desarrollar en suelos con pH entre 3.1 y 8, aunque prefiere partes ácidas. La temperatura óptima para el crecimiento lineal en agar y producción de micelio es en el rango de 20 a 28°C (Domsch *et al.*, 1980).

6.6. *Bacillus* spp como agente de control biológico

Las bacterias son los microorganismos más abundantes en la rizosfera de la planta, con un promedio de 6×10^8 células/g de suelo y un peso de aproximadamente de 10,000 kg/ha (Olalde y Aguilera, 1998). La masa bacteriana es aproximadamente de 5% del total de peso seco orgánico de los suelos y tiene una gran habilidad para formar metabolitos antifúngicos pudiendo ser aisladas fácilmente de las muestras de suelo, estimándose que un 36% de las poblaciones de microorganismos del suelo pertenecen a bacterias. También se menciona que cerca de 30% de todas las bacterias aisladas de suelos, son capaces de producir zonas de inhibición antifúngicas *in vitro* y cerca del 3% de estos aislamientos pertenecen taxonómicamente al género *Bacillus* (Killian *et al.*, 2000).

Los principales objetivos de la aplicación de bacterias antagonistas al suelo incluyen realzar la asociación simbiótica o fijación de nitrógeno, degradación de compuestos xenobióticos, promover el crecimiento de la planta y como control biológico de microorganismos patógenos de plantas. Desde hace 20 años, numerosos estudios han demostrado inequívocamente que diversos metabolitos incluyendo antibióticos, enzimas y volátiles producidos por bacterias antagonistas, juegan un papel muy importante en el control de varios patógenos. Siendo consideradas las más eficaces para controlar enfermedades de la raíz, dada su diversidad genética (Raaijmakers *et al.*, 2002).

Los mecanismos de supresión de patógenos por la colonización bacteriana de la raíz se enfoca a su habilidad para producir compuestos específicos “sideróforos” que eficientemente atraen hierro privando al patógeno de su elemento esencial durante sus actividades deletéreas en la rizosfera (Handesman, 1996). *Bacillus subtilis* es la especie de *Bacillus* que ha tenido un mayor uso y efectos muy positivos en la eliminación de patógenos inductores de enfermedades radicales de las plantas en diferentes cultivos, principalmente tomate (Orienta y Larrea, 2001).

6.6.1. *Bacillus subtilis*

La palabra *Bacillus* es un término descriptivo debido a la apariencia de ciertas bacterias cuando se observan en un microscopio. Deriva el latín “bastón” y significa en forma de barra. *Bacillus subtilis* fue descubierto por primera vez en Australia en 1930. Es un microorganismo habitante del suelo, en forma de varilla, gram + y produce endosporas (o esporas). Se encuentra en los suelos de todo el mundo, y son mayormente activas en temperaturas de 7 y 45°C. Se establecen alrededor de las raíces alimentándose de azúcares y fuentes de carbono de células de raíces muertas (Bonacic, 2003).

Bacillus subtilis, en su fase vegetativa es móvil y es un organismo aerobio obligado (aunque en condiciones con medios de cultivos complejos que contienen glucosa, se desarrollan como anaerobios con crecimiento débil y puede ocurrir fermentación). Además en los medios de cultivo sólidos forma colonias que son opacas y pueden

arrugarse, su coloración va del crema al castaño. Se encuentra en el suelo descomponiendo material vegetal y no es patógeno (Bonacic, 2003).

6.6.1.1. Clasificación taxonómica de *Bacillus subtilis*

Reino: Monera (Bacteria)
División: III
Grupo: 15
Phylum: Firmicutes
Clase: Bacilli
Orden: Bacillales
Familia: Bacillaceae
Género: *Bacillus*
Especie: *subtilis*

6.6.1.2. Modo de acción de *Bacillus subtilis*. El antagonismo de *Bacillus subtilis*, se logra a través de diversos mecanismos como lo es la competencia por nutrientes; exclusión del sitio de acción; colonización de la bacteria en el patógeno y/o la liberación de componentes celulares durante el crecimiento. También se ha demostrado que induce la resistencia sistémica natural de la planta contra patógenos bacterianos y fungos, propiedad llamada como; Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) (Lisboa, 2003).

Bacillus subtilis libera compuestos con propiedades antifúngicas como la subtilina, iturina, bacilina, bacilomicen, subtenolina, micosubtilina, toximicina, bacitracina, surfactina, fengicina, plipastatina, entre otros. Estos son polipéptidos que actúan sobre la pared celular de los hongos (Moyné *et al.*, 2002). Estos compuestos pueden reaccionar y formar un complejo con las moléculas esteroides de la membrana celular de los fitopatógenos, donde se aumentan los canales de transporte de iones. La propiedad de permeabilidad de la membrana celular es alterada y los iones potasio se escapan rápidamente. Consecuentemente, se inhibe la germinación de las esporas o la propagación del patógeno (Rafai *et al.*, 2003).

6.6.1.3. Formación de endosporas en *Bacillus subtilis*. Este microorganismo produce dentro del citoplasma de la célula bacteriana, estructuras de resistencia llamadas endosporas, las cuales pueden sobrevivir en condiciones desfavorables tales como el calor o la sequía. Las esporas son metabólicamente inactivas (abióticas), pero bajo condiciones ambientales apropiadas pueden germinar y llegar a ser células vegetativas activas que crecen y se multiplican sin problemas (Figura 2). El proceso de esporulación en *Bacillus subtilis* tiene una duración media de 6 a 8 hrs y es un proceso secuencial de ocho etapas (Errington, 2003).

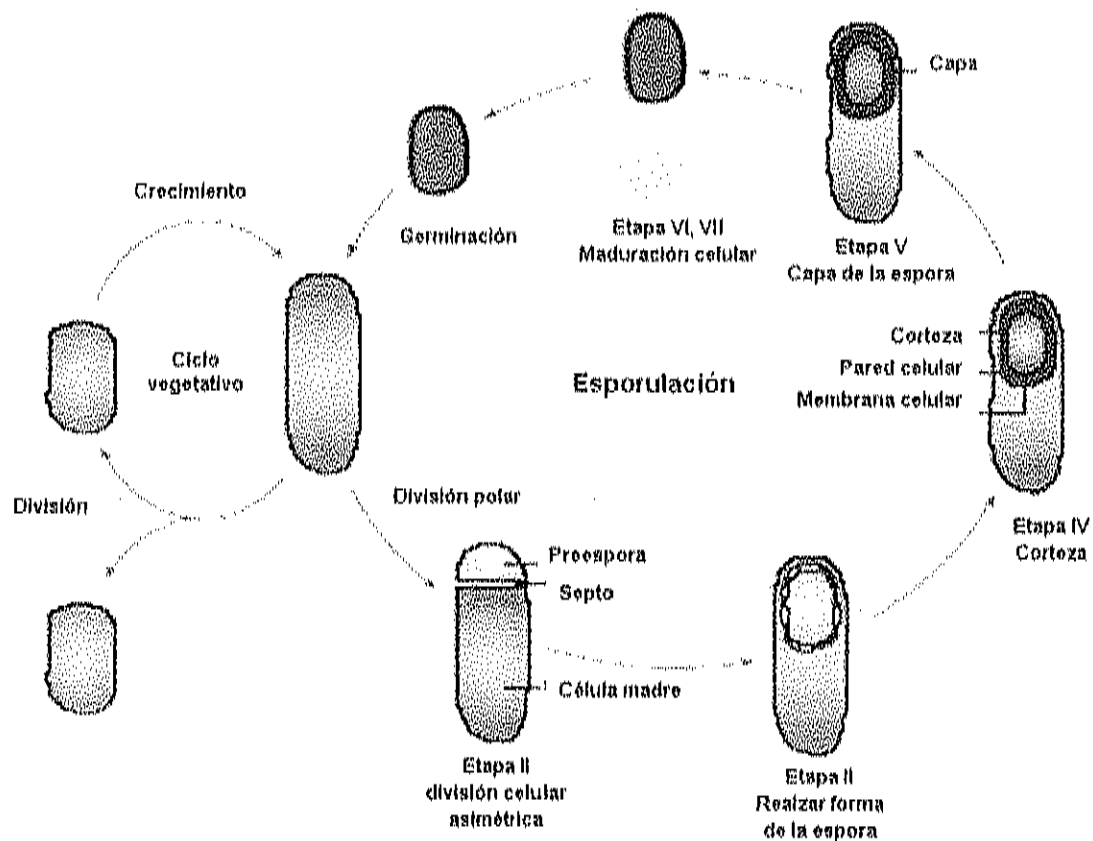


Figura 2. El ciclo de esporulación de *Bacillus subtilis* (Driks, 1999).

6.6.1.4. Morfología de la espora de *Bacillus subtilis*. La capa de la espora de *Bacillus* tiene secciones finas, las cuales confieren resistencia a diversos agentes fisicoquímicos, dicha capa está formada por treinta polipéptidos, los cuales están ensamblados dentro de la capa laminar interna (Zilhao *et al.*, 2004). El número y estructura de las capas difieren entre especies. *B. subtilis* tiene dos capas principales: la capa interior que tiene una apariencia membranosa, consistiendo principalmente de proteína, es laminar y ligeramente tejida, y tiene 75 nm de ancho. Y la capa exterior, que es más gruesa que la interior midiendo de 70 a 200 nm de ancho (Driks, 1999).

6.6.2. *Bacillus stearothermophilus*

La palabra *stearothermophilus* significa *stearos* (Grasa) + *thermo* (calor) + *philus* (amoroso), "bacteria amante al calor y grasa", es una bacteria obligadamente termofílica, gram + y sus células vegetativas son en forma de varillas, de cadenas cortas, y de tipo perfrítrica. Es una bacteria anaerobia facultativa. El rango en la temperatura del crecimiento es de 37 a 74°C, con un óptimo de 55 a 65°C, crece a pH de 6.0 a 8.5 con un óptimo de 6.2 a 7.5 (Zeigler, 2001). Esta especie de *Bacillus* también ha demostrado un efecto antagonista similar al de *Bacillus subtilis* en la inhibición de algunos fitopatógenos, y que actualmente se ha estado evaluando su acción sobre dichos fitopatógenos.

Bacillus stearothermophilus tiene la capacidad para crecer a altas temperaturas, debido a su habilidad para sintetizar constituyentes celulares, los cuales tienen gran estabilidad al calor, en comparación a los constituyentes sintetizados por los mesófilos. La característica del mecanismo molecular de la termofilia se relaciona más a la estabilidad de la membrana, demostrando que la resistencia al calor de un organismo está relacionada a la temperatura a la cual llegan a fundirse los lípidos celulares. Cuando el crecimiento de la temperatura de un termófilo se cambia de 37 a 55°C, el contenido lipídico de una célula vegetativa se incrementa a 34.1%. En este caso, los lípidos de la membrana de *B. stearothermophilus* están compuestos del 50% de 15 a 17 carbonos en la cadena de ácidos grasos (Bodman y Welker, 1969).

La pared celular de *Bacillus stearothermophilus* contiene glucosamina, ácido murámico, alanina, ácido α -diaminopimélico (Dap) ácido glutámico, ácido aspártico, glicina, y serina (Grant y Wicken, 1970).

6.6.2.1. Taxonomía de *Bacillus stearothermophilus*. *B. stearothermophilus* fue aislado por primera vez por Donk, el 3 de octubre de 1917 y fue este investigador quien asignó este nombre a dicho microorganismo, cuando hacía descripciones de numerosas bacterias. Durante los primeros años del siglo, cualquier organismo en forma de bastón que se identificaba era descrito como una especie de *Bacillus*. Sin embargo años más tarde Woese, haciendo estudios sobre esta especie de *Bacillus*, reconoció que la pequeña subunidad de rARN de este microorganismo era un valioso reloj molecular y dicha molécula estaba extremadamente conservada y observó que éste *Bacillus* era diferente a las demás bacterias quedando incierta su clasificación, para eso Ash y sus colaboradores realizaron estudios más profundos sobre las subunidades de rARN en 51 especies de *Bacillus* y encontraron que efectivamente eran diferentes, agrupándolas dentro de cinco distintas agrupaciones filogenéticas basadas en la secuencia de 16S rRNA, (Figura 3), quedando *B. stearothermophilus* en el grupo 5, en la cual creyeron claramente representar un género diferente, marcando el inicio de un periodo de reorganización para el género *Bacillus* (Zeigler, 2001).

Pasada una década, ante este nuevo taxon, se optó por encontrar un nuevo nombre que se distinguiera del género *Bacillus*. Fue así como Ash se dedicó a analizar una serie de secuencias en estos microorganismos. Sin embargo, Nazina y sus colaboradores, reconocidos científicos de Moscú, encontraron por coincidencia en sus experimentos la presencia de *B. stearothermophilus* creciendo de manera normal en ambientes de temperaturas de 55 a 74°C a los cuales sometían sus ensayos, por lo que les pareció interesante conocer más sobre dicho microorganismo, realizando exámenes polifásicos de este *Bacillus* y obtuvieron que este microorganismo pertenecía a un taxón filogenético, fisiológico y morfológicamente diferente al género *Bacillus*, por lo cual sometieron a validar el género descrito con el nombre de *Geobacillus*. Sin embargo, en la actualidad muchos investigadores lo siguen considerando dentro del género *Bacillus* (Zeigler, 2001).

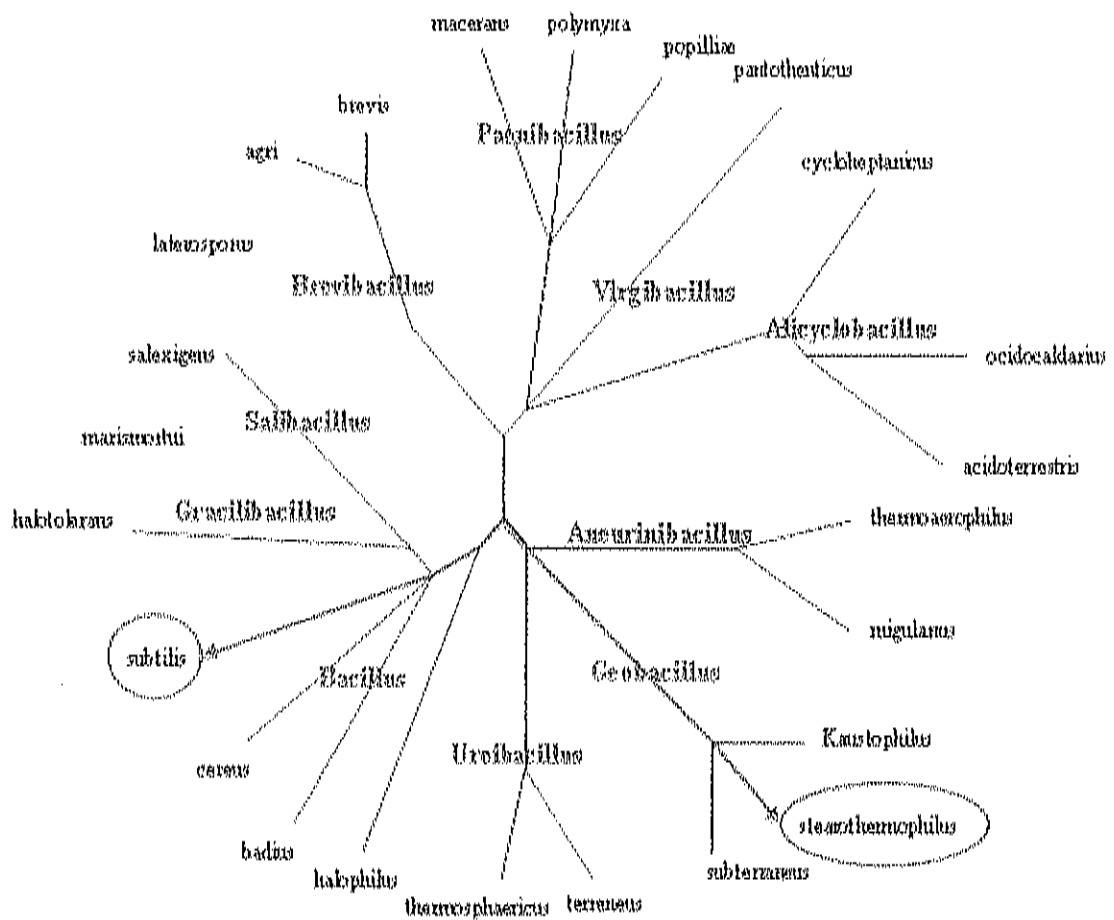


Figura 3. Árbol filogenético del género *Bacillus* y el nuevo género *Geobacillus*, basado en los alineamientos de los genes 16S rRNA (Zeigler, 2001).

6.6.2.2. Morfología de la spora de *B. stearothermophilus*. La spora de *B. stearothermophilus* es de tipo elipsoidal o cilíndrica, localizándose en la parte terminal o subterminalmente en esporangios globosos, las colonias de esta especie de *Bacillus* son variables y el color de la misma puede diferenciar según el medio (Zeigler, 2001).

6.7. Productos biofungicidas a base de bacterias y hongos antagonistas.

Durante los pasados 25 años, pocas áreas de investigación dentro de la fitopatología han atraído más interés que el control biológico de enfermedades, el cual se describe de manera general como la introducción de microorganismos antagonistas para el control de fitopatógenos en las plantas (Upadhyay y Rai, 2000).

Este tipo de control ha sido de cierta manera una respuesta en gran parte a la creciente preocupación de la sociedad relacionada con el uso de pesticidas químicos, los cuales han controlado por años las plagas agrícolas (Saksena, 1972). Sin embargo, su uso irracional ha traído como consecuencia un fuerte impacto negativo sobre el medio ambiente y los que lo rodean, creando principalmente organismos resistentes (F), lo que da lugar a realizar aplicaciones a dosis mucho más fuertes y constantes. En cambio, las formulaciones a base de antagonistas son aplicadas de forma constante, lo cual permite que una cantidad significativa del inoculo del organismo controlador se establezca y logre reducir de manera permanente y equilibrada al fitopatógeno a niveles donde no causa daño económico sobre el cultivo (línea horizontal pequeña), disminuyendo de manera importante el desarrollo del fitopatógeno sin que éste desarrolle resistencia (Figura 4) (Weller *et al.*, 1995).

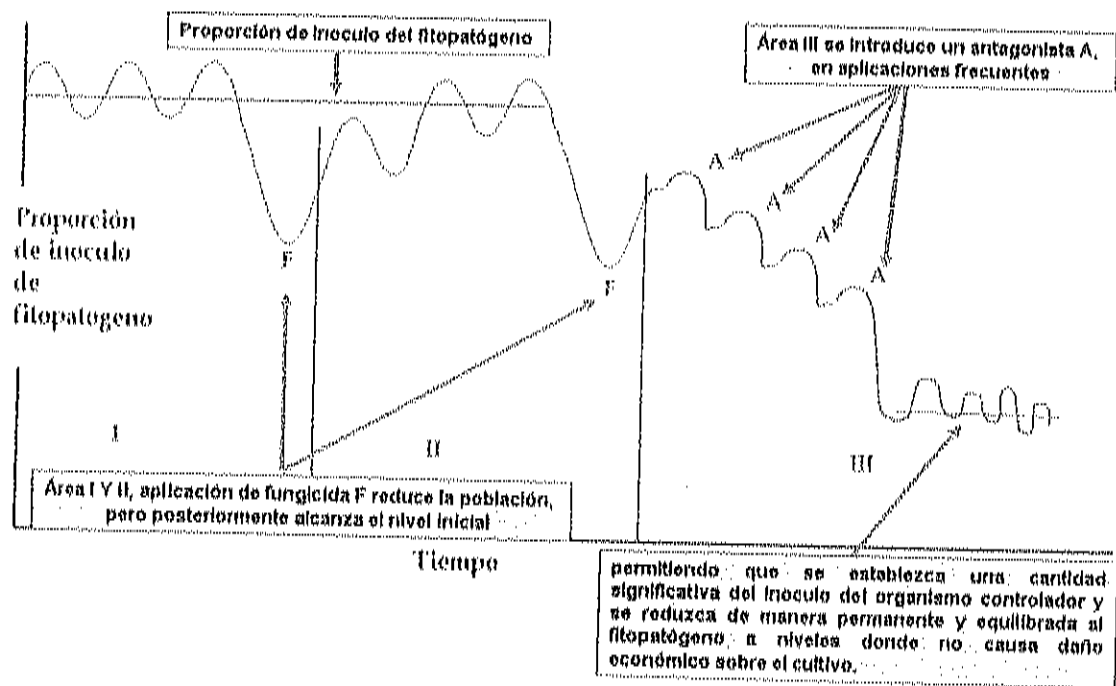


Figura 4. Fluctuación de poblaciones del fitopatógeno con diferentes métodos de control (Weller *et al.*, 1995).

Desde hace más de 10 años se han venido desarrollando formulaciones a base de hongos y bacterias con actividad antagonista hacia una gran diversidad de fitopatógenos, principalmente hongos. Estas formulaciones son los llamados "biofungicidas", los cuales han mostrado una excelente eficacia en la inhibición tanto micelial como de germinación de esporas en los hongos, con la gran ventaja de que no son contaminantes del ambiente, ya que no causan toxicidad en los organismos vivos (Weller *et al.*, 1995).

Actualmente son varias las empresas que integran el mercado de biofungicidas y quizás sólo dos o tres de ellas fueron creadas antes de 1990, lo cual demuestra por sí mismo que se trata de un sector que marca el paso de las nuevas tendencias, dando un aspecto positivo a nuestro país, el cual se ha vuelto un mercado atractivo para las empresas de productos biológicos (Weller *et al.*, 1995).

El mercado de productos biológicos se ha concentrado bastante en atender la problemática de la rizosfera, con un inventario aproximado de veinte productos que corresponden a un número similar de empresas. En este nicho, existen por lo menos seis cepas de hongos y bacterias, entre las cuales sobresalen *Bacillus subtilis* y diferentes especies de *Trichoderma*. Estos microorganismos se han aislado de diferentes tipos de suelos y se han evaluado tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* contra varios hongos fitopatógenos que dañan los cultivos, demostrado una buena efectividad antagónica mayor del 50% sobre ellos. Actualmente, los biofungicidas siguen ocupando un nicho muy importante, el cual es compartido muy de cerca con las micorrizas y los acondicionadores del suelo (Weller *et al.*, 1995).

6.7.1. Formulaciones a base de *Trichoderma*

Existen diferentes formulaciones comerciales a base de hongos antagonistas y su uso depende del modo de acción. Para uso comercial, el material seco es el preferido por la importancia del peso y la manipulación de los productos durante la comercialización. Las hifas son poco resistentes al secado, por lo cual se trabaja en las formulaciones de las formas reproductoras (conidios y clamidosporas) como polvos humedecibles, polvo seco, formulaciones en aceite y encapsulados que contienen el hongo. Las conidias son más resistentes que las clamidosporas y se producen en mayor cantidad (Weller *et al.*, 1995).

La elaboración de productos biológicos a partir de cepas de *Trichoderma* spp se realiza mediante producción industrial, para lo cual se utiliza la fermentación sumergida y la fermentación en sólido. La producción industrial es una alternativa tecnológica muy eficiente desde el punto de vista productivo y económico para la obtención de fungicidas biológicos de alta calidad, los cuales se han evaluado ya en condiciones de laboratorio. Además estos productos tienen un mercado potencial, sobre todo en países donde la agricultura sostenible está tomando mayor importancia. La concentración de conidias en la presentación líquida es de $2-3 \times 10^8$ conidias /ml y en la presentación sólida del hongo de $2-3 \times 10^9$ conidias /g (Weller *et al.*, 1995).

6.7.2. Formulaciones a base de *Bacillus subtilis*

Actualmente, se comercializan a gran escala productos a base de *B. subtilis*, siendo los Estados Unidos los líderes en este campo. En 1994 estos productos se aplicaron en 2 millones de has en ese país y en 1997 Alemania aprobó la comercialización de productos con *B. subtilis* como ingrediente activo (Orrieta y Larrea, 2001).

El aspecto más importante es decidir la fracción a producir, para lo cual es necesario determinar los modos de acción de la especie. Esto permite definir la estrategia de producción y aplicación. En el caso de las bacterias, su acción principal está dada por la producción de metabolitos bioactivos con efecto antibiótico o lítico, por lo cual deben obtenerse concentraciones altas en los caldos de cultivo de estos organismos y posteriormente lograr su concentración y purificación (Orrieta y Larrea, 2001).

También la producción de biomasa puede resultar importante porque al aplicarse como inóculo al suelo, incrementan su cantidad y logran mejor competencia e interacción con el patógeno. En ambos casos, el método de producción más utilizado es la fermentación sumergida, proceso que tiene posibilidades de ser escalado con gran eficacia. También pueden utilizarse métodos más artesanales como el cultivo líquido estático, que mediante un cuidadoso proceso con el medio de cultivo y los parámetros adecuados se logra una producción eficiente (Orrieta y Larrea, 2001).

6.7.3. Control de calidad de los productos biofungicidas

El control de calidad de los productos biofungicidas se refiere principalmente al control de la pureza del producto, la concentración de esporas/ml, lo cual se realiza mediante el conteo usando un microscopio en cámara de Neubauer y la verificación de la viabilidad de las conidias o células bacterianas. Esto último se determina mediante microcultivo en portaobjetos y en medios de cultivos específicos. Además de la realización de diluciones y siembras en el caso de las bacterias, para la determinación de forma, color y viabilidad del microorganismo (Weller *et al.*, 1995).

Las características importantes que deben ser tomadas en cuenta para asegurarse de que la formulación es de excelente calidad son: medios de cultivo (esterilidad, pH y materias primas), inóculo (pureza, viabilidad y concentración), incubación (temperatura del cuarto de crecimiento), control del producto (pureza, pH, concentración conidias/ml, características del cultivo y efectividad biológica por bioensayo (cultivo dual) y almacenamiento (control de temperatura y tiempo de estabilidad).

En el campo de los productos biológicos, existen productos cuya formulación no es realizada por equipos o tecnologías sofisticadas, por esta razón, en la formulación surgen problemas de control de calidad que pueden afectar al sector en un plazo inmediato. Con base en lo anterior dentro del dinamismo del sector, existe quizá una buena posibilidad para desarrollar tecnologías que en el mediano y largo plazo puedan generar una mayor solidez (Weller *et al.*, 1995).

Actualmente se han encontrado varios problemas en cuanto a la eficacia de algunos productos biofungicidas sobre la inhibición de los fitopatógenos a los que son aplicados, por lo que algunos agricultores han optado por volver a utilizar el método de control químico. Esto es debido a que ciertos productos biológicos no cumplen con las características de formulación especificadas en la etiqueta del producto, como son concentración (establece la dosificación del producto), germinación de esporas (determina la viabilidad del hongo en la formulación) y pureza (revela la proporción del agente biológico en la formulación). Por lo anterior, es importante que las empresas productoras de productos biológicos establezcan una estrategia de organización que permita certificar la calidad de los productos, mediante validaciones oficiales que involucren una mayor cantidad de pruebas de laboratorio y campo (evolución biológica) (Weller *et al.*, 1995).

6.8. Efectos de los fungicidas-bactericidas en los microorganismos del suelo

Debido a la gran cantidad y variedad de plaguicidas que se utilizan en la actualidad para proteger los cultivos y sus cosechas, existen controversias sobre los efectos negativos que éstos acarrearán (Pastor, 2002). Los fungicidas del suelo causan indudablemente la mayoría de las alteraciones drásticas del equilibrio microbiológico, ya que son intencionalmente aplicados como agentes antimicrobiales, usualmente a mucha mayor dosis (equivalente de 30-40 ppm) y muestran varios grados de especificidad hacia patógenos de plantas que persisten en el suelo, su acción, por lo tanto es raramente limitada al patógeno (Parr, 1974).

Existe una constante preocupación de que estos químicos puedan también afectar adversamente varios segmentos no parasíticos de la microflora del suelo en diferentes grados; es decir, selectivamente dependiendo en sus características fisiológicas, morfológicas y ecológicas (Parr, 1974). Por ejemplo, las esporas de un hongo y los esclerocios generalmente son más resistentes a los plaguicidas que las hifas. Las endosporas de bacterias son usualmente más resistentes que las formas vegetativas y frecuentemente muestran resistencia con la edad (Olalde y Aguilera, 1998).

Aunque los hongos son generalmente más susceptibles a los fungicidas del suelo que las bacterias, dichos microorganismos muestran grados de variación en resistencia o susceptibilidad a los plaguicidas dependiendo de su habitats de crecimiento ecológico, si están en el suelo, rizosfera o el rizoplano (Valencia y Peña, 2001). Con ciertas excepciones, los organismos que existen relativamente libres en el suelo son más susceptibles a varios tóxicos que esos más íntimamente asociados con materia orgánica muerta u otros organismos vivos, incluyendo plantas superiores. Refiriéndose este fenómeno lo que se conoce como "escudo orgánico" (Parr, 1974).

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente proyecto de investigación se realizó durante el ciclo 2004-2005, en el laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD A. C. Unidad Culiacán). Los materiales utilizados para su realización fueron diez biofungicidas a base de hongos y bacterias antagonistas, cuatro fitopatógenos radiculares, cinco fungicidas y cinco bactericidas químicos.

7.1. Microorganismos biológicos

Los productos biológicos fueron adquiridos de empresas comerciales que producen y distribuyen microorganismos antagonistas. Se obtuvieron productos biológicos con las especies de: *Trichoderma harzianum*, *T. lignorum*, y *Bacillus subtilis* (Cuadro 2), en el caso de *Bacillus stearothersophilus*, se tomó una cepa que fué identificada en el laboratorio de Fitopatología de CIAD, A. C. Unidad Culiacán.

7.2. Microorganismos fitopatógenos

Los hongos fitopatógenos utilizados fueron; *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Pythium aphanidermatum* y *Rhizoctonia solani*, los cuales se tomaron del cepario de referencia que existe en el laboratorio de Fitopatología del CIAD A.C.

7.3. Productos fungicidas y bactericidas

Se utilizaron cinco fungicidas y cinco bactericidas químicos; dichos productos fueron donados por la empresa PROAGRO DEL NOROESTE (Cuadro 3).

Cuadro 2. Formulación y concentración de productos biológicos.

Producto.	Empresa que lo fabrica.	Ingrediente activo	Ingrediente inerte.	Concentración UFC.
Probacil.	Lapisa agrícola	<i>Bacillus subtilis</i>	Carbohidratos, proteínas, aminoácidos.	1×10^8
T-22	Bioworks	<i>Trichoderma harzianum</i>	Diluyentes, dispersants, humectants, protectors.	1×10^7
Biopak.	Bioworks	<i>Bacillus, Pseudomonas, Streptomyces, Trichoderma, Gliocladium, sp</i>	Extracto de yuca schidiguera, sylocs, polietilenglicol.	4×10^{11}
Biotrol.	Laverlam	<i>Trichoderma lignorum</i>	Microtalco esteril.	2×10^7
Trichodef.	Bioensumos naturales agrícolas	<i>Trichoderma harzianum</i>	Aceite vegetal, carbohidratos, aminoácidos.	1×10^{11}
LITHAN.	NALET,	<i>Trichoderma spp</i>		2×10^8
Macrobe plus.		<i>Bacillus subtilis, bacillus steaerothermophilus, Pseudomona a</i>		5×10^8
Agrobacito.	Agrobiológica.	<i>Bacillus subtilis</i>	Carbohidratos, proteínas, aminoácidos.	10^{10}
Tricho-sin.	Agrobionsa	<i>Trichoderma harzianum</i>	Diluyentes y protectores contra luz ultravioleta.	1.2×10^{12}
Biologic.	Gustafson	<i>Bacillus subtilis</i>	Acido humicos, aminoácidos totales.	1.5×10^{10}

Cuadro 3. Nombre comercial, ingredientes activos, dosis recomendadas y tipo de formulaciones de los productos fungicidas y bactericidas evaluados.

Ingrediente Activo	Nombre comercial	Dosis/ha en campo	Formulación
Benomil	Blindaje 50	400-600 gr	Polvo humectable
Captan	Caption 480	1.5-3.0 kg	Suspensión acuosa
Metalaxyl-M	Ridomil 4E Gold	480gr / lt	Concentrado emulsio- noble
Carbendazim	Bavistin		Microgranulado disper- sable
TCMTB	Busan 30W	3-4lts	Suspensión acuosa
Sulfato de Streptomícina + clorhidrato de oxitetraciclina	Cuprimicin 100	50gr / 100 lts de agua	Polvo humectable
Sulfato de estreptomícina + clorhidrato de oxitetraciclina + sulfato tribásico de cobre	Cuprimicin 500	625 gr / 100 lts de agua	Polvo humectable
Sulfato de gentamicina + clorhidrato de oxitetraciclina	Agrygent plus 800	1600 gr / 400 lts de agua	Polvo humectable
Kasugamicina	Kasumín	1600 gr / 400 lts de agua	Polvo humectable
Hidróxido cúprico	Ko-Hydro	2-4 kg	Polvo humectable

7.5. Experimentos *in vitro*

En la elaboración de este proyecto se realizaron cuatro experimentos diferentes, y a continuación se describe la forma en que se realizaron en laboratorio cada uno de ellos, evaluando los materiales antes mencionados.

7.5.1. Experimento 1.- Fungicidas y bactericidas en el medio de cultivo con los hongos (*Trichodermas* y fitopatógenos).

Se realizaron medios de cultivo a base de papa-dextrosa-agar (PDA). Antes de vaciar el medio de cultivo a cajas petri, se le adicionó la dosis de los fungicidas ó bactericidas, según la dosis recomendada en los productos comerciales. Después de que se vació el medio a cajas petri, se dejó solidificar. Discos de 0.5 mm de diámetro con crecimiento activo de cada uno de los microorganismos antagonistas y fitopatógenos fueron tomados con una aguja de disección previamente esterilizada. Posteriormente se depositó un disco con el hongo (*Trichoderma* o fitopatógeno) en el centro de la caja petri y se incubaron a 28°C. El crecimiento micelial se evaluó cada 24 horas, hasta que los tratamientos testigos llenaron completamente la caja. En el caso de los fitopatógenos, solo se evaluaron los fungicidas.

Para este experimento se utilizó un diseño estadístico de dos factores con medidas repetidas en el tiempo (factores: productos químicos y tiempo), con 3 tratamientos. Cada tratamiento contó con cuatro repeticiones. Las variables a evaluar fueron el área ocupada por los hongos en las cajas petri, expresada en $\text{cm}^2/\text{día}$ a través de los días. Posteriormente se comparó el crecimiento de los hongos sembrados en las cajas de medio de cultivo de PDA más el producto químico, con los tratamientos testigos donde solamente se utilizaron cajas petri con PDA (sin producto químico). Los datos fueron analizados por medio del paquete estadístico MINITAB.

7.5.2. Experimento 2.- *Bacillus* con discos de papel filtro impregnados con los fungicidas y bactericidas.

De colonias puras de *Bacillus subtilis* y *Bacillus stearothermophilus*, se tomaron células bacterianas con un asa bacteriológica previamente esterilizada. Las bacterias se depositaron en un tubo de ensaye con 9 ml de agua destilada esterilizada hasta que éste se ajustó a un valor igual a 2 en la escala de Mc Farland's. De la solución se tomaron 100 microlitros y se depositaron en cajas petri con medio de cultivo de PDA. La solución fue dispersada mediante la agitación con perlas de vidrio esterilizadas. Después se colocaron en los dos extremos de la caja, discos de papel filtro de 1.4 cm de diámetro previamente impregnados en una solución con el producto químico, y finalmente se midió a las 24 hrs el halo de inhibición en cm (Martínez *et al.*, 1998). Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento, con un diseño de dos factores (Químico y *Bacillus*) con medidas repetidas en el tiempo.

7.5.3. Experimento 3.- Efecto biocontrolador de las dos especies de *Bacillus* utilizando el método de rayado en los cuatro extremos de la caja petri.

Colonias de las dos especies de *Bacillus* previamente aisladas y purificadas fueron utilizadas para realizar siembras por el método de rayado en los cuatro extremos de la caja petri. Posteriormente a partir de colonias puras con crecimiento activo de los hongos fitopatógenos, se tomaron discos de 0.5 mm de diámetro y se depositaron en el centro de los cuatro extremos donde se sembró la bacteria. En los tratamientos testigos se realizó la siembra de los microorganismos fitopatógenos en el centro de la caja sin *Bacillus*. Las cajas fueron depositadas en una incubadora a 28°C. Las variables a evaluar fueron el área ocupada por los hongos en las cajas petri, expresada en cm²/día. Se utilizó un diseño estadístico de dos factores con medidas repetidas en el tiempo (Factores: fitopatógenos y tiempo), con 3 tratamientos, donde los tratamientos fueron: 1) *Bacillus subtilis* + fitopatógenos (*Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* y *Pythium aphanidermatum*). 2) *Bacillus stearothermophilus* + fitopatógenos y 3) testigos (fitopatógenos). Se contó con cuatro repeticiones por cada tratamiento.

7.5.4. Experimento 4.- Pruebas de porcentaje de viabilidad de los biofungicidas (*Trichoderma* y *Bacillus*).

Se realizaron diluciones de los biofungicidas comerciales utilizados en agua destilada estéril con pH 7.0 considerando una base de 10, es decir en 9 ml de agua se agregó 1 ml del producto biológico. En el caso de los *Trichoderma*, se hicieron diluciones hasta 1x10⁶, sembrándose 5 cajas petri con medio de cultivo PDA de las diluciones 1x10⁴ y 1x10⁵. Para bacterias, la dilución se realizó hasta 1x10⁸. Las placas se depositaron en una incubadora a 22°C ± 2°C. Las evaluaciones se realizaron cada 24 hrs, donde se

contaron las UFC/ml presentes en el medio de cultivo. Los datos obtenidos se compararon con las señaladas en el producto comercial, sus resultados se obtuvieron mediante un análisis descriptivo.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados que se obtuvieron en cada uno de los experimentos muestran el efecto que presentaron los productos químicos sobre la inhibición de crecimiento micelial de cada uno de los microorganismos (antagonistas y fitopatógenos), el efecto de inhibición micelial de las dos especies de *Bacillus* sobre los cuatro fitopatógenos estudiados y el porcentaje de viabilidad en las UFC/ml de los diez biofungicidas.

8.1. Experimento 1

En este experimento se describen los resultados que se obtuvieron al evaluar el efecto de los fungicidas con cada uno de los hongos fitopatógenos y el efecto tanto de fungicidas y bactericidas en las dos especies de *Trichodermas*.

8.1.1. Fungicidas contra hongos fitopatógenos

8.1.1.1. *Rhizoctonia solani*. De acuerdo a los resultados obtenidos en el ANOVA, sobre la inhibición de los fungicidas en crecimiento micelial de *R. solani*, se observa que todos los tratamientos de los fungicidas con este fitopatógeno presentaron diferencias significativas en los químicos y la interacción doble químico*tiempo (Cuadro 4 – Figura 13).

Cuadro 4. Resultados obtenidos del ANOVA, referente al crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* en la aplicación con los fungicidas.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P
Químico	5	411.565	82.313	6.80	0.005
Tiempo	2	61.422	30.711	2.54	0.128
Cajas (Químico)	24	6.608	0.275	1.03	0.455
Químico*Tiempo	10	20.898	12.090	45.06	0.000
Error	48	12.880	0.268		
Total	89	613.373			

La figura 5, muestra el efecto de interacción de *Rhizoctonia solani* y los fungicidas, muestran que Benomil, Carbendazim, TCMTB y Captan inhibieron completamente el crecimiento micelial de este fitopatógeno (0 cm = 0%), excepto Metalaxyl, que aunque no controló en un 100% a este fitopatógeno, si se observó que puede hacer más lento su desarrollo, en el cual se dió un crecimiento micelial de 8% a las 24 hrs, 22% a las 48 hrs y 57 % hasta las 72 hrs, mientras que su testigo mostró 17% a las 24 hrs, 79% a las 48 y 100% a las 72 hrs, esto demuestra que el producto mostró una efectividad del 43%. Como se puede observar, a las 48 hrs el crecimiento micelial del testigo se disparó, en cambio en el tratamiento Metalaxyl fue mucho más lento, sin embargo al término de las 72 hrs el crecimiento de este último empieza a crecer de manera normal.

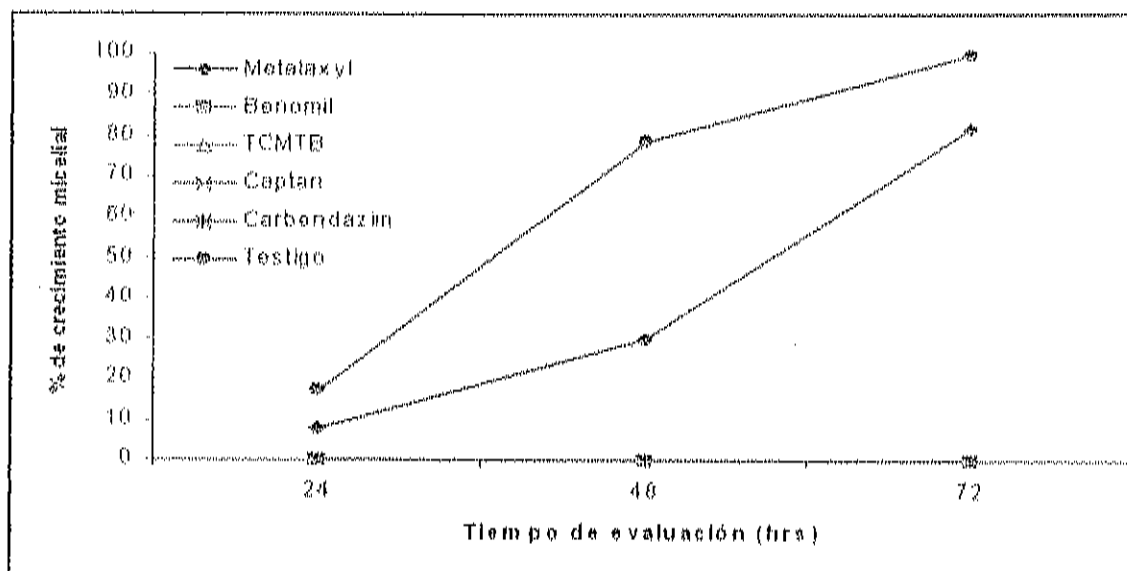


Figura 5. Interacción del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* con los diferentes fungicidas evaluados.

NPIC (2002), menciona que fungicidas derivados de los benzimidazoles, como lo son Benomil y Carbendazim actúan inhibiendo la formación de polímeros de la Beta-tubulina en algunos hongos, los cuales son utilizados por la célula del hongo durante la división nuclear, además de inhibir la síntesis del ergosterol, el cual es el principal componente de la membrana celular. En el caso de TCMTB y Captan que son productos de contacto, se dice que inhiben la germinación de esporas en los hongos, además de inhibir el proceso de respiración.

Nasir (2003), evaluó *in vitro* el efecto de cinco fungicidas entre ellos Captan y Benomil sobre el crecimiento micelial de seis fitopatógenos que dañan la semilla de frijol soya siendo uno de ellos *Rhizoctonia solani*. El experimento se realizó añadiendo el producto químico en medio de PDA, donde posteriormente se le depositó un disco con crecimiento activo del hongo en el centro de la caja petri. En los resultados obtenidos por Nasir, se muestra que tanto Benomil y Captan (7 y 10% de crecimiento micelial), inhibieron de manera muy eficaz el crecimiento de dicho fitopatógeno, teniendo su testigo 19% de crecimiento micelial. Lo que concuerda con los resultados de este trabajo e investigación, debido a que los dos fungicidas señalados no dejaron crecer de manera normal al fitopatógeno, inhibiéndolo en un 100%.

Shilder y Sundin (2000), mencionan que tanto Captan como Benomil, son de amplio espectro, es decir, presentan diferentes modos de acción sobre los fitopatógenos, actuando así contra todo tipo de microorganismos presentes en el área aplicada o dañada, presentando así un buen control contra este fitopatógeno.

En la figura 6, de los efectos principales se puede observar el crecimiento ascendente de *Rhizoctonia solani* a través del tiempo y las respuestas de los diferentes fungicidas sobre dicho hongo, donde se observa que en el tratamiento con Metalaxyl y el tratamiento testigo no hubo diferencias significativas al final de la evaluación, pero si se presentaron diferencias significativas con respecto a los tratamientos Benomil, Captan, TCMTB y Carbendazim.

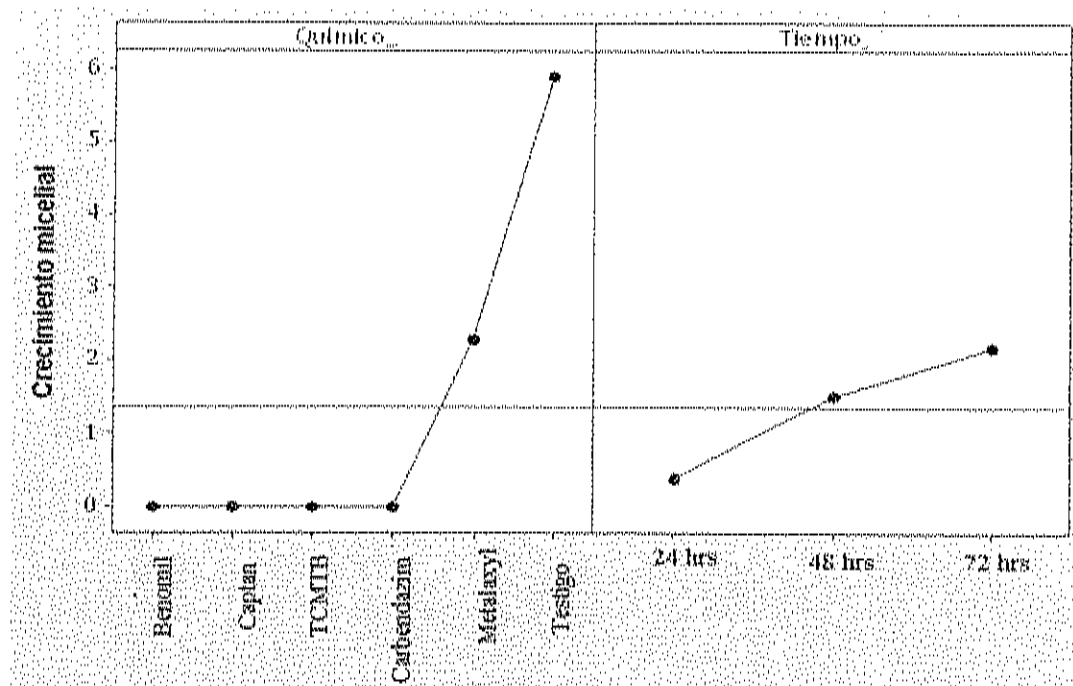


Figura 6. Efectos principales del crecimiento micelial en *Rhizoctonia solani* en la aplicación con los fungicidas.

8.1.1.2. *Pythium aphanidermatum*. En el estudio correspondiente al tratamiento con el hongo *P. aphanidermatum*, el ANOVA muestra diferencias significativas entre la interacción doble químico*tiempo y los productos químicos (Cuadro 5 – Figura 13).

Cuadro 5. Resultados obtenidos del ANOVA, referente al crecimiento micelial de *Pythium aphanidermatum* en la aplicación con los fungicidas.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P
Químico	5	378.517	75.703	6.80	0.028
Tiempo	1	27.473	27.473	2.47	0.177
Cajas (Químico)	24	0.260	0.011	1.00	0.500
Químico*Tiempo	5	55.657	11.131	1027.52	0.000
Error	24	0.260	0.011		
Total	59	462.167			

En la Figura 7 de interacción, se observa que a diferencia de *Rhizoctonia solani*, *Pythium aphanidermatum* presentó un crecimiento mucho más rápido, ya que al término de las 48 hrs su testigo ya había llenado la caja completamente.

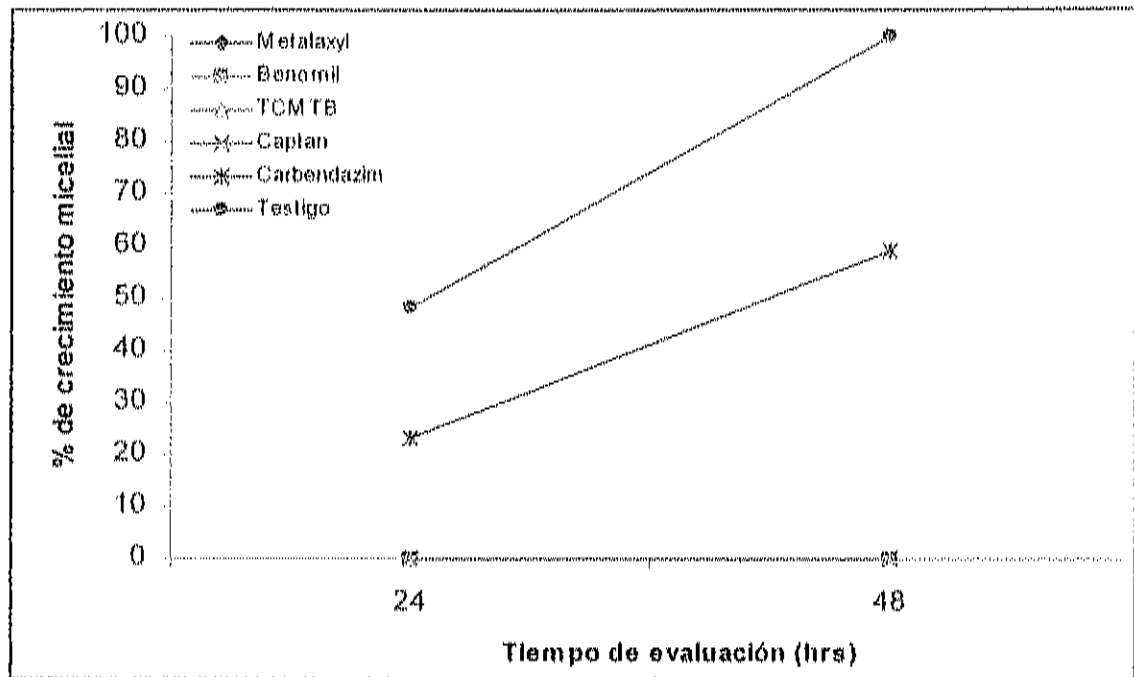


Figura 7. Interacción en el crecimiento micelial de *Pythium aphanidermatum* con los fungicidas.

Este fitopatógeno, no tuvo la capacidad de desarrollarse en los tratamientos a base de Metalaxyl, Benomil TCMTB y Captan (0% de crecimiento micelial), indicando que en condiciones *in vitro*, los productos antes señalados actúan eficientemente en el control de este fitopatógeno debido a que la mayoría son de amplio espectro. Sin embargo, en Carbendazim no se presentó efecto de total inhibición micelial, el cual presentó 5.3 cm (59%) de crecimiento.

El fungicida Metalaxyl, como se mencionó anteriormente en la literatura, es un producto específico para oomicetos, principalmente del género *Pythium* y *Phytophthora*. Este producto químico actúa inhibiendo severamente la esporulación del hongo y en menor

grado el desarrollo micelial, interfiriendo en la síntesis de ARN e inhibiendo a la enzima ARN polimerasa (Fernández, 1999). Los resultados confirman la efectividad del Metalaxyl sobre *Pythium aphanidermatum*.

En el caso de Carbendazim, se puede mencionar que a pesar de ser un producto de amplio espectro, su efecto fue nulo sobre el crecimiento micelial de *Pythium*, determinando con esto que no todos los hongos fitopatógenos son eliminados al aplicar estos productos, ya que en algunas ocasiones se debe a que los hongos ya han adquirido resistencia sobre ciertos agroquímicos y en este caso puede ser que *Pythium* haya adquirido resistencia sobre el fungicida Carbendazim.

Los resultados obtenidos en esta investigación coinciden de cierta manera con los trabajos realizados por Hassan *et al.* (1982), donde evaluaron *in vitro* el efecto de diferentes fungicidas entre ellos Captan, sobre el crecimiento micelial de fitopatógenos del suelo, dentro de los que se encontraba *Pythium aphanidermatum*. Los resultados encontrados por los investigadores señalados, muestran una marcada susceptibilidad por parte de este fitopatógeno hacia dicho fungicida, el cual inhibió un 50% el crecimiento micelial. En nuestro caso, Captan inhibió un 100% a *Pythium*; sin embargo, hay que mencionar que la respuesta de los hongos que pertenecen a la misma especie hacia los fungicidas difiere entre cepas, además del hábitat donde se hayan desarrollado.

En los efectos principales (Figura 8), se observó que entre Benomil, Captan, TCMTB y Metalaxyl no hubo diferencias significativas, debido a que los cuatro eliminaron en un 100% el crecimiento micelial de *Pythium*, demostrando que después de 48 hrs ya los químicos aplicados habían controlado totalmente a dicho fitopatógeno, el cual aún se encontraba presente en los medios de cultivo.

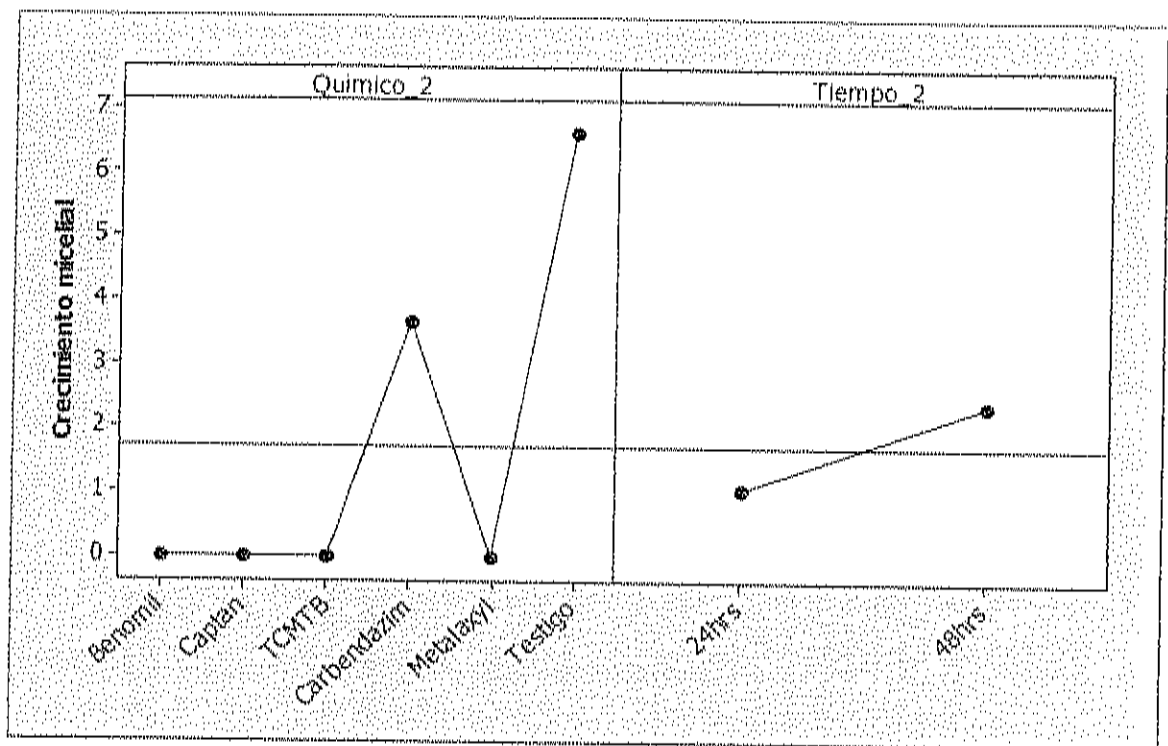


Figura 8. Efectos principales del crecimiento micelial de *Pythium aphanidermatum*

Se menciona que este tipo de agroquímicos pueden llegar a persistir hasta dos meses en el suelo, cuando las plantas están aun jóvenes y con crecimiento activo (Sieptmann y Bruhn, 1999). Esto ayuda al productor a tener mayor control de la enfermedad y menos gasto en fungicidas. Sin embargo al estar presente dicho tiempo en el suelo, hay más

probabilidad de que se dañe la microflora presente en la rizosfera de la planta. En los tratamientos con Carbendazim y testigo, el hongo siguió su crecimiento normal a través del tiempo, no observándose diferencias significativas entre ellos.

8.1.1.3. *Fusarium oxysporum*. Los resultados del análisis de varianza, mostraron diferencias significativas en la interacción doble químico* tiempo, el químico y el tiempo (Cuadro 6 – Figura 13).

Cuadro 6. Resultados obtenidos del ANOVA, referente al crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* en la aplicación de los fungicidas.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P
Químico	5	1134,670	226,934	22,83	0,000
Tiempo	8	193,727	24,216	2,47	0,028
Cajas (Químico)	24	3,244	0,135	11,37	0,000
Químico*Tiempo	40	392,607	9,815	825,25	0,000
Error	192	2,284	2,284	0,012	
Total	269	1726,532			

La interacción de este hongo con los diferentes fungicidas se puede observar en la figura 9, donde la mayoría de los productos químicos inhibieron a dicho patógeno.

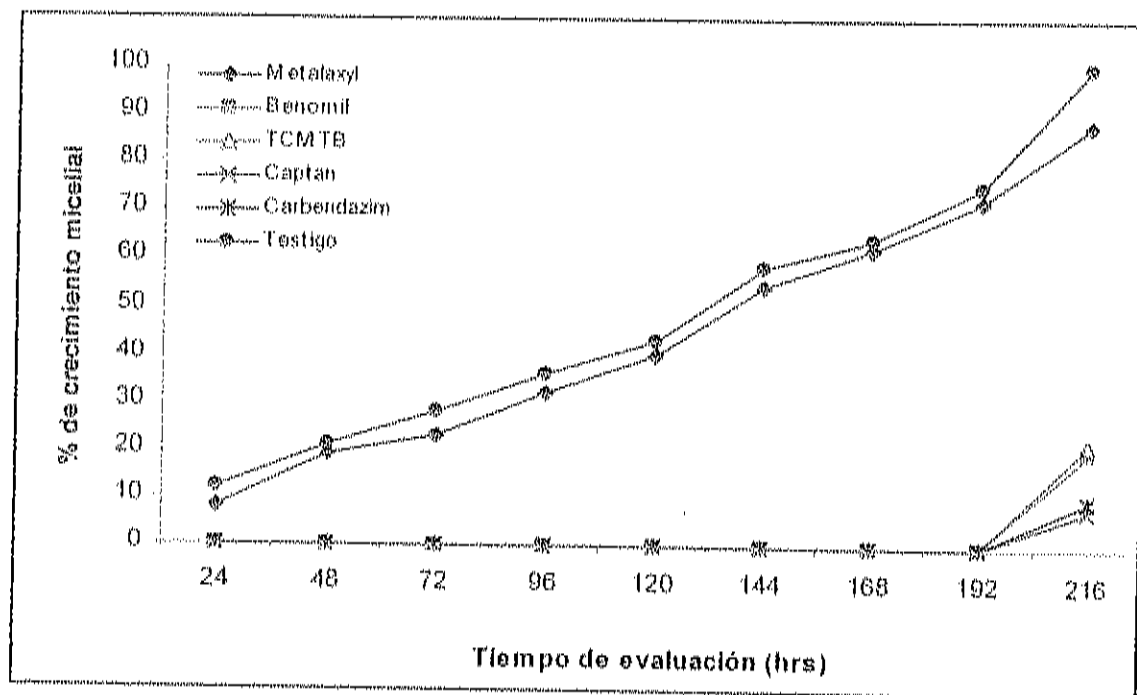


Figura 9. Interacción en el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* con los fungicidas.

En este microorganismo, los fungicidas Benomil con 1.6 cm de crecimiento micelial equivalentes al 20%, TCMTB con 2 cm (22%), Carbendazim con 0.9 cm (10%) y Captan con 0.7 cm (8%) aunque no mostraron una efectividad del 100% en la inhibición micelial, si redujeron de manera efectiva el crecimiento del hongo evaluado, ya que durante el tiempo de la medición, estos productos no dejaron crecer al microorganismo y fue hasta las 192 y 216 hrs (8 y 9 días después del tratamiento, al final de la evaluación), cuando los productos químicos perdieron su acción sobre *Fusarium*, ya que el producto probablemente se había degradado en las cajas y el hongo empezó a desarrollarse, presentando en este caso, un efecto fungistático al inactivar solamente el crecimiento de

hifas y no fungicida, ya que estos productos no pudieron eliminar por completo al hongo.

Ellil y Sharaf (2003), evaluaron el efecto *in vitro* de Benomil en el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, aplicando de igual manera el producto químico en cajas petri con PDA a diferentes concentraciones, los investigadores antes señalados observaron que aún a la más mínima concentración, el crecimiento de *Fusarium* fue inhibido al 100% por este fungicida, coincidiendo así con nuestros resultados obtenidos.

El fungicida Metalaxyl fue el único producto que no presentó inhibición sobre *Fusarium*, ya que su mecanismo de acción es específico contra oomicetes al actuar sobre sus zoosporas y la germinación de sus esporangios. Estas estructuras no están presentes en *Fusarium*, es por eso que dicho fungicida no tiene efecto sobre él. Los otros fungicidas evaluados son de amplio espectro, es decir tienen diferentes mecanismos de acción, actuando así contra una gran variedad de hongos. El crecimiento que presentó *Fusarium* en Metalaxyl fue de 8 cm (88%), casi igualando al testigo en donde el hongo desarrolló 9 cm (100%) de diámetro, es por ello que no se presentaron diferencias significativas entre ambos tratamientos.

La Figura 10, muestra los efectos principales, donde se puede observar que entre los tres primeros fungicidas que fueron Benomil, Captan, TCMTB y Carbendazim no existió diferencias significativas, sin embargo, estos si fueron diferentes en los tratamientos con Metalaxyl y el testigo, siendo estos dos últimos iguales estadísticamente.

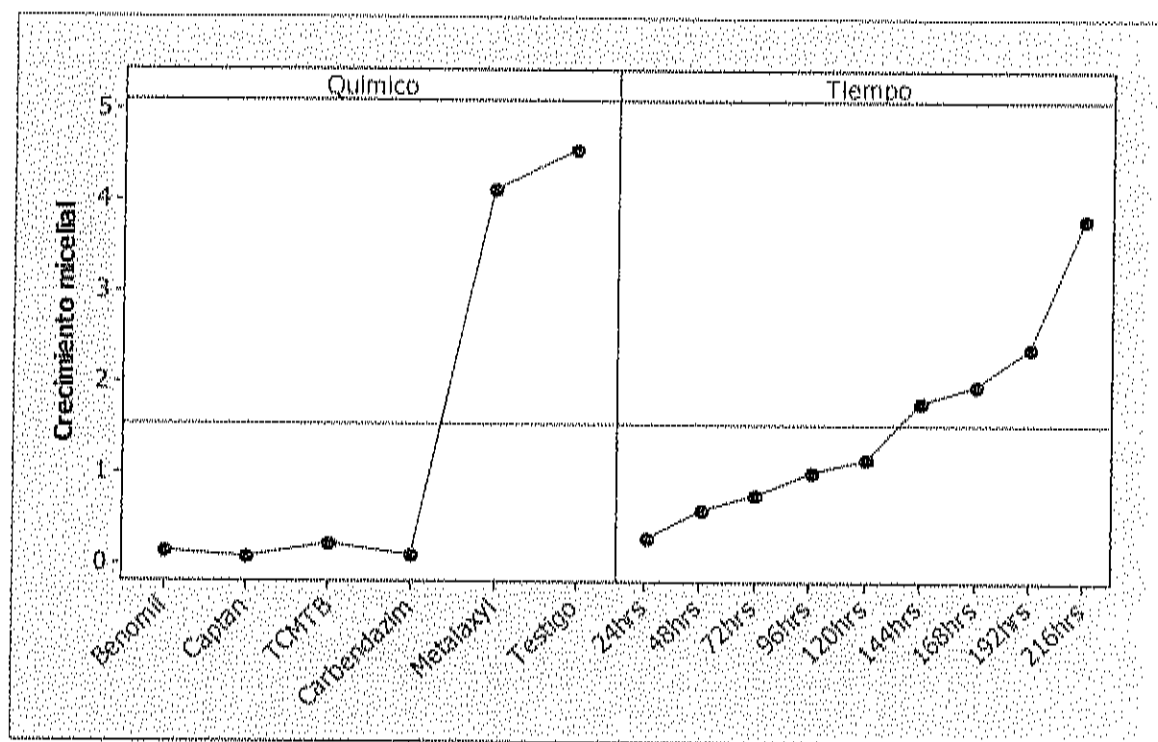


Figura 10. Efectos principales del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*

Al respecto, Nasir (2003), evaluó el efecto de Captan y Benomil en el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* a nivel *in vitro*, mezclando el fungicida en el medio de cultivo. Los resultados mostraron que ambos fungicidas inhibieron el crecimiento del hongo mostrando en el caso de Captan 0.8 cm (9%) de crecimiento y Benomil redujo

aún mas presentando un crecimiento micelial de 0.6 cm (6%) comparado con su testigo que mostró 9 cm (100%) de crecimiento micelial.

8.1.1.4. *Phytophthora capsici*. Los resultados arrojados en el ANOVA, mostraron diferencias significativas en la interacción doble químico*tiempo, el químico y el tiempo (Cuadro 7- Figura 13).

Cuadro 7. Resultados obtenidos del ANOVA, referente al crecimiento micelial de *Phytophthora capsici* en la aplicación con los fungicidas.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P
Químico	5	1200.149	240.030	30.77	0.000
Tiempo	8	151.729	18.966	2.44	0.030
Cajas (Químico)	24	0.696	0.029	6.82	0.000
Químico*Tiempo	40	311.086	7.777	1829.92	0.000
Error	192	0.816	0.004		
Total	269	1664.476			

Las diferencias mostradas anteriormente se ilustran de una mejor manera en la gráfica de interacción, donde se observa que no todos los fungicidas mostraron eficacia sobre *P. capsici* (Figura 11).

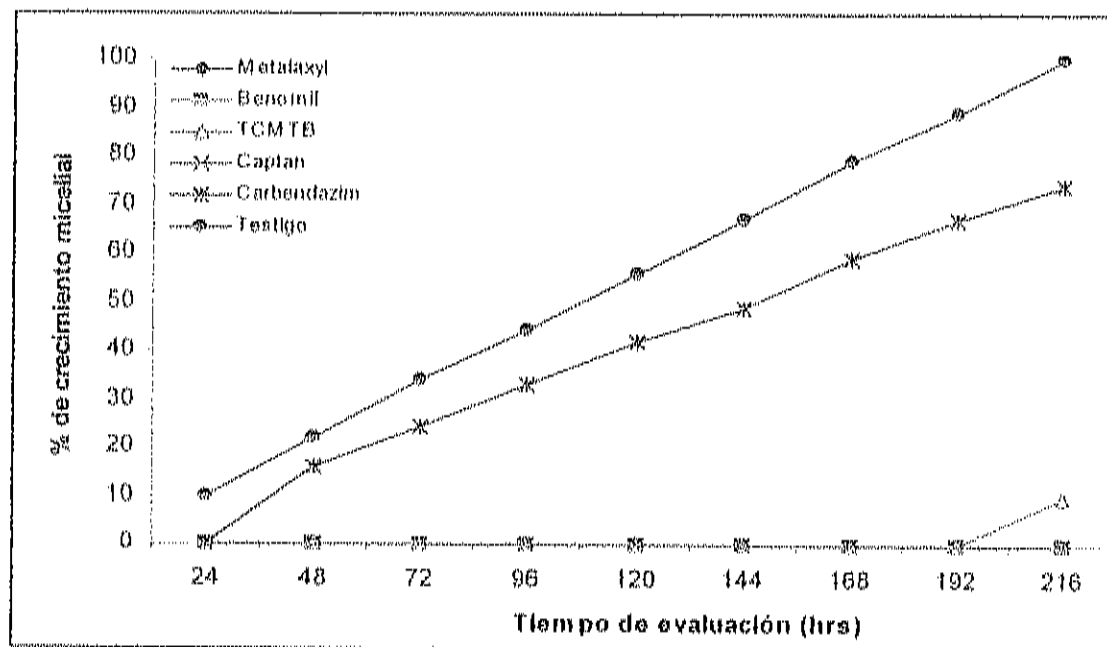


Figura 11. Interacción en el crecimiento micelial de *Phytophthora capsici* con los fungicidas.

Los mejores tratamientos fueron Metalaxyl, Benomil y Captan, ya que en estos tratamientos el hongo no se desarrolló (0% de crecimiento micelial), es decir, lo eliminaron por completo, pero en el caso de TCMTB se mostró un ligero crecimiento de 0.9 cm equivalentes al 10% de crecimiento micelial al término de la evaluación que fue a las 216 hrs (9 días), probablemente por que el producto ya se había degradado y solo inactivó el crecimiento de hifas de *Phytophthora* durante los primeros días de la evaluación, lo que puede indicar que probablemente el hongo ha adquirido resistencia a dicho producto y que su uso debe ser cuidadoso, ya que por si solo no afecta el 100% del crecimiento del hongo, además de que después de 9 días, este producto se tendría que aplicar de nuevo.

Dichos resultados concuerdan con los obtenidos por Pérez *et al.* (2004), donde determinaron *in vitro* la respuesta de 14 aislamientos de *Phytophthora capsici* a cinco fungicidas, entre ellos TCMTB y Metalaxyl, los investigadores antes mencionados observaron que en el caso de TCMTB todos los aislamientos fueron inhibidos en todas las concentraciones evaluadas, debido tal vez a que este fungicida tiene efecto directo sobre la fisiología del hongo, mientras que Metalaxyl tiene efecto indirecto, ya que solo actuó sobre cuatro aislamientos, pues tiene que reaccionar con compuestos de la planta para actuar.

Respecto a Carbendazim, no se observó efecto sobre *Phytophthora* presentándose en este producto 6.3 cm (70%) en el crecimiento del hongo, comparándolo con su testigo que fue de 9 cm (100%), creciendo ambos de manera similar.

Para los efectos principales se observa que los tres primeros fungicidas actuaron inhibiendo completamente el desarrollo del hongo, mostrando de esta manera que fueron iguales estadísticamente (no hay diferencias significativas), pero diferentes respecto a los tratamientos Carbendazim y testigo, entre los cuales no hubo diferencias significativas y donde el crecimiento del hongo fue normal a través del tiempo (Figura 12).

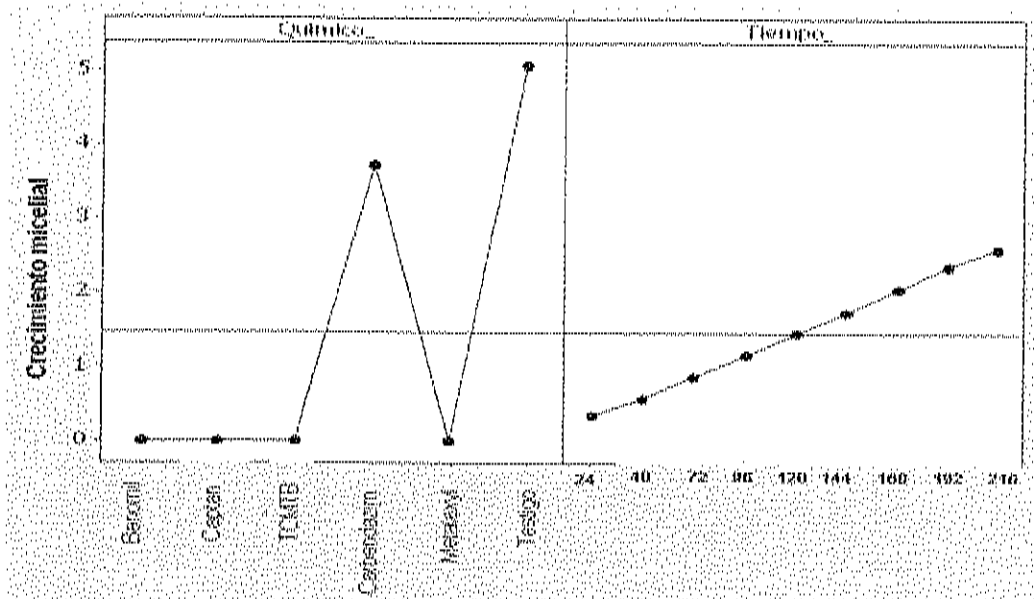


Figura 12. Efectos principales del crecimiento micelial de *Phytophthora capsici*

También se puede señalar que los resultados fueron similares a los efectos de estos fungicidas sobre *Pythium aphanidermatum*, donde solo el producto Carbendazim, fue el único que no presentó efecto sobre el hongo, creciendo de manera similar a su testigo. Determinando una vez más que Metalaxyl, es un producto específico sobre oomicetes y que los restantes son de amplio espectro de acción. Otro dato importante es que el crecimiento de *Phytophthora capsici* fue mucho más lento que el de *Pythium aphanidermatum*, ya que en el caso de *Pythium* éste presentó 100% de crecimiento micelial las 48 hrs (2 días), mientras que en *Phytophthora* fue a las 216 hrs (9 días).

Matheron y Porchas (2000), evaluaron y compararon los efectos de tratamientos a base de azoxystrobin, dimetomorf, fluazinam, fosetyl-Al y metalaxyl aplicados al suelo, para inhibir el desarrollo de *Phytophthora capsici* presente en Chile, determinando la incidencia de la severidad en las plantas. Sus resultados mostraron que dentro de los cinco fungicidas, Metalaxyl fue el que presentó el menor número de plantas afectadas por este hongo, por lo tanto fue el que presentó mayor efectividad sobre *Phytophthora*, siendo los resultados similares a los de este estudio.

González *et al.* (2004), evaluaron *in vitro* la efectividad de Metalaxyl y Benomil sobre *F. oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Pythium* sp, *R. solani*, y *S. rolfsii* causantes de la marchitez del Chile. En los resultados, sólo hubo diferencias significativas en Benomil, que controló a la mayoría de los aislamientos. Hasta los 30 días las colonias alcanzaron un diámetro de 14,2 % (1,2 cm) a 90 % (7,5 cm) de crecimiento en caja petri, mientras que en el testigo fue 100% (8,5 cm) a los 10 días. Con Metalaxyl los aislamientos de *Fusarium* redujeron de 1,0 a 2,5 cm el diámetro de sus colonias, mientras que los de *Rhizoctonia* fueron reducidos de 7,2 a 7,4 cm. Al parecer Benomil es efectivo indirectamente para algunos aislamientos de oomicetes, lo que requeriría su evaluación directa en campo, mientras que Metalaxyl controló eficientemente los oomicetes *in vitro*.

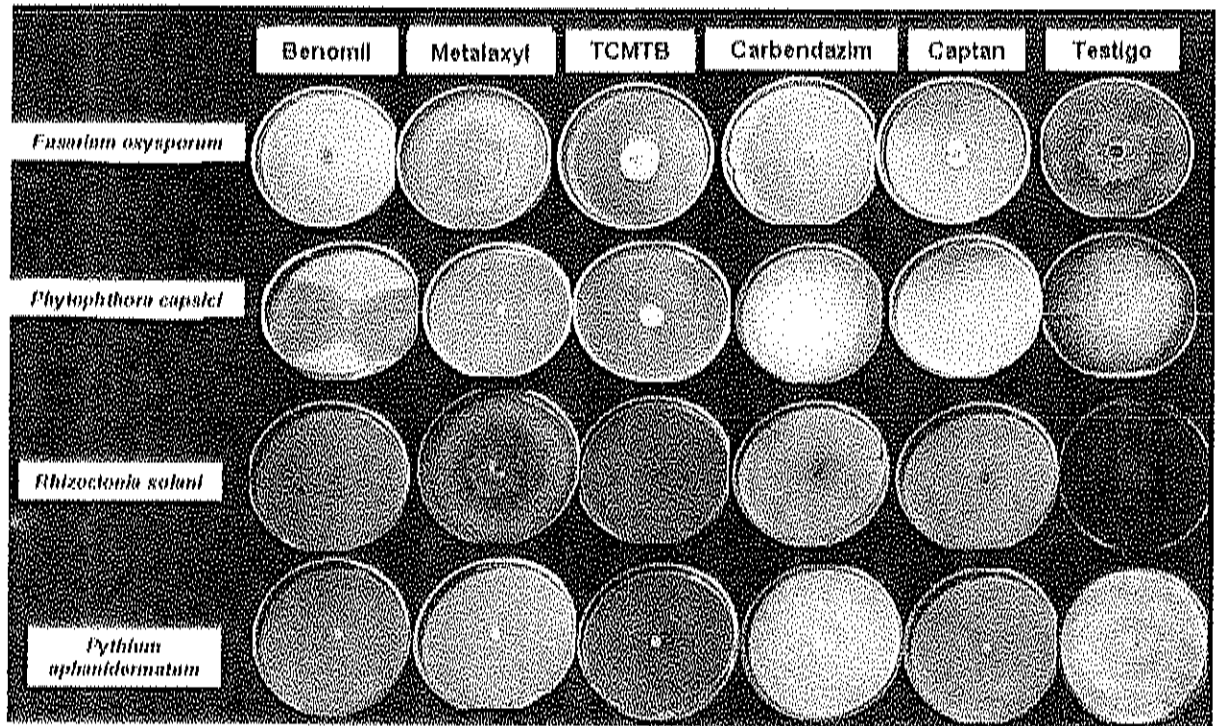


Figura 13. Efectividad de los fungicidas a nivel *in vitro* sobre los cuatro fitopatógenos evaluados.

8.1.2. Fungicidas y bactericidas sobre las dos especies de *Trichodermas*

8.1.2.1. Fungicidas. En este bioensayo el ANOVA presentó diferencias significativas en los químicos, tiempo, en la interacción doble hongo*químico, hongo*tiempo, químico*tiempo, y en la interacción triple hongo*químico*tiempo (Cuadro 8 – Figura 17).

Cuadro 8. Resultados obtenidos del ANOVA, referente al crecimiento micelial de las dos especies de *Trichodermas* en la aplicación de los fungicidas.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P
Hongo	1	0.002	0.002	0.03	0.867
Químico	5	847.088	169.418	373.60	0.000
Cajas (químico)	24	10.884	0.453	6.22	0.000
Hongo*químico	5	8.654	1.731	23.74	0.000
Tiempo	3	130.717	43.572	597.64	0.000
Hongo*Tiempo	3	0.192	0.064	0.88	0.453
Químico*Tiempo	15	216.523	14.435	197.99	0.000
Hongo*químico*Tiempo	15	10.767	0.718	9.85	0.000
Error	168	12.248	0.073		
Total	239	1237.076			

Las interacciones (Figura 14 y 15) en las dos especies de *Trichoderma* muestran que solo Metalaxyl presentó compatibilidad con ambos antagonistas creciendo ambos *Trichodermas* a la par con su testigo.

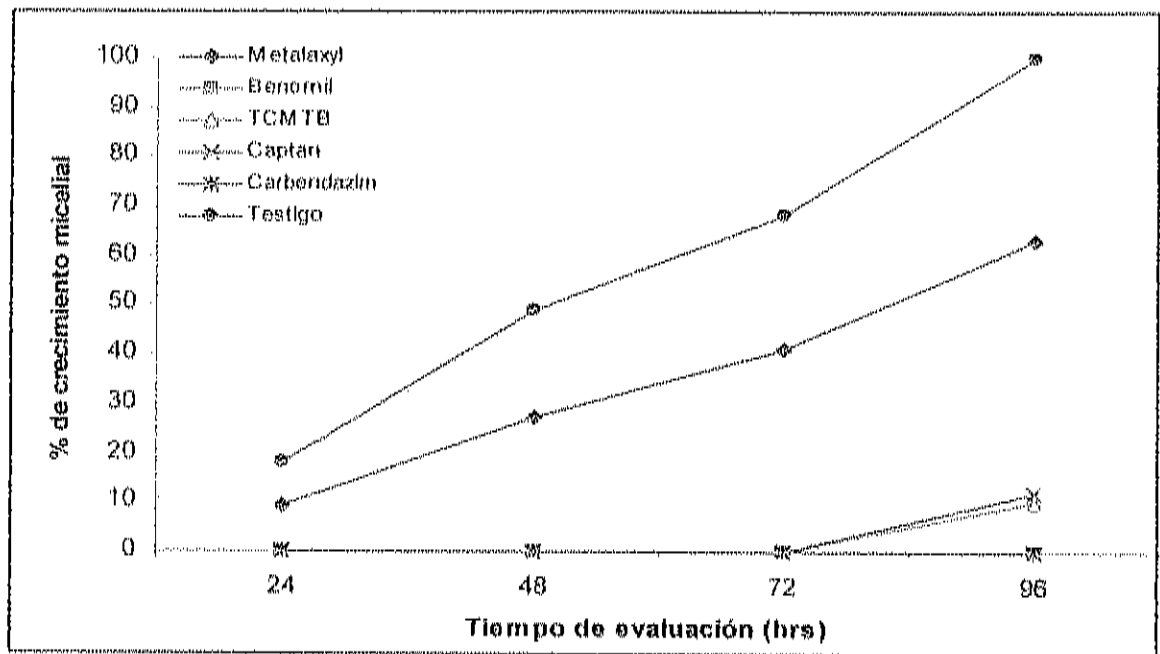


Figura 14. Interacción en el crecimiento micelial de *Trichoderma harzianum* con los fungicidas

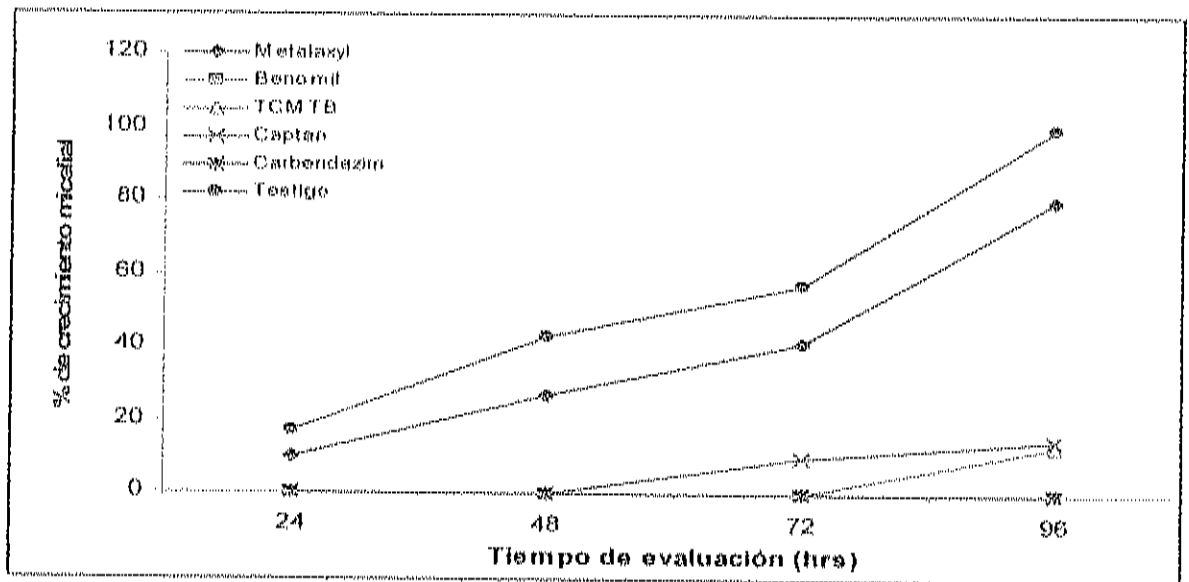


Figura 15. Interacción en el crecimiento micelial de *Trichoderma lienorum* con los fungicidas.

Benomil y Carbendazim afectaron totalmente las dos especies de *Trichodermas* (0%). Tal vez esto debió a que son productos de amplio espectro y que a pesar de que controlan a una amplia gama de microorganismos fitopatógenos, también afectan los microorganismos antagonistas que se encuentran en el suelo, como ya se mencionó anteriormente estos productos son derivados de los benzimidazoles, los cuales inhiben la síntesis del ergosterol, presente en la membrana citoplasmática del hongo, entre otros mecanismos.

Con lo que respecta a Carbendazim, Sousa *et al.* (2004), mencionan que este fungicida solamente afecta a la microflora del suelo cuando la dosis es 20 veces más altas que las recomendadas en campo. Según Kjollers y Rosendahl (2000), el mecanismo de acción

de este químico es ligar específicamente a la beta-tubulina del hongo, inhibiendo la función tubulina, la cual es crucial para el crecimiento del mismo.

Kredicks *et al.* (2003), obtuvieron resultados similares con Benomil y Carbendazim en la inhibición de tres especies de *Trichoderma* (*harzianum*, *viride* y *aureviride*) al evaluarlos junto con otro fungicida (Dicloran) y cuatro herbicidas. En el caso de los herbicidas, todos inhibieron el crecimiento de las tres especies de *Trichoderma*, mientras que los tres fungicidas el Benomil y Carbendazim no permitieron su desarrollo.

TCMTB y Captan presentaron efecto fungistático en ambos *Trichodermas*, presentándose en TCMTB 0.9 cm (10%) para *T. harzianum* y 1.3 cm (15%) en *T. lignorum*, en el caso de Captan fue de 1 cm (11%) para ambos *Trichodermas* hasta las 96 hrs, cuando el testigo llenó la caja petri (9 cm), es decir el 100% de crecimiento micelial. Fue en Metalaxyl donde sí se observó un crecimiento micelial de 5.6 cm (63%) en *T. harzianum* y en *T. lignorum* 7.2 cm (80%) (Figura 14 y 15).

Siepmahn y Bruhn (1999), mencionan que tanto TCMTB y Captan son productos fungistáticos que se degradan rápidamente en el suelo con una vida media de uno a diez días en suelos húmedos, en este caso se pudo observar que a las 96 hrs (3 días), las hifas de las dos especies de *Trichoderma* empezaron a desarrollarse. Esto es un dato importante, ya que nos indica el intervalo de tiempo en que un producto ya no está presente a las concentraciones inhibitorias en el medio de cultivo o tal vez en el suelo, y

que después de 72 hrs se puede volver a recolonizar con estos antagonistas teniendo la certeza de que no habrá daño sobre ellos, ejerciendo de esta manera un mejor control hacia los fitopatógenos.

McLean *et al.* (2001), observaron que al estudiar el efecto de Benomil y Captan en la germinación de esporas de *Trichoderma harzianum*, este antagonista resultaba ser sensible a ambos, ya que en el caso de Benomil presentaba 58% de inhibición en la germinación de esporas, mientras que en Captan era un poco menos agresivo con este antagonista presentando 3.5% de inhibición. En la presente investigación, el crecimiento de *Trichoderma* en estos dos fungicidas fue de 0%, sin embargo hay que señalar que en este caso únicamente se evaluó el crecimiento micelial y el de McLean fue con esporas, las cuales son estructuras de resistencia hacia diversos factores.

Los resultados obtenidos también concuerdan con trabajos realizados por Romo *et al.* (1999), donde evaluaron el efecto de ocho fungicidas *in vitro*, (a 10, 100 y 1000 ppm), entre ellos Benomil, Carbendazim, Captan y Metalaxyl en el desarrollo de *Trichoderma harzianum*, ellos determinaron que tanto Benomil como Carbendazim inhibieron totalmente el crecimiento de este antagonista en todas las concentraciones. En el caso de Captan, este producto presentó solo efecto a la concentración mayor, y Metalaxyl redujo el crecimiento en un 50% a todas las concentraciones.

En los efectos principales (Figura 16 – Figura 17) se puede observar que no hubo diferencias significativas entre los *Trichodermas*, ya que su crecimiento fue de manera similar. Tampoco hubo diferencias significativas en el tratamiento con Metalaxyl y el testigo, sin embargo estos sí fueron diferentes con los demás fungicidas. El crecimiento micelial de dichos antagonistas fue de manera normal a través del tiempo.

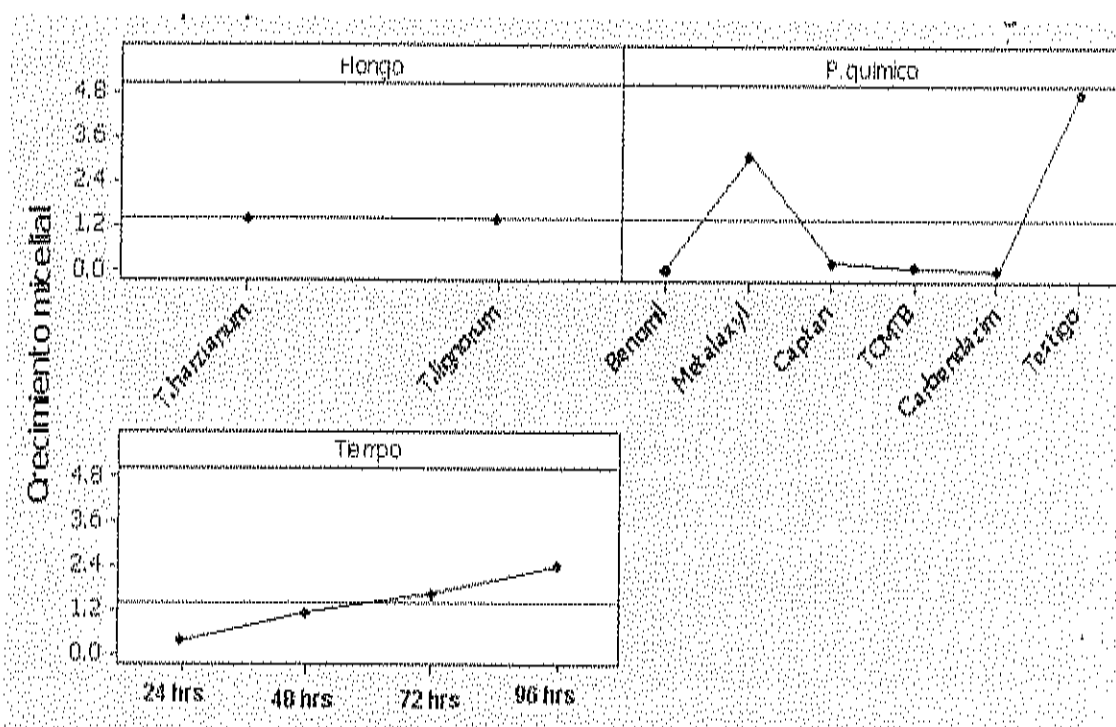


Figura 16. Efectos principales del crecimiento micelial de las dos especies de *Trichodermas*

En el caso del efecto de Metalaxyl sobre los fitopatógenos *Pythium aphanidermatum* y *Phytophthora capsici* se observó que presentó una buena efectividad en cuanto a la inhibición total de ambos hongos, y en este caso se puede ver que no afectó el crecimiento de las dos especies de *Trichoderma*, ya que este fungicida actúa sobre estructuras específicas de los oomicetes como zoosporas y zoosporangios. Es decir, el

fungicida Metalaxyl puede ser aplicado en combinación con *Trichoderma* para el control de *Pythium* y *Phytophthora* dentro de un método o estrategia de control integrado sin que sea dañado por el producto químico, o aún más, pueden ser aplicados por separado con intervalos de tiempo mínimos, y aun cuando el producto perdure en el suelo, este no dañará al hongo antagonista.

A pesar de que no se observan diferencias significativas entre las dos especies de *Trichoderma*, se puede observar, de acuerdo al crecimiento micelial de ambas que *T. harzianum* (63%) fue más sensible a Metalaxyl que *T. lignorum* (80%). En este caso se le puede atribuir al tipo de cepa utilizada, ya que varían entre ellas.

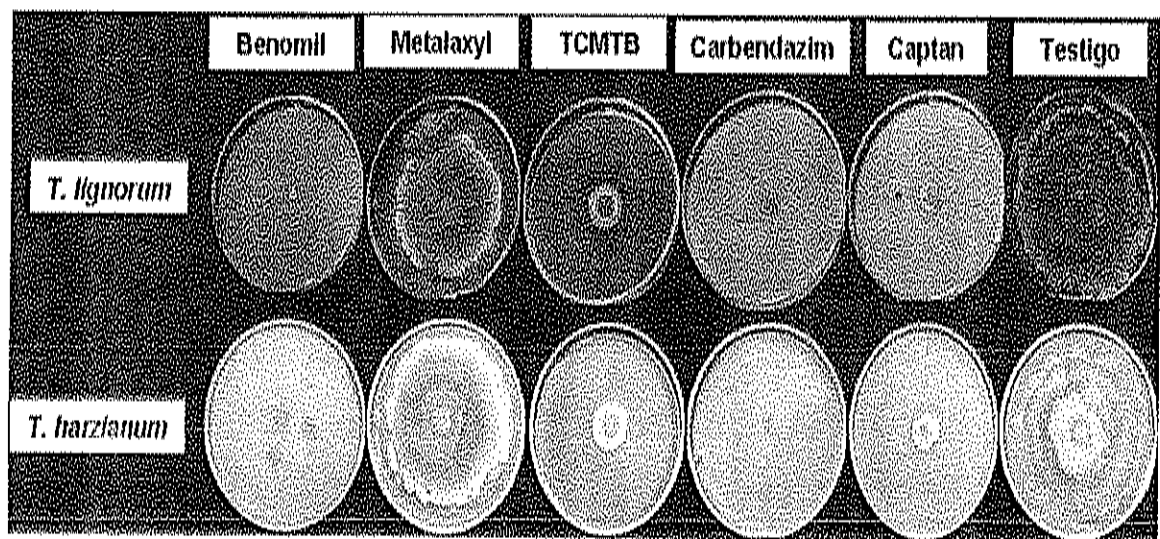


Figura 17. Efecto de los fungicidas a nivel *in vitro* sobre las dos especies de *Trichoderma* (*harzianum* y *lignorum*).

8.1.2.2. Bactericidas. En los resultados del ANOVA tanto de *T. harzianum* y *T. lignorum*, se puede observar que no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, de los p. químicos pero si en el tiempo, la diferencia entre estos dos antagonistas fue que en *T. harzianum* si se observaron diferencias significativas en la interacción doble P.químico*Tiempo, sin embargo en el caso de *T. lignorum* no hubo diferencias significativas (Cuadro 9 y 10- Figura 22), es decir, ningún bactericida afectó el desarrollo de las dos especies de *Trichoderma* evaluados, los cuales crecieron similares a su testigo con 9 cm de diámetro en su crecimiento micelial equivalentes al 100%.

Cuadro 9. Resultados obtenidos del ANOVA, referente al crecimiento micelial de *Trichoderma harzianum* en la aplicación de los bactericidas.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P
P.químico	5	0.721	0.144	1.91	0.143
Cajas(P.químico)	18	1.359	0.076	2.79	0.004
Tiempo	2	511.650	255.825	9462.03	0.000
P.químico*Tiempo	10	1.170	0.117	4.33	0.001
Error	36	0.973	0.027		
Total	71	515.873			

Cuadro 10. Resultados obtenidos del ANOVA, referente al crecimiento micelial de *Trichoderma lignorum* en la aplicación de los bactericidas.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P
P.químico	5	1.244	0.249	0.94	0.481
Cajas(P.químico)	18	4.781	0.266	4.02	0.000
Tiempo	3	625.849	20.616	3158.31	0.000
P.químico*Tiempo	15	1.836	0.122	1.85	0.050
Error	54	3.567	0.066		
Total	95	637.277			

La interacción (Figura 18 y 19) entre los antagonistas y los bactericidas muestran como el crecimiento del microorganismo a través del tiempo fue similar en todos los productos. Esto nos indica que tanto *T. harzianum* como *T. lignorum* son compatibles con todos los bactericidas evaluados, pudiéndose aplicar juntos sin que se afecte la población de éstos hongos antagonistas. Sin embargo aunque en el análisis estadístico no existe diferencias significativas entre ambos *Trichodermas* se puede observar a simple vista que *T. harzianum* mostró una ligera sensibilidad a los bactericidas en comparación con *T. lignorum*.

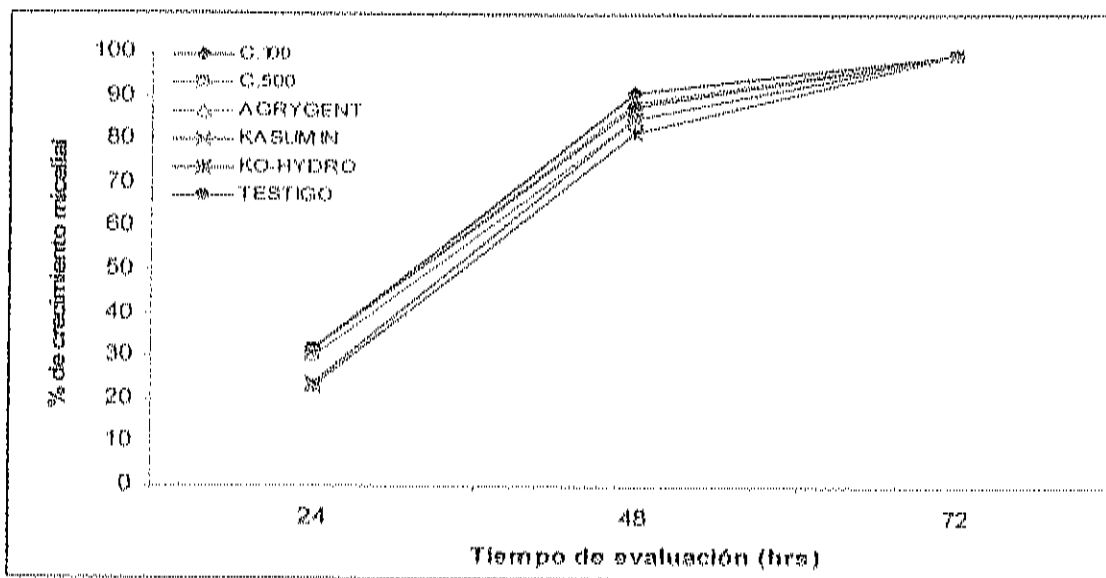


Figura 18. Interacción en el crecimiento micelial de *Trichoderma harzianum* con los bactericidas:

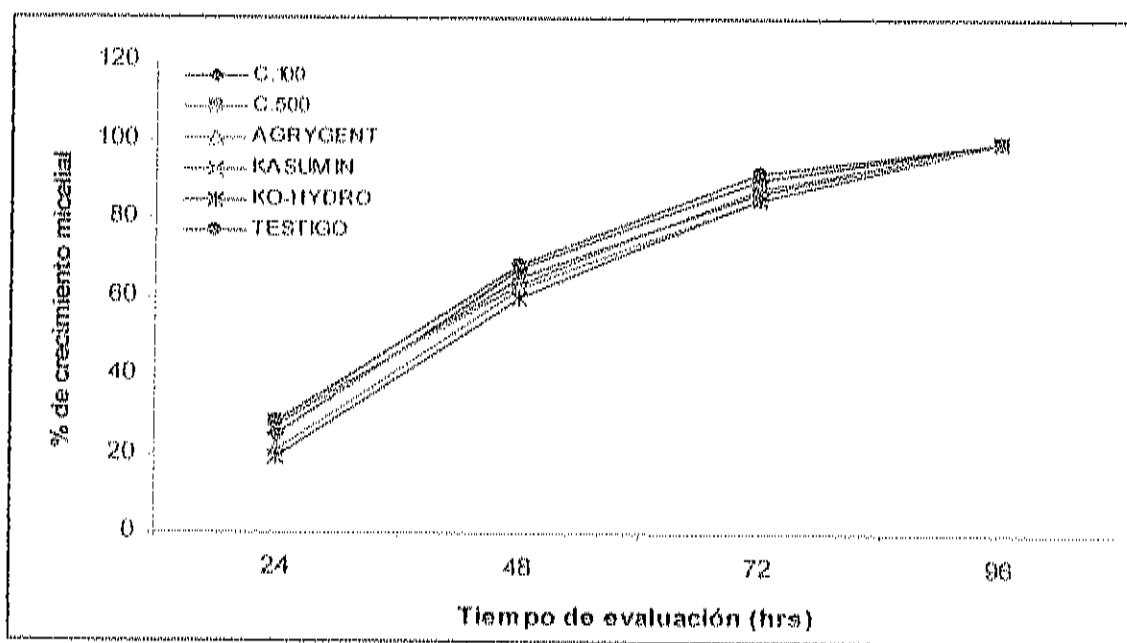


Figura 19. Interacción en el crecimiento micelial de *Trichoderma lignorum* con los bactericidas:

Dluzniéwska (2003), evaluó *in vitro* el efecto de un fungicida a base de oxiclóruo de cobre (Miedzian) en el crecimiento micelial y germinación de esporas en tres especies de *Trichoderma* (*harzianum*, *lignorum* y *pseudokoningii*) en tres concentraciones (10, 100 y 1000 ppm) y encontró que este fungicida no mostró efecto de inhibición en ninguna de las concentraciones evaluadas, así como en la germinación de esporas.

Domsch *et al.* (1980), mencionan que se han encontrado especies de *Trichoderma harzianum* en suelos con cobre acumulado y no han llegado a afectar su desarrollo. En este estudio se pudo observar que tampoco *T. lignorum* es dañada por el cobre y el resto de los bactericidas evaluados.

La razón por la que los bactericidas no dañan a este tipo de microorganismos como lo son los hongos, es por que estos antibióticos, actúan sobre sitios específicos de las bacterias, que los hongos no presentan. Además sus estructuras celulares son diferentes, en cuanto a tamaño, forma y rigidez de sus paredes.

La pared celular de los hongos contienen fundamentalmente polisacáridos dentro de los que destaca la quitina, la cual le confiere dureza a la membrana celular (Agrios, 2001), haciéndola más resistente a dichos productos. La mayoría de los bactericidas evaluados contienen antibióticos tales como; estreptomocina, oxitetraciclina, gentamicina y cobre, los cuales solo presentan mecanismos de acción sobre las estructuras de las bacterias, principalmente los tres primeros antibióticos.

Los datos mostrados en la Figura 20 y 21, presentan los efectos principales de *T. harzianum* y *T. lignorum* con los bactericidas, y se puede observar que no hubo diferencias significativas, en las dos especies de *Trichodermas*, en el efecto de los productos químicos.

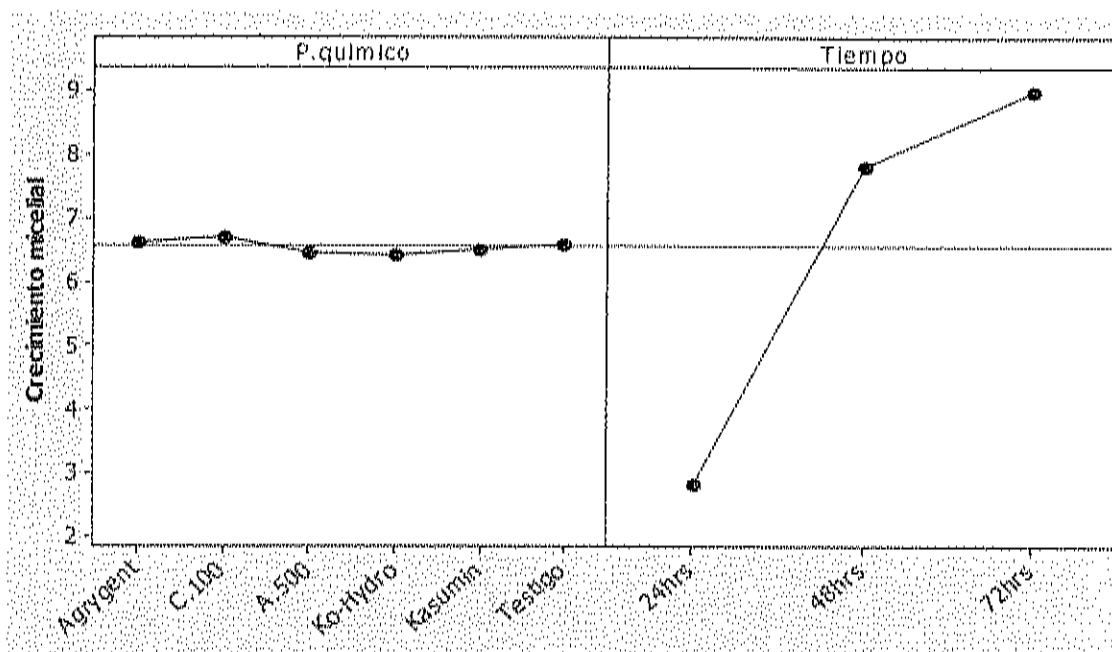


Figura 20. Efectos principales del crecimiento micelial de *Trichoderma harzianum* con los bactericidas.

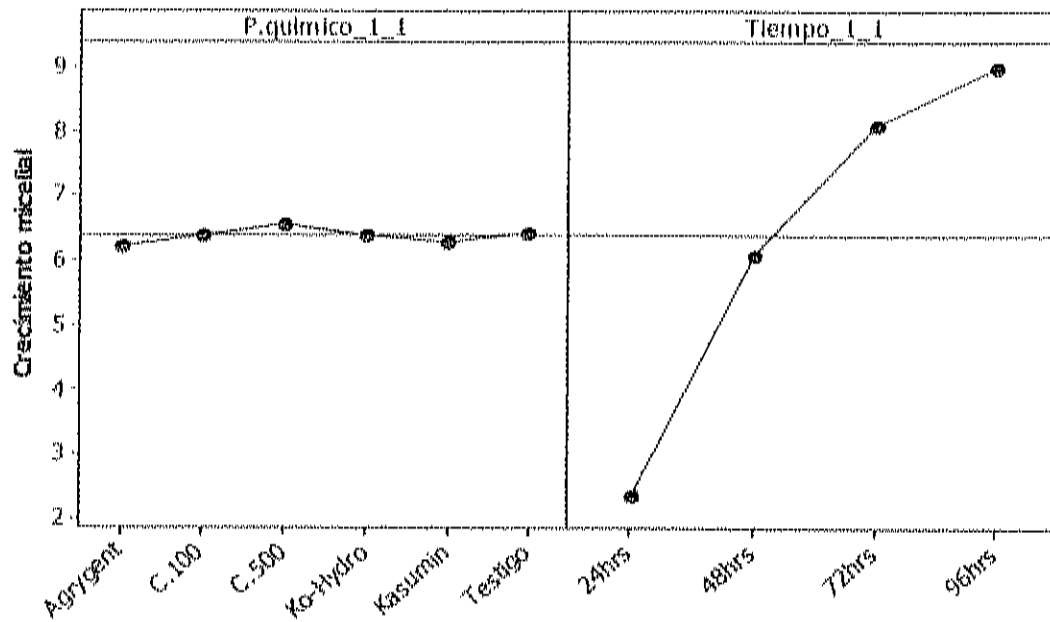


Figura 21. Efectos principales del crecimiento micelial de *Trichoderma lignorum* con los bactericidas.

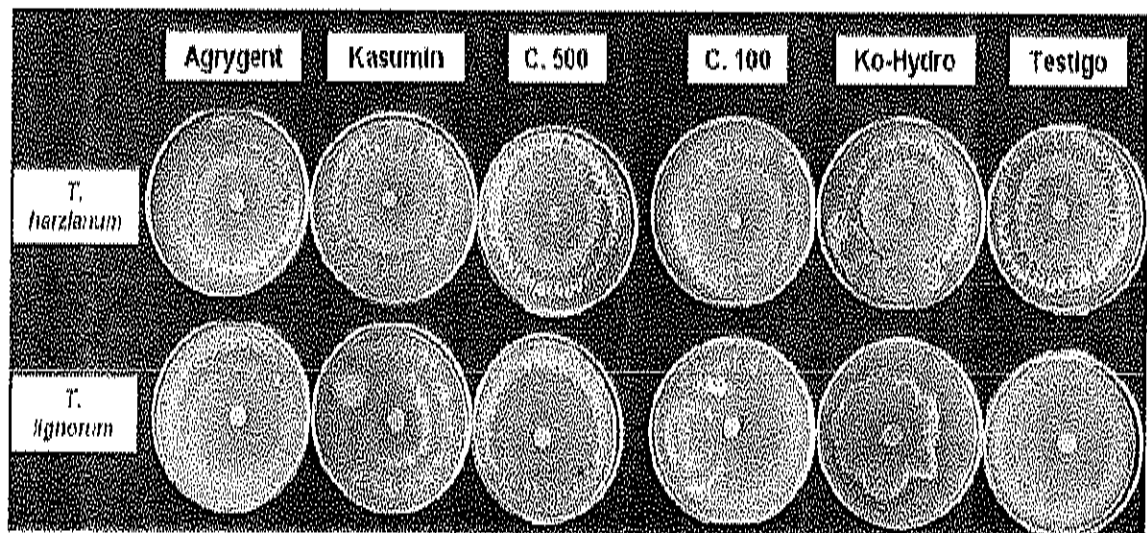


Figura 22. Bactericidas sobre el desarrollo micelial de las dos especies de *Trichoderma* (*harzianum* y *lignorum*).

8.3. Experimento 2. Fungicidas y bactericidas contra *Bacillus subtilis* y *Bacillus stearothermophilus*

En el experimento 2, se muestra el resultado del efecto que presentaron tanto los fungicidas como los bactericidas en el crecimiento bacteriano de las dos especies de *Bacillus* antagonistas.

8.3.1. Fungicidas.

Los resultados del análisis de varianza pueden mostrar que en los *Bacillus* y Químico así como en la interacción doble *Bacillus**Químico se presentaron diferencias significativas (Cuadro 11).

Cuadro 11. Resultados obtenidos del ANOVA, referente al crecimiento micelial de las dos especies de *Bacillus* en la aplicación de los fungicidas.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P
Bacillus	1	0.4669	0.4669	24.72	0.000
Químico	5	74.2058	14.8412	785.71	0.000
Bacillus*químico	5	6.8214	1.3643	72.23	0.000
Error	24	0.4533	0.0189		
Total	35	81.9475			

En las interacciones (Figura 23) se observa que en las evaluaciones de *B. stearothermophilus* y *B. subtilis*, los únicos fungicidas que inhibieron su crecimiento

fueron Captan 2.7 cm de inhibición (30% inhibición bacteriana) y TCMTB con 3.3 cm correspondientes al 37%. Esto tal vez se debió a que estos dos fungicidas están considerados como no selectivos, siendo de amplio espectro y por ende tienen la capacidad de causar cambios críticos en diferentes microorganismos del suelo, tanto fitopatógenos como antagonistas (Chen *et al.* 2001).

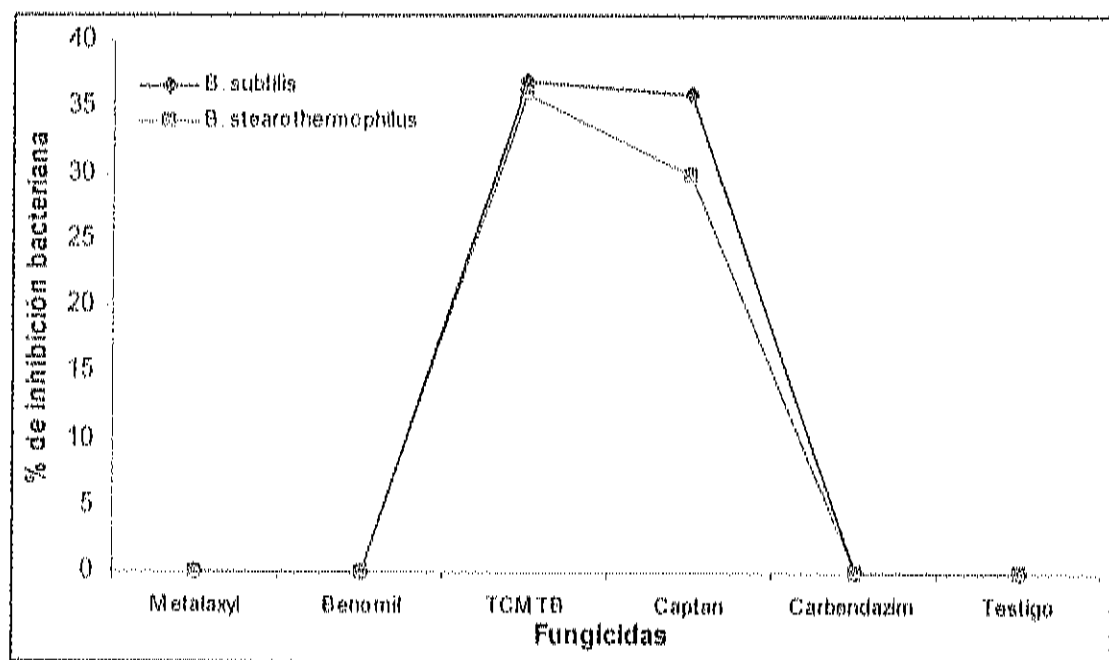


Figura 23. Interacción en la inhibición bacteriana de los *Bacillus* con los fungicidas

Los fungicidas restantes (Metalaxyl, Benomil y Carbendazim) se mostraron compatibles con dichos microorganismos, a pesar de que Benomil también se considera no selectivo, este no causó problema en el crecimiento de las dos especies de *Bacillus*, los cuales llenaron su caja presentando 100% de crecimiento bacteriano, igual a su testigo, presentando por lo tanto 0% de inhibición (Figura 25).

Prakasam (1999), menciona que tanto Benomil, como Carbedazim no actúan contra bacterias a pesar de ser fungicidas de amplio espectro y en este caso se corroboró lo dicho por este autor. Sin embargo TCMTB y Captan son productos fungicidas-bactericidas que actúan contra un amplio espectro de microorganismos.

La Figura 24 y 25 muestra los efectos principales, donde se observa que entre *B. subtilis* y *B. stearothermophilus* se presentaron diferencias significativas, al igual que en los fungicidas TCMTB y Captan con los demás productos químicos. Se ha mencionado que el mecanismo de acción de Captan sobre las bacterias es el de inhibir el proceso de respiración, deteniendo así su reproducción (NPIC, 2002).

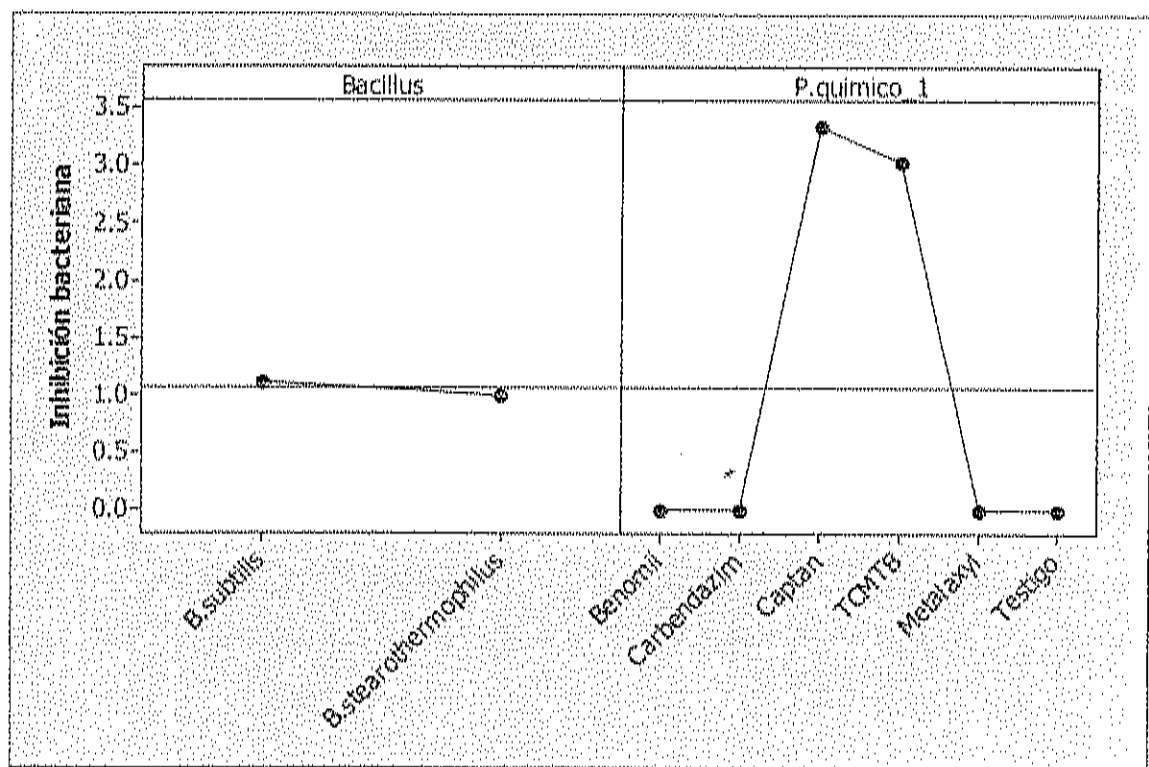


Figura 24. Efectos principales de la inhibición bacteriana de las dos especies de *Bacillus*

Los resultados mostrados indican que *B. subtilis* es un poco más sensible que *B. stearothermophilus*, debiéndose tal vez a las características distintivas de esta nueva especie de *Bacillus*, como lo es el poder soportar por más tiempo condiciones adversas como las altas temperaturas, debido a su habilidad para sintetizar constituyentes celulares que tiene gran estabilidad al calor, que los constituyentes sintetizados por mesófilos (Bodman y Welker, 1969).

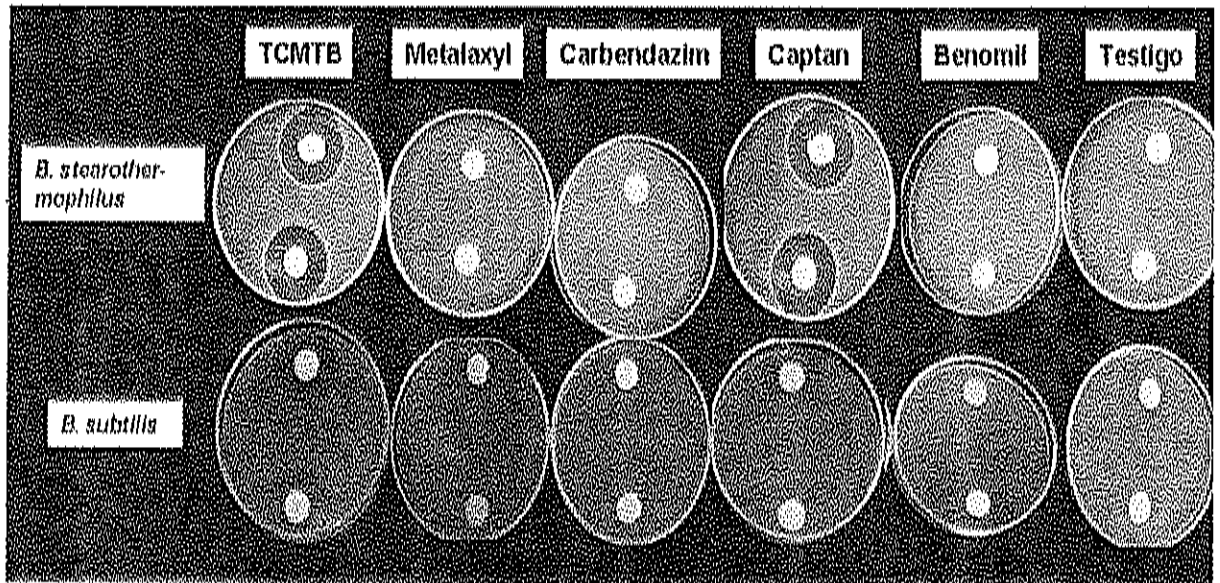


Figura 25. Efecto de los fungicidas sobre el crecimiento bacteriano de *Bacillus subtilis* y *Bacillus stearothermophilus*.

8.3.2. Bactericidas.

El ANOVA muestra diferencias significativas en la interacción doble *Bacillus**Químico *Bacillus* y Químico e (Cuadro 12).

Cuadro 12. Resultados obtenidos del ANOVA, referente al crecimiento micelial de las dos especies de *Bacillus* en la aplicación de los bactericidas.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P
Bacillus	1	12.1689	12.1689	56.52	0.000
Químico	5	163.1044	32.6209	151.50	0.000
Cajas(Químico)	12	8.7450	0.7288	3.38	0.001
Bacillus*Químico	5	8.3911	1.6782	7.79	0.000

En la interacción (Figura 26), la mayoría de los bactericidas presentaron cierto efecto de inhibición en las dos especies de *Bacillus* (*subtilis* y *stearothermophilus*). Sin embargo, el mayor efecto lo presentaron C. 500 (Sulfato de gentamicina + clorhidrato de oxitetraciclina + sulfato tribásico de cobre) con 3.7 cm (41% de inhibición bacteriana) en *B. subtilis* y 2.9 cm (33%) en *B. stearothermophilus*. En la estreptomycinina se presentó una inhibición de 1.6 cm (18%) en *B. subtilis* y 1.3 cm (14%) para *B. stearothermophilus*. Ko-Hydro (Hidróxido cúprico) presentó 3.7 cm (41%) en *B. subtilis* y 3.0 cm (34%) en *B. stearothermophilus*, de acuerdo a los resultados obtenidos, éstos dos bactericidas los más tóxicos para las dos especies de *Bacillus*. En ambos casos, *Bacillus subtilis* fue mucho más inhibido que *B. stearothermophilus*, lo que indica que

B. subtilis es más susceptible a dichos productos químicos. Estos resultados indican que el cobre es el principal producto que puede afectar el desarrollo de estas dos especies de antagonistas.

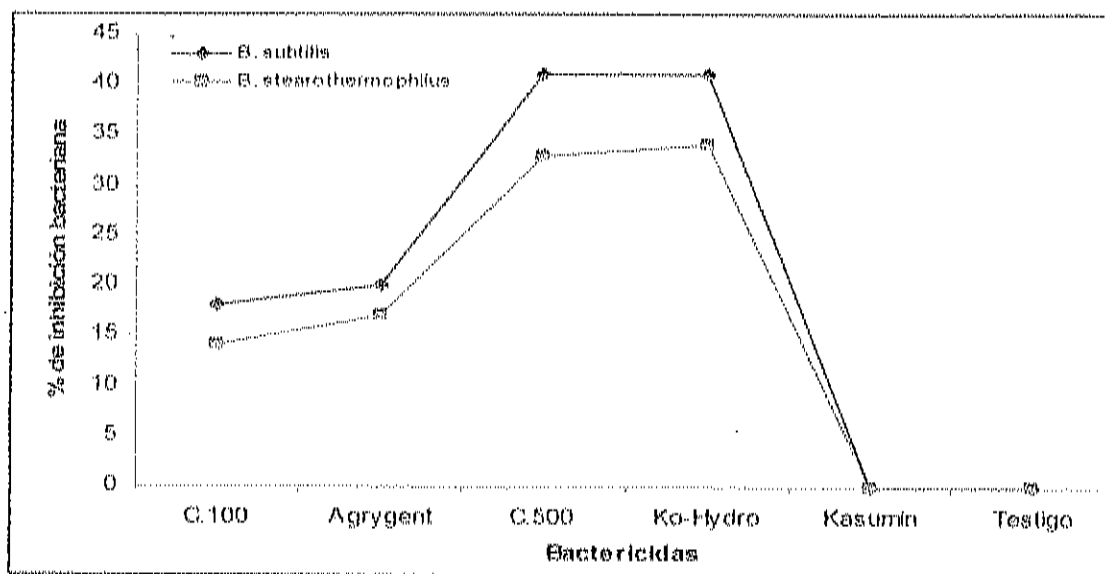


Figura 26. Interacción de la inhibición bacteriana de los *Bacillus* con los bactericidas.

En el caso de la estreptomycin, no podría estar actuando sobre los *Bacillus*, ya que se ha observado que la mayoría de las bacterias le son resistentes, debido a esto su uso es limitado, también se ha mencionado que este antibiótico no mata a la bacteria, si no que solamente inhibe su multiplicación, actuando así de una manera bacteriostática. La gentamicina aún no ha llegado a crear resistencia, por lo que todas las cepas son sensibles a ella, este antibiótico es transportado a través de la membrana celular de las bacterias, inhibiendo la síntesis de proteínas que son precursoras de enzimas bacterianas, las cuales degradan tejidos vegetales (Kiralv *et al.* 1974).

En el caso del cobre, se sabe, que es uno de los bactericidas más utilizados en el control tanto de hongos como de bacterias fitopatógenas. El mecanismo de acción que utiliza el cobre es que desnaturaliza proteínas celulares y desactiva sistemas enzimáticos en hongos y bacterias (USDA, 2001).

Investigaciones realizadas por Zwieter *et al.* (2004), aseguran que a pesar de que el cobre es un elemento esencial y muy requerido por todos los microorganismos, aún a bajas concentraciones llega a ser tóxico afectando la actividad biológica del suelo y su fertilidad.

Agrygent (Sulfato de gentamicina + clorhidrato de oxitetraciclina) en *B. subtilis*, presentó 1.8 cm de inhibición bacteriana que corresponde al 20%, mientras que en *B. stearothermophilus* fue de 1.6 cm (17%), en Cuprimicin 100 (Sulfato de estreptomycin + clorhidrato de oxitetraciclina) la inhibición fue de 1.6 cm (18%) en *B. subtilis* y 1.3 cm (14%) para *B. stearothermophilus*. El bactericida Kasumin (Kasugamicina) fue el único que no afectó a los *Bacillus*, presentando 100% de crecimiento bacteriano (Figura 26 y 28). Este producto es a base de una bacteria llamada *Streptomyces kasugaensis*, la cual puede ser compatible con las dos especies de *Bacillus*, ya que su crecimiento bacteriano no se vio afectado por dicho producto.

Son pocas las casas comerciales de productos biológicos que realizan estudios de compatibilidad de sus productos con fungicidas y bactericidas. En el caso de Syngenta Crop Protection (2005), ha realizado bioensayos de compatibilidad con su producto SERENADE (*B. subtilis*), con diferentes productos agroquímicos, entre ellos bactericidas a base de estreptomina, oxitetracilina e hidróxido cúprico, y según sus resultados todos presentaron compatibilidad con *B. subtilis*. Debido a esto, es importante que se vuelvan realizar pruebas, ya que en ocasiones los resultados no son los mismos y esto se corroboró en nuestro estudio, donde los tratamientos con bactericidas que contenían cobre, fueron los que inhibieron principalmente el crecimiento de los *Bacillus* antagonistas, es decir que no mostraron compatibilidad con nuestras bacterias antagonistas. También es importante mencionar que los efectos pueden variar de acuerdo al tipo de producto biológico (sólido o líquido), tipo de producto químico y sus compuestos coadyuvantes, etc.

Los efectos principales presentados en la Figura 27 y 28, muestran que entre las dos especies de *Bacillus* se presentaron diferencias significativas, ya que el efecto de los bactericidas fue diferente, afectando mayormente a *B. subtilis*. En el caso del bactericida Kasumin y el testigo, fueron los únicos que no afectaron el crecimiento bacteriano de los *Bacillus* no habiendo diferencias significativas entre ellos. En C. 100 solo se mostró una pequeña susceptibilidad de los *Bacillus* hacia dicho químico, sin embargo no tuvo diferencias significativas con el Kasumin y el testigo, mientras que Agrygent, C.500 y Ko-Hydro si fueron diferentes a ellos, más no entre si.

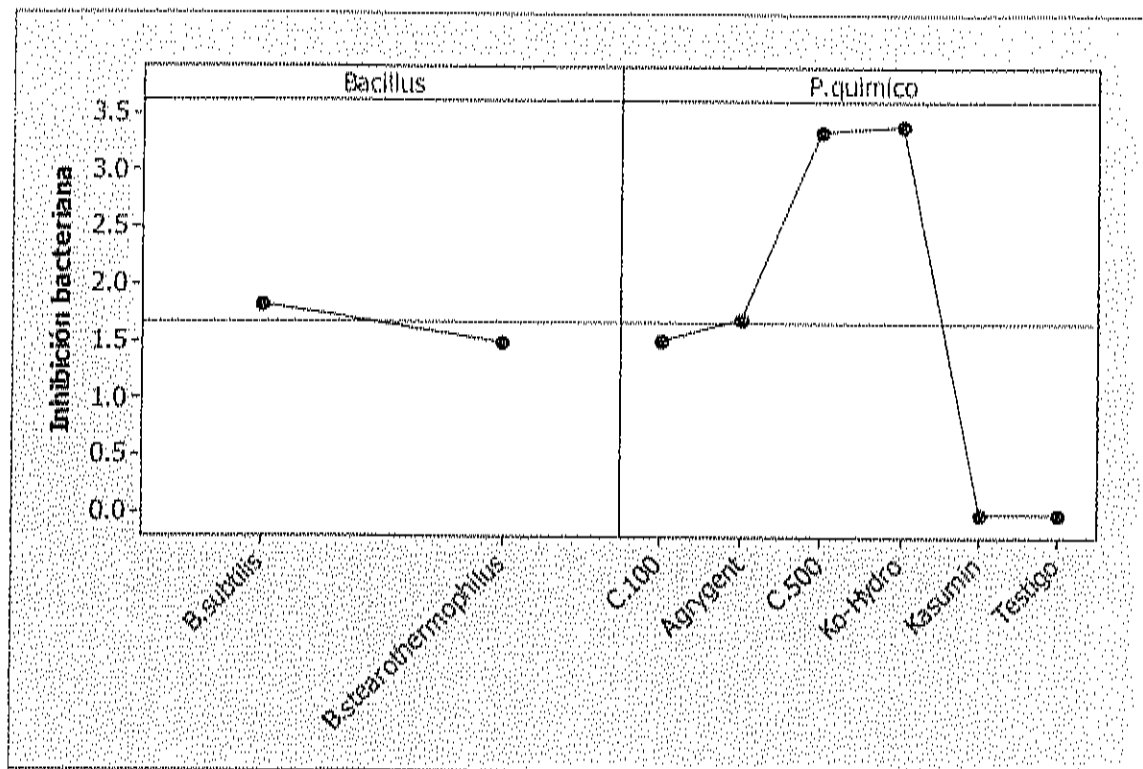


Figura 27. Efectos principales de la inhibición bacteriana en las dos especies de *Bacillus*

Estos resultados indican que C. 100 y Kasumin son más compatibles con ambas especies de *Bacillus* y que después de unos días se puede recolonizar con estos antagonistas, sin embargo en el caso del cobre se tendría que esperar más tiempo. Una de las ventajas de este bactericida es que no es un producto que se aplique al suelo, ya que de manera normal es aplicado principalmente al follaje.

Eeden y Korsten (2004), evaluaron el efecto de la aplicación de oxiclóruo de cobre y carbendazim en aguacate sobre la habilidad antagonista de *B. subtilis*. Los resultados obtenidos mostraron que cuando se dio la combinación de *B. subtilis* y carbendazim en

la caja petri, no se presentaron efectos de inhibición por parte del fungicida, dejando crecer al 100% a la bacteria antagonista, mientras que en el oxicloriguro de cobre mostró una zona de inhibición de 3.25 mm a la concentración de 100%, aunque no se observaron efectos visibles a bajas concentraciones. De acuerdo a estos resultados obtenidos en esta investigación, se señala que la combinación de formulaciones de cobre y el antagonista, pueden tener un efecto inhibitorio en el crecimiento del antagonista, siendo una mejor alternativa alternar estos dos controles.

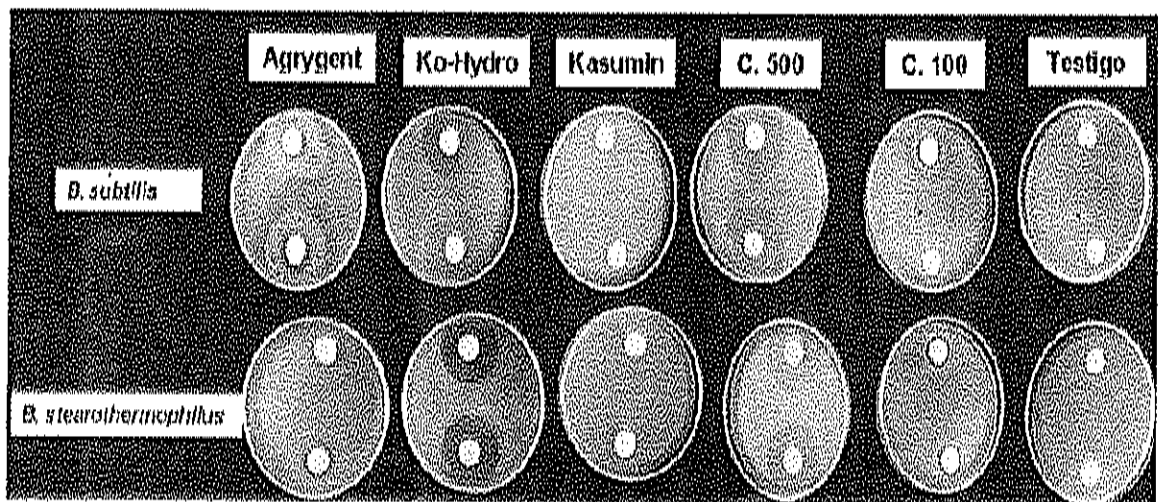


Figura 28. Bactericidas sobre el crecimiento bacteriano de *Bacillus subtilis* y *Bacillus stearothermophilus*.

8.4. Experimento 3. *B. subtilis* y *B. stearothersophilus* contra hongos fitopatógenos

Este experimento muestra el efecto de inhibición que presentaron las dos especies de *Bacillus* a través del tiempo sobre cada uno de los cuatro hongos fitopatógenos evaluados.

8.4.1. *Phytophthora capsici*

Los resultados del análisis de varianza mostraron diferencias significativas entre las dos especies de *Bacillus* y su testigo en el tiempo y en la interacción doble *Bacillus**tiempo (Cuadro 13). Cabe mencionar que en los cuatro fitopatógenos evaluados se muestran diferencias significativas entre los *Bacillus*, pero eso se debe a que el análisis estadístico toma al testigo como un *Bacillus* más, sin embargo entre los dos *Bacillus* evaluados (*subtilis* y *stearothersophilus*) no existen diferencias significativas, los cuales actuaron de manera similar en la inhibición de los fitopatógenos, pero sí las hay con respecto a su testigo.

Cuadro 13. Resultados obtenidos del ANOVA, referente al crecimiento micelial de *Phytophthora capsici* con las dos especies de *Bacillus*.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P
Bacillus	2	43.7403	21.8702	744.87	0.000
Tiempo	4	146.4393	36.6098	1246.88	0.000
Cajas (Bacillus)	9	1.1330	0.1259	4.29	0.001
Bacillus*Tiempo	8	17.3197	2.1650	73.74	0.000
Error	36	1.0570	0.0294		
Total	59	209.6893			

La interacción (Figura 29 y 31), en las dos especies de *Bacillus* evaluados, muestra una similitud en la inhibición de crecimiento micelial de *Phytophthora capsici* actuando de manera positiva, es decir controlando su crecimiento micelial, el cual a las 120 hrs (5 días) su testigo llenó completamente la caja petri (100% de crecimiento micelial), mientras el tratamiento con los *Bacillus* solo presentó 5 cm (55% de crecimiento micelial) correspondiendo a una efectividad del 45% tanto en *B. subtilis* como en *B. stearoothermophilus* disminuyendo así de manera importante el desarrollo de este hongo.

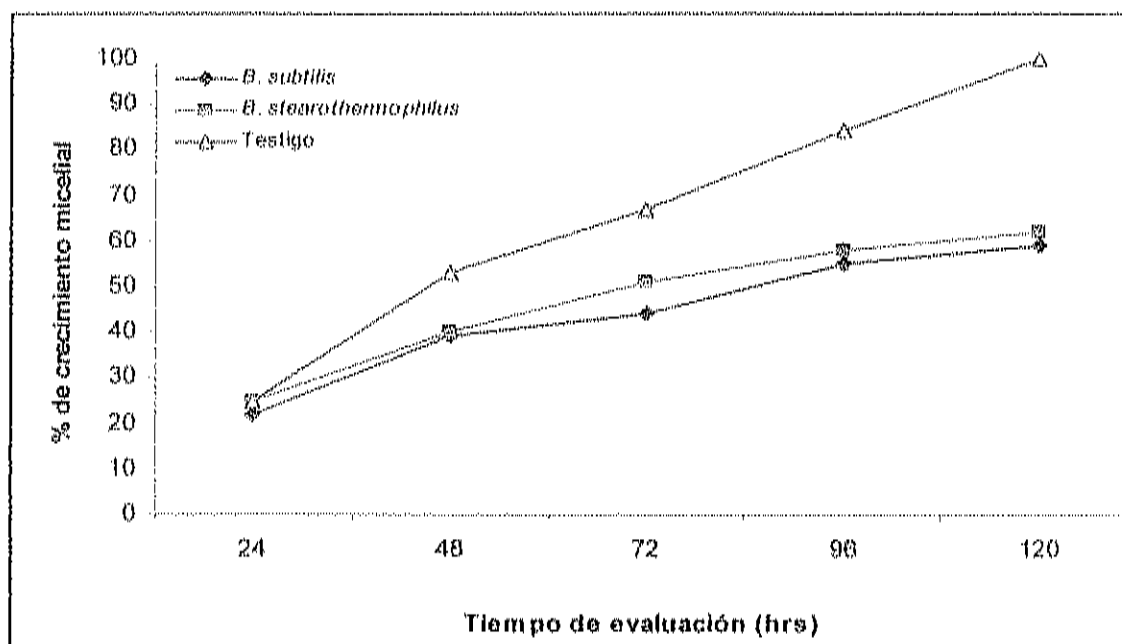


Figura 29. Interacción del crecimiento micelial de *Phytophthora capsici* con las dos especies de *Bacillus*.

Rafai (2003), menciona que *B. subtilis* libera compuestos antifúngicos tales como: la iturina, subtilina, bacilina, bacilomicina, subtenolina, entre otros, los cuales son polipéptidos que actúan sobre la pared celular de los hongos. Estos compuestos reaccionan y forman un complejo con las moléculas esteroides de la membrana celular de los fitopatógenos, donde se aumentan los canales de transportes de iones, alterándose la propiedad de permeabilidad y los iones potasio se escapan rápidamente, posterior a eso se inhibe la germinación de esporas o propagación del patógeno. Probablemente eso fue lo que ocurrió en *Phytophthora* al encontrarse en contacto con las células bacterianas de las dos especies de *Bacillus*, ya que al estar cerca el *Bacillus* y el crecimiento micelial del hongo fitopatógeno, este último detuvo su desarrollo.

La Figura 30, muestra los efectos principales del crecimiento de *P. capsici*, donde se muestra la diferencia del testigo, con los tratamientos con *Bacillus*, además del crecimiento micelial del hongo a través del tiempo.

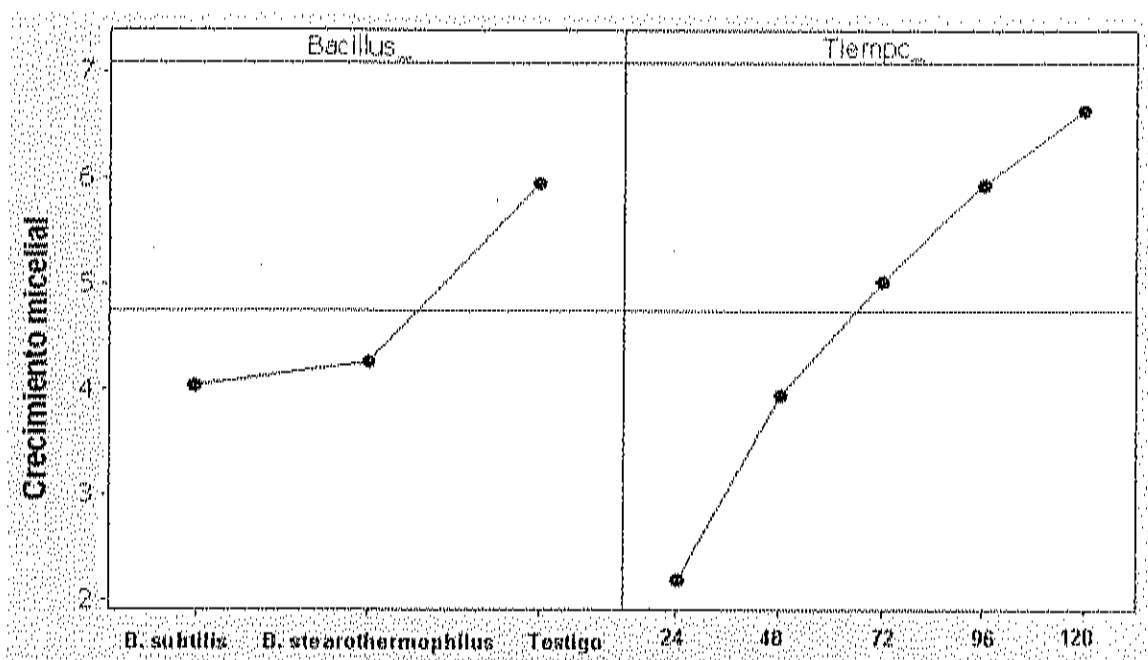


Figura 30. Efectos principales del crecimiento micelial de *Phytophthora capsici*

Bernal *et al.* (2002), Evaluaron el efecto antagónico de *Bacillus subtilis* sobre *Botrytis cinerea*, *Ralstonia solanacearum* y *Erwinia carotovora* var. *carotovora* a nivel *in vitro* y determinó el tipo de metabolito presente sobre dicha actividad antagónica por medio de fermentación sumergida. Sus resultados mostraron que este tipo de *Bacillus* presentaba de manera muy visible grandes zonas de inhibición en los tres microorganismos fitopatógenos, mostrando así gran actividad antagónica hacia ellos. En los bioensayos realizados para obtener el tipo de metabolito con actividad biocontroladora se determinó que pertenecía al grupo de las iturinas, las cuales constituyen una familia de lipopéptidos

excretados de varias cepas de *B. subtilis* cuando crecen en medio líquido, las cuales realizan agujero en las paredes celulares de los fitopatógenos. Este compuesto presenta una gran actividad antifúngica, sin embargo su actividad bactericida no ha sido estudiada a profundidad.

Lisboa (2003), determinó *in vivo*, la efectividad de *Bacillus subtilis* sobre la incidencia y severidad de la pudrición gris ocasionada por *Botrytis cinerea* en vid, logrando una eficiente reducción con valores cercanos a un 25% de disminución con respecto al testigo que fue de 50%. Actuando sobre la germinación de esporas, interrumpiendo el crecimiento del tubo germinativo y la formación de micelio.

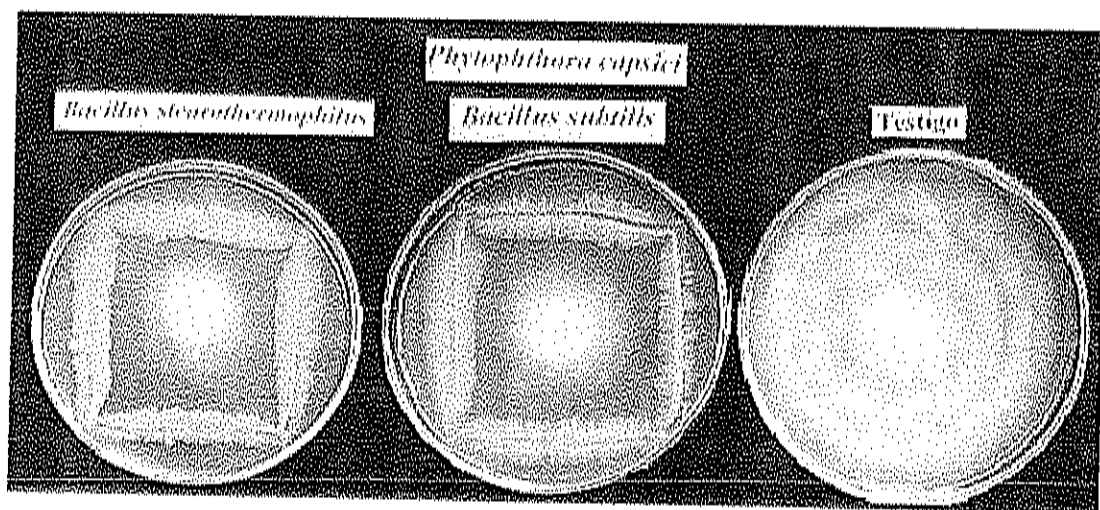


Figura 31. Bioensayo *in vitro* del efecto de las dos especies de *Bacillus* sobre *Phytophthora capsici*.

8.4.2. *Fusarium oxysporum*

Los resultados del ANOVA, muestran diferencias significativas en los *Bacillus*, Tiempo y la interacción doble *Bacillus**tiempo (Cuadro 14).

Cuadro 14. Resultados obtenidos del ANOVA, referente al crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* con las dos especies de *Bacillus*.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P
<i>Bacillus</i>	2	27.563	13.782	316.26	0.000
Tiempo	7	94.609	42.087	965.82	0.000
Cajas (<i>Bacillus</i>)	9	7.502	0.834	19.13	0.000
<i>Bacillus</i> *Tiempo	14	23.297	1.664	38.19	0.000
Error	63	2.745	0.044		
Total	95	355.717			

Como se puede observar en la interacción (Figura 32 y 34), de igual manera que en *P. capsici*, *Fusarium oxysporum* fue inhibido por los dos *Bacillus*, presentando su testigo 9 cm (100% de crecimiento micelial) a las 192 hrs (8 días), mientras que en los tratamientos con *Bacillus* fue de 5.3 cm (58%) en *subtilis* y 5.1cm (56%) en *stearothermophilus*, que corresponden al 42 y 44% de efectividad respectivamente.

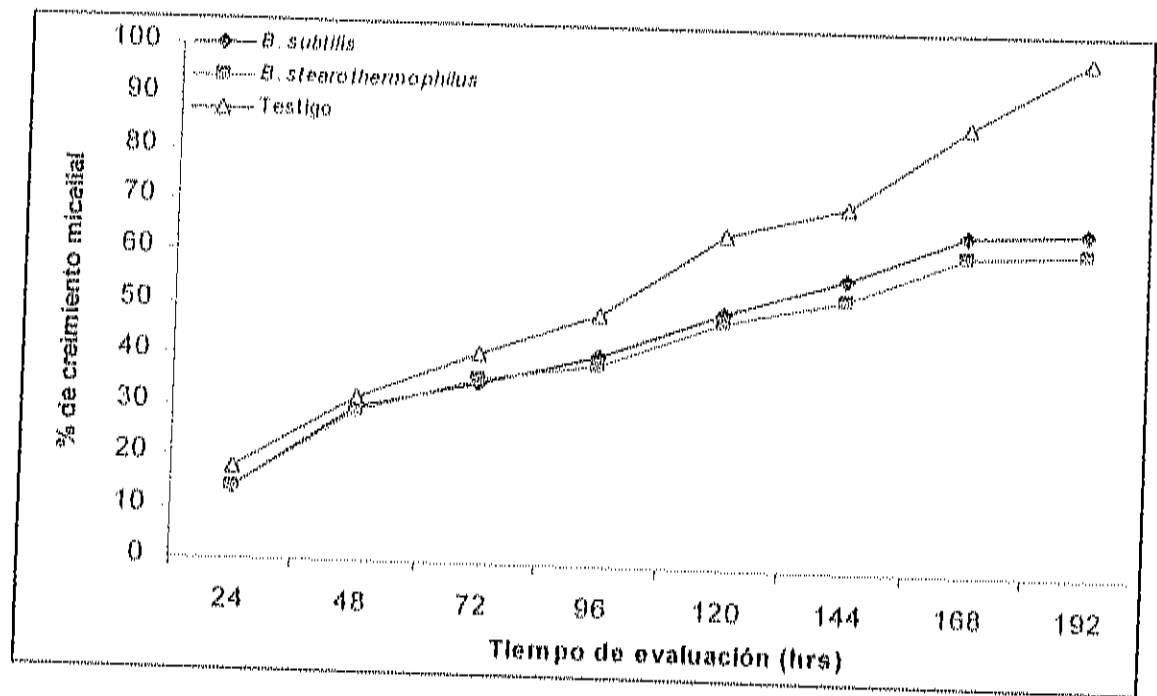


Figura 32. Interacción del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* con las dos especies de *Bacillus*.

Torres *et al.* (2001), realizaron pruebas *in vitro* con *B. subtilis* aislados de plátano y arroz, determinando el efecto de inhibición sobre fitopatógenos del suelo tales como *F. oxysporum*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Phytophthora nicotianae*, *F. moniliforme* y *F. solani*, demostrando una gran capacidad de inhibición mayor al 40% en su crecimiento micelial.

Foldes *et al.* (2000), aislaron de la rizosfera de cereales varias especie de *Bacillus*, las cuales identificaron y realizaron estudios *in vitro* sobre diferentes microorganismos fitopatógenos (hongos y bacterias). La mayoría de las especies de *Bacillus* encontradas pertenecieron a la especie *subtilis*, y dentro de los hongos fitopatógenos evaluados se

encontró a *Fusarium oxysporum*. El cual al ponerlo en contacto con la bacteria antagonista mostró un 60% de inhibición micelial.

La Figura 33 muestra los efectos principales de los *Bacillus* con *F. oxysporum* mostrando las diferencias significativas entre los tratamientos con las dos especies de *Bacillus* y su testigo. Además de mostrar el crecimiento del fitopatógeno a través del tiempo.

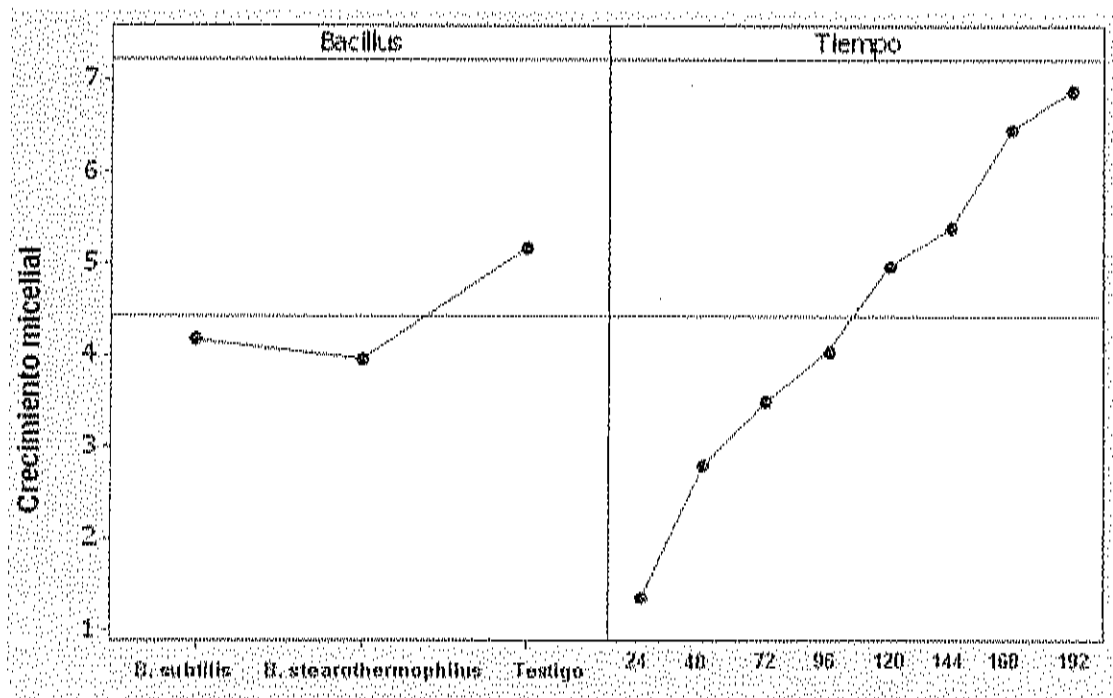


Figura 33. Efectos principales del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*

Solis y Sosa (1996), determinaron el grado de control de *B. subtilis* sobre *F. oxysporum* en 4 variedades de arveja, estableciendo los costos de producción y rentabilidad de dicho control, determinando que *B. subtilis* ejerció buen control sobre *F. oxysporum*, sobre todo en la variedad Oregon, la cual fue la que obtuvo mejor rendimiento (6.81 Tm/ha) y presentó los menores porcentajes de incidencia de este fitopatógeno (4%).

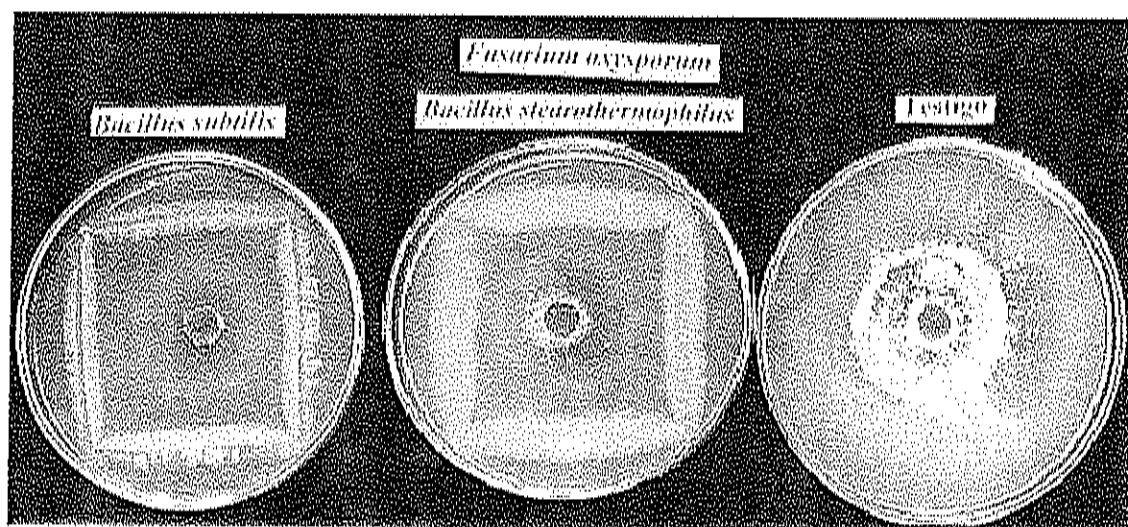


Figura 34. Efecto de las dos especies de *Bacillus* sobre *Fusarium oxysporum*

8.4.3. *Pythium aphanidermatum*

En los resultados del ANOVA se observan las diferencias significativas que se presentaron en el Tiempo y en la interacción doble *Bacillus**Tiempo (Cuadro 15).

Cuadro 15. Resultados obtenidos del ANOVA, referente al crecimiento micelial de *Pythium aphanidermatum* con las dos especies de *Bacillus*.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P
Bacillus	2	3.6775	1.8388	2.14	0.259
Tiempo	1	30.3750	30.3750	44.92	0.022
Cajas (Bacillus)	9	1.9325	0.2147	6.84	0.004
Bacillus*Tiempo	2	1.3525	0.6762	21.54	0.000
Error	9	0.2825	0.0314		
Total	23	37.6200			

En la interacción (Figura 35 y 37), se observa que *P. aphanidermatum* fue el único que no fue inhibido por ambas especies de *Bacillus*, creciendo de manera similar al testigo a través del tiempo (100 % de crecimiento micelial), presentando una efectividad del 0%.

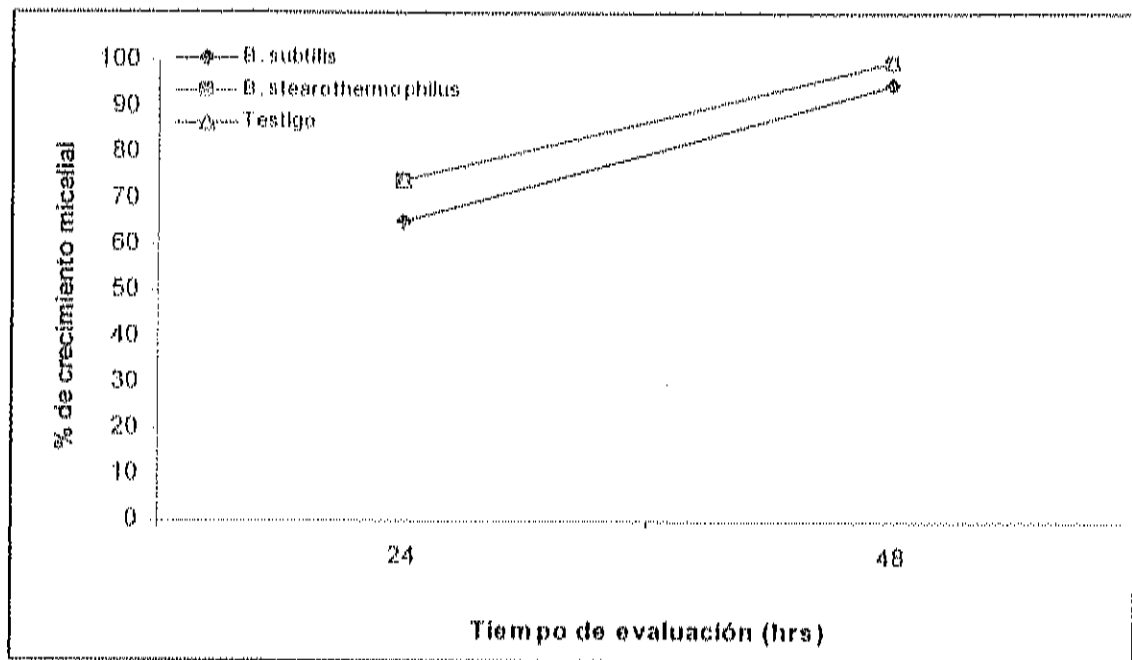


Figura 35. Interacción del crecimiento micelial de *Pythium aphanidermatum* con las dos especies de *Bacillus*.

Es importante conocer este resultado, ya que en ocasiones en las etiquetas de los productos comerciales se señala que los bioplaguicidas a base de *B. subtilis* son efectivos contra varios fitopatógenos entre ellos los hongos pertenecientes al orden de los oomicetes, sin embargo, no especifican contra cuales y como se pudo observar en este trabajo de investigación, *B. subtilis* es efectivo contra *Phytophthora capsici* más no contra *Pythium aphanidermatum*, y si no se tiene conocimiento de esto, muchos agricultores pueden realizar aplicaciones de productos biológicos con *B. subtilis* o *B. stearothermophilus* contra *Pythium aphanidermatum* y no tener los resultados esperados.

En los efectos principales, este hongo no mostró diferencias significativas respecto a los tratamientos con los *Bacillus*, llenando la caja petri a las 48 hrs (Figura 36 y 37). A pesar de que se ha comprobado que *B. subtilis* es efectivo contra diferentes especies de oomicetes, en este caso se demostró que en el caso de *Pythium aphanidermatum* no presentó efecto de inhibición sobre dicho fitopatógeno, dejando en claro que *B. subtilis* solo actúa sobre algunas especies de hongos, ya que algunos presentan estructuras de su cuerpo o talo muy resistentes, que no son tan fáciles de degradar por los antagonistas, además de su tener un crecimiento demasiado rápido.

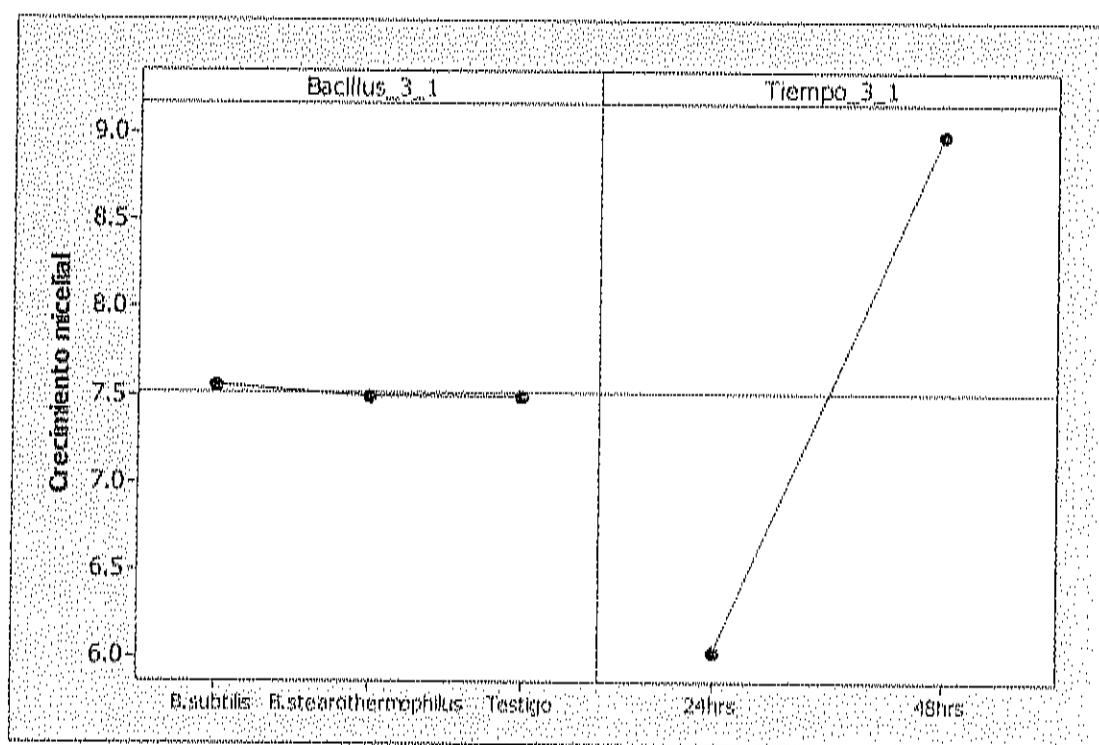


Figura 36. Efectos principales del crecimiento micelial de *Pythium aphanidermatum*

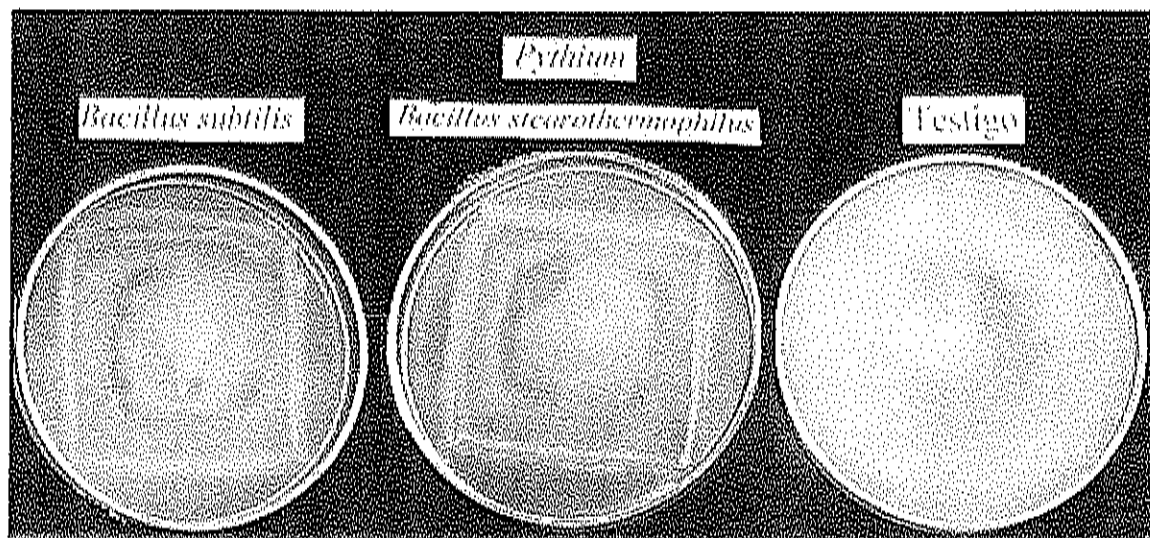


Figura 37. Efecto de la inhibición de los *Bacillus* sobre *Pythium aphanidermatum*

8.4.4. *Rhizoctonia solani*

Los resultados arrojados en el ANOVA muestran que existen diferencias significativas en las especies de *Bacillus*, sin embargo, esto quiere decir que entre las especies de *Bacillus* no hay diferencias significativas, pero si en relación al testigo y en la interacción doble *Bacillus**tiempo (Cuadro 16).

Cuadro 16. Resultados obtenidos del ANOVA, referente al crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* con las dos especies de *Bacillus*

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P
Bacillus	2	71.2679	35.6340	6.82	0.027
Tiempo	3	67.0273	22.3424	4.33	0.060
Cajas(Bacillus)	9	0.6594	0.0733	6.99	0.000
Bacillus*Tiempo	6	30.9521	5.1587	491.95	0.000
Error	27	0.2831	0.0105		
Total	47	170.1898			

En las interacciones de las Figura 38 y 40, se presenta que *Rhizoctonia solani* creció 4 cm (47%), tanto en *B. subtilis* como en *B. stearothermophilus* a las 96 hrs, tiempo en el que el tratamiento testigo llenó la caja petri (100%), teniendo una efectividad del 53%, mayor que con los fitopatógenos anteriores, demostrando este patógeno ser aun más susceptible a *B. subtilis*. Además se pudo observar que este fitopatógeno fue uno de los más inhibidos por ambas especies de *Bacillus*.

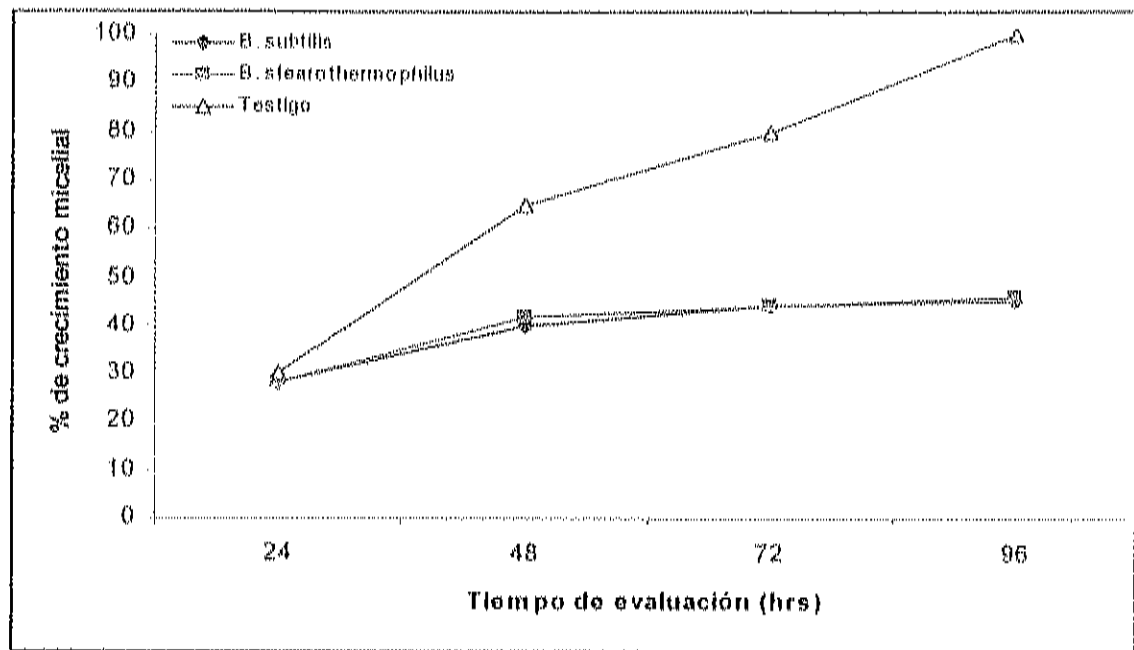


Figura 38. Interacción del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani*, con las dos especies de *Bacillus*.

Estudios similares a este, realizados por Bonacic (2003), muestran los mismos efectos. Ellos evaluaron a nivel *in vitro* diferentes cepas de *Bacillus subtilis* contra *Rhizoctonia solani*, el cual es un fuerte problema en el cultivo de algodón provocando la enfermedad conocida como "Damping off". Los resultados obtenidos en este experimento muestran un efecto de inhibición del 60% de *Bacillus subtilis* sobre el fitopatógeno, el cual solo presentó un 40 % de crecimiento micelial en comparación con su testigo que fue de 100% al cabo de las 96 hrs, cuando éste llenó completamente la caja petri.

En los efectos principales (Figura 39), se demostró que no hay diferencias significativas entre los dos *Bacillus*, pero si con el testigo, también se observó el crecimiento de *R. solani* al paso de los días, hasta las 96 hrs de evaluación.

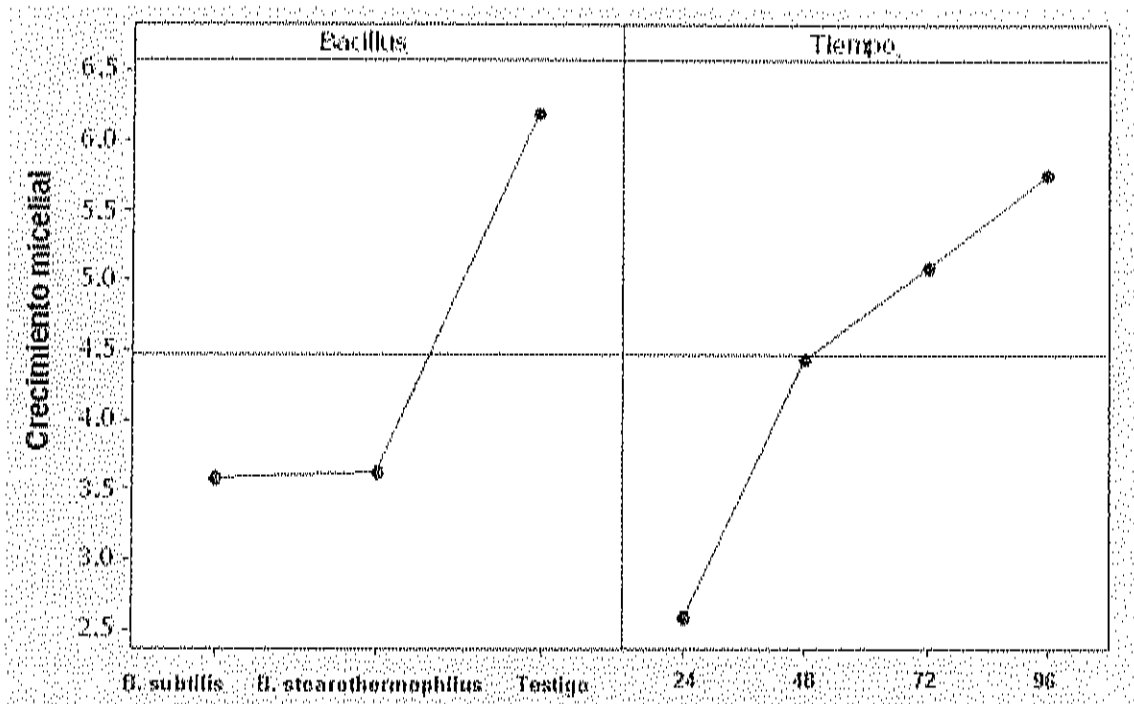


Figura 39. Efectos principales del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani*

Montealegre *et al.* (2003), aislaron bacterias de la rizosfera de plantas de tomate y las evaluaron a nivel *in vitro* para obtener cepas antagonicas a *Rhizoctonia solani*, así como determinar el mecanismo de acción de estas bacterias antagonistas sobre su huésped. En los resultados obtenidos, se mostraron 30 cepas bacterianas que fueron las que se obtuvieron de los aislamientos, de la cuales solo tres mostraron efectos antagonicos contra *Rhizoctonia solani*, estando entre ellas el género *Bacillus subtilis*, el cual se sembró en los extremos de la caja y posteriormente el hongo en el centro, presentando

un 48% de inhibición micelial (15.4 mm), Durante este ensayo, no se observó contacto físico por parte de ambos microorganismos, sin embargo, si se observó un halo de inhibición, provocado por metabolitos fungistáticos secretados por la bacteria, principalmente Iturina. Además se observó un cambio en el color de las hifas de *Rhizoctonia* presentándose un café oscuro resultado de una vacuolización y deformación de hifas del fitopatógeno.

El hongo *R. solani*, reduce el crecimiento micelial y se inhibe la formación de esclerocios por antibiosis cuando es enfrentado contra *B. subtilis* en cajas petri (Rodríguez, 2000).

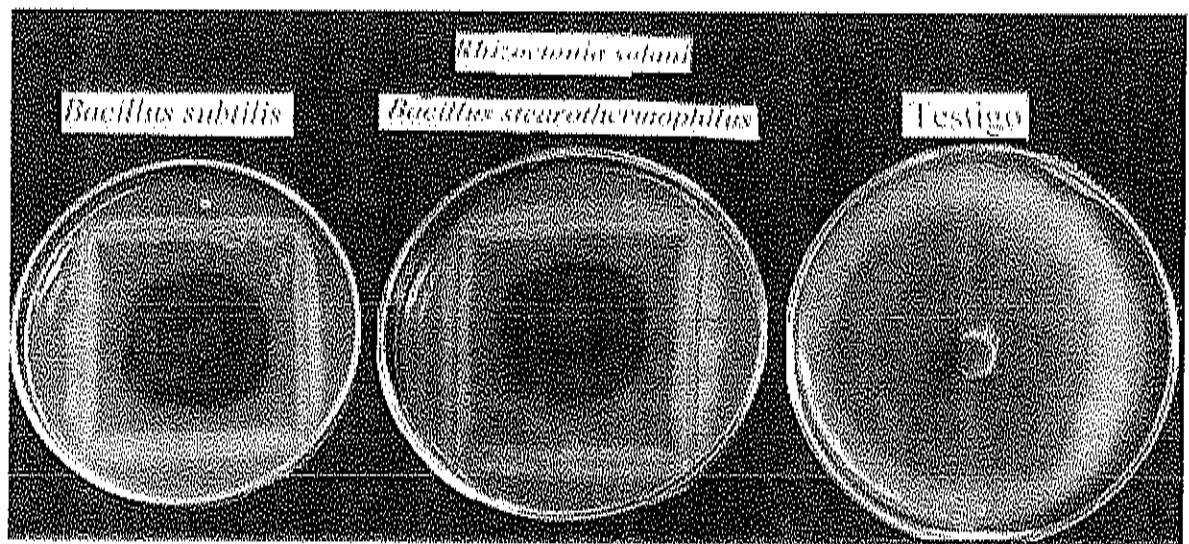


Figura 40. Bioensayo *in vitro* del efecto de los *Bacillus* sobre el crecimiento micelial de *R. solani*.

8.5. Experimento 4. Porcentaje de viabilidad de los productos biofungicidas a base de hongos y bacterias antagonistas.

A continuación se muestran los resultados que se obtuvieron en el experimento cuatro al determinar que la cantidad de UFC/mL presentes en el producto biofungicida fuera la señalada en la etiqueta del mismo, para esto se inició primeramente con los productos a base de *Trichoderma* y posteriormente con los biofungicidas a base de *Bacillus*.

8.5.1. *Trichoderma* spp

El único producto a base de *Trichoderma* que resultó tener la cantidad y calidad esperada en cuanto a la viabilidad de UFC/ml que se indicaban en la etiqueta lo presentó el producto comercial, T-22 (*Trichoderma harzianum*), el cual presenta en su etiqueta una concentración de esporas de 1×10^7 lo que significa 10, 000,000 millones de UFC/ml. En el presente estudio, este producto mostró un 100% de viabilidad en sus esporas, determinándose una viabilidad de esporas de 10, 466, 667 UFC/ml, contando con una viabilidad superior al 100%.

En el producto Biotrol (*T. lignorum*), la etiqueta señala una concentración de esporas de 2×10^7 equivalentes a 20, 000,000 de UFC/ml, sin embargo dicha cantidad no fue encontrada en el producto, observándose tan solo 2×10^6 , lo que es igual 2, 700, 067 UFC/ml, correspondientes al 13.5% de viabilidad, porcentaje no válido para la calidad del producto (Cuadro 17, Figura 41). Estos resultados indican que algunas veces el método de control a base de microorganismos antagonistas no es tan efectivo para

combatir el problema de enfermedades en las plantas, debido a que los productos biológicos no cumplen con las poblaciones de esporas que señalan en la etiqueta.

Cuadro 17. Formulación y concentración de los productos biológicos evaluados a base de *Trichoderma* spp (UFC/ml).

Producto	Microorganismo antagonista	Cantidad señalada en etiqueta	Cantidad encontrada	% de viabilidad
T-22	<i>T. harzianum</i>	1×10^7 10,000,000	1×10^7 10,466,667	100%
Biotrol.	<i>T. lignorum</i>	2×10^7 20,000,000	2×10^6 2,700,067	13.5%
Trichodef.	<i>T. harzianum</i>	1×10^{11} 100,000,000,000	0	0%
LITHAN.	<i>Trichoderma</i> spp	2×10^8 200,000,000	2×10^6 2,668,937	1.33%
Tricho-sin.	<i>T. harzianum</i>	1.2×10^{12} 1,200,000,000,000	2×10^9 2,312,756,667	0.19%

Trichodef y Tricho-sin fueron los productos que no se logró obtener prácticamente esporas viables. En el caso de Trichodef su etiqueta señalaba una concentración de 1×10^{11} (100,000,000,000 de UFC/ml), mientras que en el bioensayo de viabilidad no se presentó viable ninguna unidad formadora de colonia, presentando de esta manera 0% de viabilidad. En el caso de Tricho-sin, tampoco se presentó la cantidad de UFC/ml señalada, la cual era de 1.2×10^{12} , sin embargo, la cantidad encontrada fue de 2×10^9 (2000,000,000 UFC/ml), la cual sigue siendo una concentración alta para ser aplicada en un método de control biológico. El producto LITHAN, presentó en su etiqueta una concentración de esporas de 2×10^8 , teniendo en realidad 2×10^6 , lo cual correspondía tan solo a 1.33% de viabilidad, (no eficaz en control). En este caso el tipo de formulación y

el tiempo de fabricación de los productos en los que influye en gran medida para que los productos biológicos pierden poco a poco o en forma muy rápida su viabilidad. Al respecto, las formulaciones a base de aceite fueron los más inadecuados para mantener a las esporas viables.

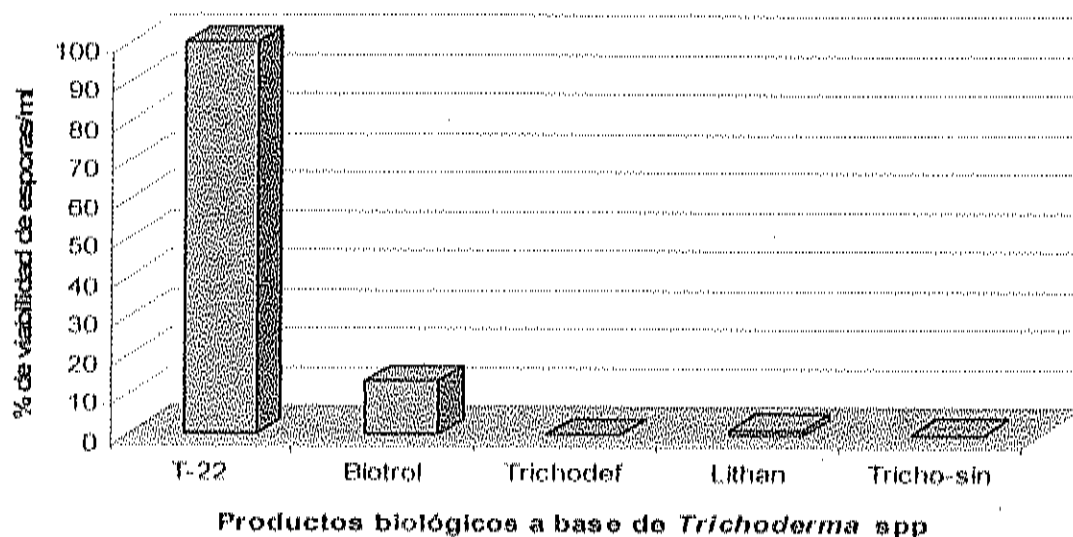


Figura 40. Porcentaje de viabilidad de productos bioplaguicidas a base de *Trichoderma* spp más utilizados en el método de control biológico.

8.5.2. *Bacillus* spp

Para el caso de los productos a base de bacterias antagonistas, ninguno presentó la calidad expresada en la etiqueta del envase, ya que todos mostraron un 0% de viabilidad, solo en el tratamiento con Biológico (*Bacillus subtilis*), se observó un 10% de viabilidad. (Cuadro 18, Figura 42).

Actualmente existen en el mercado muchos productos bioplagueicidas que pueden ser una alternativa para el control de varios fitopatógenos; sin embargo, muchos de ellos se producen de forma incorrecta, ya que no se tienen los cuidados necesarios en cuanto a las condiciones en las que se deben manejar. Hay que mencionar que se debe tener cuidado en cuanto a la fecha de elaboración y la fecha de caducidad, la mayoría de los productos tiene una duración de un año máximo. Después de ese tiempo la viabilidad de las esporas no es la misma, y poco a poco disminuye.

Cuadro 18. Formulación y concentración de los productos biológicos evaluados a base de bacterias (ufc/ml)

Producto	Microorganismo antagonista	Cantidad señalada en etiqueta	Cantidad encontrada	% de viabilidad
Probacil.	<i>Bacillus subtilis.</i>	1×10^8 100,000,000	15,000	0.015%
Biopak.	<i>Bacillus,</i> <i>Pseudomonas,</i> <i>Streptomices,</i> <i>Trichoderma,</i> <i>Gliocladium. Sp.</i>	4×10^{11} 400,000,000,000	11,338,597	0.003%
Macrobe plus.	<i>B. subtilis, B. stearothermophilus</i> <i>Pseudomona a.</i>	5×10^8 500,000,000	170,629	0.034%
Agrobacilo.	<i>Bacillus subtilis.</i>	10^{10} 10,000,000,000	2,440,373	0.02%
Biologic.	<i>Bacillus subtilis.</i>	1.5×10^{10} 15,000,000,000	1,605,722,667	10.7%

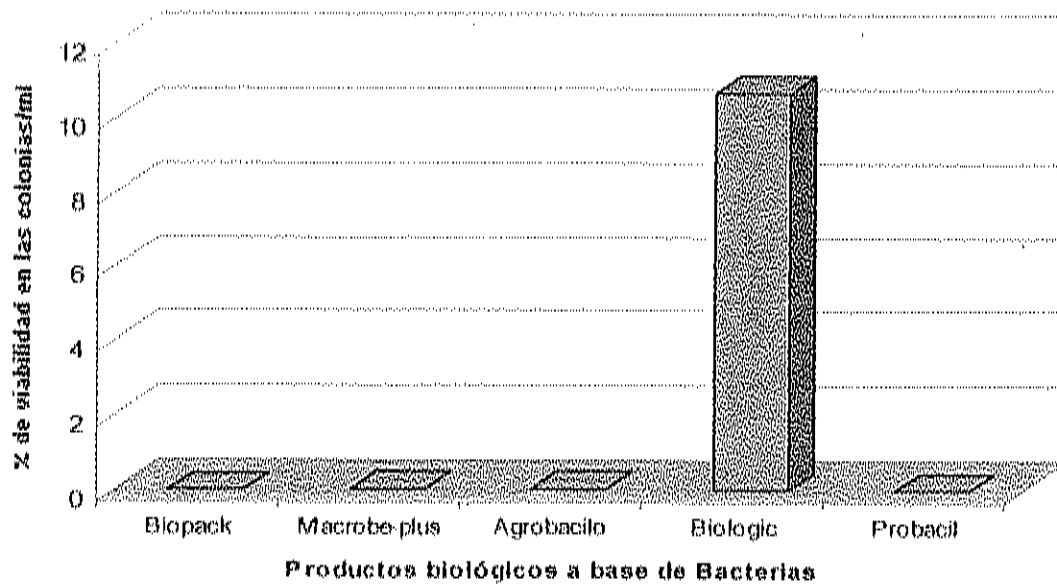


Figura 42. Porcentaje de viabilidad de productos bioplaguicidas a base de bacterias antagonistas más utilizados en el método de control biológico.

IX. CONCLUSIONES

- ❖ El fungicida Metalaxyl fue el único que mostró compatibilidad con las dos especies de *Trichoderma* (*harzianum* y *lignorum*), mientras que Carbendazim, Benomil y Metalaxyl fueron compatibles con las dos especies de *Bacillus* antagonistas.

- ❖ Todos los bactericidas (C.100, Agrygent, Ko-Hydro, C.500 y Kasumin) fueron compatibles con *T. harzianum* y *T. lignorum*, mientras que en el caso de las dos especies de *Bacillus* (*subtilis* y *stearothermophilus*) solo C.100, Agrygent y Kasumin mostraron compatibilidad con dichos antagonistas.

- ❖ La cepa de *B. stearothermophilus* muestra un efecto similar de inhibición sobre los fitopatógenos *P. capsici*, *R. solani* y *F. oxysporum* al de *B. subtilis*, además de mostrar menos susceptibilidad a los fungicidas y bactericidas.

- ❖ Benomil, TCMTB y Captan mostraron una eficacia del 100% sobre *P. capsici*, *R. solani* y *F. oxysporum*.

- ❖ Solo el producto T-22 presentó 100% de viabilidad en sus esporas. Sin embargo, a pesar de que el producto Tricho-sin y Biologic, no presentan la concentración señalada en la etiqueta, pueden ser efectivos al aplicarse contra los fitopatógenos, ya que su concentración sigue siendo alta.

X. BIBLIOGRAFÍA CITADA

Agrios, G. N. 2001. Fitopatología, sexta reimpression de la segunda impresion, 2da. edicion. Editorial Limusa. Grupo Noriega Editores, Balderas 95, México D.F., pp. 118-120.

Álvarez, M. 2000. Evaluación de los principales productos que se utilizan para desinfectar el suelo y los transplantes. Revista Productores de Hortalizas, pp. 30 - 31.

Barreto, P. M. 1999. El tomate, la hortaliza de excelencia en exportación. Revista Claridades Agropecuarias; edit. Abriendo surcos. México D. F., pp. 1-15.

Barreto, H. C. 2001. Manual para el control y aseguramiento de la calidad e inocuidad de frutas y hortalizas frescas, San Salvador, el Salvador, pp. 1-10.

Benitez, T., Rincón, M. A., Limón, M. C. and Codón, C. A. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. Department of genetics, university of Sevilla. Spain. International Microbiology. 7: 249-260.

Bernal, G., Llanes, A. and Ciampi, L. 2002. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. with antibiotic activity against plant pathogenic agents. *Electronic Journal of Biotechnology*. Universidad Católica de Valparaíso, Chile. 5: 1-9.

Bodman, H. and Welker, N. E. 1969. Isolation of spheroplast membranes and stability of spheroplast of *Bacillus stearothermophilus*. Department of Biological Sciences. *Journal of Bacteriology*. 97: 924 - 935.

Bonacic, I. 2003. *Bacillus subtilis* como controlador biológico de *Rhizoctonia solani* Kunh en el cultivo de algodón. Universidad Nacional de Formosa, Facultad de Humanidades, pp. 18 - 29.

Brugueras, C. M. y Morejón, G. M. 1998. Antibacterianos de acción sistémica. Parte II. Otros grupos de antibióticos, *Rev. Cubana Med. Gen. Integr.* 4: 362 - 73.

Bustamente, E. R. y Gamboa, A. 2000. Biodiversidad como fundamento en la exclusión y manejo de plagas. *Revista Manejo Integrado de Plagas*, pp. 2-8.

Butzen, S., Beudot, F. and McInnes, B. 2005. Crop insights, Asian Soybean Rust: Fungicides. Pioneer, Dupont Company, Pp. 1-5.

Chen, K. S., Edwards, A. C. and Subler, S. 2001. Effects of fungicides, benomyl, captan and chlorotalonil on soil microbial activity and nitrogen dynamics in laboratory incubations. Environmental Science Program and Department of Entomology, Soil Ecology Laboratory, The Ohio. Soil Biology & Biochemistry. 33: 1971-1980.

Damicone, J. 1990. Fungicide Resistance Management. Division of Agricultural Sciences and Natural Resources, Oklahoma State University, pp. 6-8.

Demanou, J., Monkiédjé, A., Njiné, T., Foto, S. M., Nola, M., Serges H. Togouet, Z. and Kemka, N. 2004. Changes in soil chemical properties and microbial activities in response to the fungicide Ridomil gold plus copper. University of Yaounde, Republic of Cameroon. International Journal of Environmental Research and Public Health. 1: 26-34.

Rosenstein, S. E. 2005. Diccionario de especialidades agroquímicas, 15va. Edición, editorial PLM, S.A. de C.V. México, D.F., pp. 1-1648.

Dluzniewska, J. 2003. Reaction of fungi of *Trichoderma* genus to selected abiotic factors. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Agronomy. 6: 25-32.

Domsch, K. H., Gams, W. and Anderson, T. H. 1980. Compendium of soil fungi. Institute of Soil Biology Federal Agricultural Research Centre Braunschweig Federal Republic of Germany. 1: 1-30.

Driks, A. 1999. *Bacillus subtilis* spore coat. Department of Microbiology and Immunology, Illinois. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 63: 1-20.

Eeden, M. V. and Korsten, L. 2004. Effect of additives and copper fungicide on *Bacillus subtilis* to control avocado (*Persea americana* Mill) fruit diseases. Department of Microbiology and Plant Pathology, University of Pretoria, South African. 27: 11-16.

Ellil, H. A. and Sharaf, F. E. 2003. Growth morphological and adaptation of some plant pathogenic fungi to Benlate and Zineb. Journal of Biological Science. 3: 271-281.

Errington, J. 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. Nature reviews. Microbiology. 1: 117-125.

Fernández, N. E. N. 1999. Fungicidas: historia, presente y futuro de los fungicidas utilizados para el control del tizón. Componentes del manejo integrado del tizón, Universidad Nacional Agraria, La molina, Lima Perú, pp. 67-76.

Foldes, T., Banhegyi, I., Herpai, Z., Varga, L. and Szigeti, J. 2000. Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and *in vitro* screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage micro-organisms. Institute of Food Science, Hungary. Journal of Applied Microbiology. 89: 840-846.

García, R. M. de J. y Osorio, O. R. 2000. El uso de semioquímicos en el control de plagas de hortalizas. En: temas selectos en fitosanidad y producción de hortalizas; ed.: Bautista, M. N., Suarez, V. A. D. y Morales, G. O. Editorial diamante. Colegio de postgraduados, Montecillo, Municipio de Texcoco, edo. de México, pp 1-76.

González, P. E., Yáñez, M. M. J., Santiago, V. A. and Montero, P. 2004. Fungi biodiversity on pepper wilt, and some related factors, Programa en Fitopatología. Instituto de Fitosanidad. Agrociencia, 38 (6), 653 - 661.

Grant, W. D. and Wicken, A. J. 1970. Autolysis of cell walls of *Bacillus stearothermophilus* B65 and the chemical structure of the peptidoglycan. University of New South Wales, Biochem. J. 118: 859-868.

Handelsman, J. and Stabb, V. 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. Department of Plant Pathology, University of Wisconsin, pp. 11-16.

Harman, G. E., Howell, R. C., Viterbos, A., Chet, I. and Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. Cornell University, Geneva, New York. Nature Reviews Microbiology. 2: 1-14.

Hermosa, M. R., Grondona, L., Iturriaga, E. A., Diaz, D., J. M., Castro, C., Monte, E. and Garcia, H. I. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. Universidad de Salamanca, Spain Applied and Environmental Microbiology, pp. 1-10.

Hassan, A., Khalil, E. and Najlah, N. 1982. Laboratory test to evaluate the effectiveness of some fungicides against certain soil-borne fungi. Plant Pathol. Univ. Iraqi Journal of Science. 23: 431-442.

Irwin, R.J., M. VanMouwerik, L. Stevens, M.D. Seese, and W. Basham. 1997. Environmental contaminants encyclopedia. Fort Collins, Colorado. Distributed within the federal government as an electronic document (Projected public availability on the internet) pp. 1-50.

Killian, M., Steiner, U., Krebs, B., Junge, H., Schmiedeknecht, G., and Hain, R. 2000. FZB24® *Bacillus subtilis* – mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. Institut für Pflanzenkrankheiten Universität Bonn, Germany, pp. 72-93.

Kiraly, Z., Klement, Z., Solymosy, F. and Voros, J. 1974. Methods in plant pathology. Elsevier Scientific Publishing Company Amsterdam London, p. 209.

Kjoller, R. and Rosendahl, S. 2000. Effects of fungicides on arbuscular mycorrhizal fungi: differential responses in alkaline phosphatase activity of external and internal hyphae. *Biol. Fertil Soils*. 31: 361-365.

Kredieks, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A. Kevei, F. and Nagy, E. 2003. Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Food Technology, Biotechnology*. 41 (1): 37-42.

Kucuck, M. 2004. *In vitro* antifungal of strains of *Trichoderma harzianum*. Department of Biology-Faculty of Science, Anadol University, pp. 1-6.

Lisboa, M. M. A. 2003. Efectividad de *Bacillus subtilis* y una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* sobre la incidencia y severidad de la pudrición gris (*Botrytis cinerea*) en vid vinífera. Universidad de Talca-Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, (Tesis de licenciatura), pp. 1- 49.

López, J. C. y Gallo, L. 2000. Micosis radiculares, Patología vegetal, Cap. 30, tomo II. M. V. Phytoma-España, pp. 939-947.

López, F. J. A. 1998. Fungicidas de utilización vitícola, Novartis Agro S.A.
<http://4w.cajaduro.es/agro/public/cap7cone.htm>.

Martínez, B., Gonzalez, R. and Balance, C. 1999. Antagonism of *Trichoderma* spp strains on some sugarcane pathogens. *Rev. de Fitopatología*. 34 (1): 207-211.

Matheron, E. M. and Porchas, M. 2000. Comparative effect of five fungicides on the development of root and stem rot and survival of chile pepper plants grown in field soil naturally infested with *Phytophthora capsici*. University of Arizona, College of Agriculture, pp. 1 - 3.

McLean, K. L., Hunt, J. and Steward. 2001. Compatibility of the biocontrol agent *T. harzianum* c52 with selected fungicides. *Vegetable Pathology, New Zeland, Plant Protection*. 54: 84-88.

Mendoza, Z. C., 2000. Fungicidas para el manejo de enfermedades en hortalizas. En: *Temas selectos en fitosanidad y producción de hortalizas*. ed.: Bautista, M. N., Suárez, V. A. D. y Morales, G. O. Editorial diamante. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Municipio de Texcoco, Edo. de México, p. 118.

Minta, M., Wilk, I. and Zmudzki, J. 2004. Embryotoxicity of carbendazim in rat and hamster micromass cultures. Department of Pharmacology and Toxicology, *Bull Vet Inst Pulawy*. 48: 481-484.

Mondino, P. y Silvera E. 2003. Control biológico de patógenos de plantas, Universidad de la Republica. Facultad de Agronomía Montevideo Uruguay, pp. 1-44.

Monte, N. 2001. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca, pp. 1-5.

Montealegre, R. J., Reyes, R., Pérez, L. M., Herrera, R., Sylva, P. and Besoain, X. 2003. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Electronic Journal of Biotechnology, 6: 115-127.

Moyne, A. L., Shelby, R., Cleveland, T. E. and Tuzun, S. 2002. Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. Department of Entomology and Plant Pathology, Journal of Applied Microbiology. 90: 622-629.

Nasir, N. 2003. Effect of fungicides in limiting the growth of seed borne fungi of soybean, Pakistan Journal of Plant Pathology. 2 (2): 119-122.

Neher, D. A. 1999. Soil community composition and ecosystem process, comparing agricultural ecosystems with natural ecosystems. Department of Biology. University of Toledo. Agroforestry systems. 45: 159-185.

NPIC, 2002. What is captan? (Technical Fact Sheet), National Pesticide Information Center, Oregon State University and U.S. Environmental Protection Agency, pp. 1-7.

Ocampo, J. O., Jiménez, D. R., Salas, G. M.E., Mena, V. H.G., Virgen, C. G., Flores, O. A. y Olalde, P. V. 2001. Uso de microorganismos rizosféricos en solanáceas. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato Depto. Biotecnología y Bioquímica. Buenavista, Saltillo, Coahuila, pp. 1-3.

Olalde, P. V. and Aguilera, G. L. I. 1998. Microorganisms and biodiversity. Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados IPN, Unidad Irapuato, pp. 1-12.

Orrieta, F. y Larrea, V. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo integrado de plagas, Costa Rica (62): 96-100.

Pérez, M. L., Duran, O. L. J., Ramírez, M. R., Sánchez, P. R. y Olalde, P. V. 2004. Sensibilidad *in vitro* de aislados del hongo *Phytophthora capsici* a fungicidas. Universidad de Guanajuato. Instituto de Ciencias Agrícolas, pp. 144-148.

Parr, J. F. 1974. Efectos de los pesticidas en los microorganismos del suelo y el agua. Agricultural Research Service, USDA, pp. 1-35.

- Pastor, B. S. 2002. Biomonitorización citogenética de cuatro poblaciones agrícolas europeas, expuestas a plaguicidas mediante el ensayo de micronúcleos. Universidad Autónoma de Barcelona, pp. 3-5.
- Prakasam, V. 1998. Principles of crop disease management. Department of Plant Pathology, pp 1-43.
- Raaijmakers, J., M., Viami, M and de Souza, T. J. 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. Department of Plant Sciences, Laboratory of Phytopathology, 81: 537-547.
- Rafai, E. M., Asswab, M. W. and Awdalla, O. A. 2003. Biocontrol of some tomato disease using some antagonistic microorganisms. Pakistan, Journal of Biological science. 6 (4): 399-406.
- Rodríguez, R. M. Á., González, P. J. G., Barreto, J. P., Lim, A. N., Areu, A. y Pardo N. 1998. Tetraciclina. Acta Médica. 8(1): 75-79.
- Rodríguez, L. V. J. 2000. Efecto antagónico y controlador de algunos microorganismos saprófitos contra *Rhizoctonia solani*, un fitopatógeno causante del damping off en plantas de tomate. Tesis digitales, UNMSM, pp. 1-27.

Rodríguez, M. L. 2000. Enfermedades bacterianas más comunes en hortalizas. En: temas selectos en fitosanidad y producción de hortalizas; ed.: Bautista, M. N., Suarez, V. A. D. y Morales, G. O. Editorial diamante, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Municipio de Texcoco, Edo. de México, pp 128-129.

Romo, L., Ávila, J. y Silva, C. 1999. Efecto de algunos fungicidas en el crecimiento *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai. Revista de Fitopatología. 34: 193.

Saksena, S. B. 1972. Root diseases and biological control, Journal Indian Bot. Soc. 6: 511.

Sánchez, V., Bustamante, E., González, H., y Cervantes, M. 1996. Efecto de fungicidas en microorganismos antagonistas. X Congreso Nacional Agronómico/III Congreso de Fitopatología/, México, D.F., p. 61.

Sandoval, B. C. 2004. Manual técnico manejo integrado de enfermedades en cultivos hidropónicos. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca, p. 1-45.

San, L. W., Lung, S. I., How, W. C., Choan, K. T., Feish, C. W., Kuo, T. Y., Jon, R. J. and Lu, W. C. 2002. Production of antifungal compounds from chitin by *Bacillus subtilis* enzyme and microbial. Technology. 31: 321-328.

Seminario Internacional conjunto JICA – INTA, 2004. "Estudio conjunto sobre control biológico de enfermedades radiculares". Buenos Aires, Argentina, pp. 1-3.

Siepmann, S. and Bruhn L. 1999. Hazard assessment of the fungicides benomyl, captan, chlorothalonil, maneb, and ziram to aquatic organisms. California Department of Fish and Game, Pesticide Investigations, pp. 3-66.

SIAP, 2005. Sistema Integral Agroalimentario y Pesquero. Hoja informativa sobre estadísticas de cultivos de tomate, chile y pepino. Subsecretaría de Agricultura, C.G.D. y S.I.A.P., con información de las Delegaciones, Distritos y Cader's de la SAGARPA. México, D.F., p 1.

Schilder, A. M. C. and Sundin, W. G. 2000. Fungicides and bactericides for fruit crops. Department of Plant Pathology, pp. 11-19.

Solis, S. F. y Sosa, F. H. 1996. Evaluación de *Bacillus subtilis* en el control de *Fusarium oxysporum* con diferentes variedades de arveja china y dulce. www.ag.vt.edu/ipmcersp/meetings/guatemala-research/guatemala-research/SO-A2e.html.

Sousa, J. P., Rodriguez, M. L. J., Loureiro, S., Soares, M. V. M., Jones, E. S., Forster, B. and Gestel, V. A. M. C. 2004. Ring testing and field validation of a terrestrial model ecosystem (TME)-an instrument for testing potentially harmful substance: effects of carbendazim on soil microbial parameters. *Ecotoxicology*. 13: 43-60.

Stanley, C. D. and Geralson, C.M. 1991. Tomato diseases. In: *Compendium of tomato diseases*. APS press. The American Phytopatological Society, p. 2.

Syngenta Crop Protection. 2005. Serenade, compatibility with bactericides. AgraQuest, Inc. Greensboro, N.C., p. 1.

UNPEH, 2002. Unión Nacional de Productores de Hortalizas, hoja informativa de hortalizas, Mexico, D.F. pp. 110-125.

Upadhyay, R. S. and Rai, B. 2000. Biocontrol agents of plant pathogens: their use and practical constraints. In: *Biocontrol of plant diseases*, ed. Mujerki, K. G. and Garg K. L. I: 211.

USDA. 2001. Copper sulfate, crops for use as algicide and invertebrate pest control. NOSB TAP Review Compiled by OMRI. EE.UU., pp. 2-17.

Valencia, C. E. y Peña, C. J. J. 2001. El suelo y sus habitantes microbianos: consideraciones ecológicas. CINVESTAV, Unidad Irapuato: Avance y Perspectiva 20: 401-406.

Viterbol, A., Ramot, O. Chernin, L. and Chet I., 2002. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. Department of Biological Chemistry, 81: 549-556.

Wafaa, M. and Haggag, K. 2002. Sustainable agriculture management of plant diseases. Plant Pathology Department, National Research Center, Dokki, Egypt. Journal of Biological Sciences, 2 (4): 280-284.

Weller, D. M. Thomashow, L. S. and Cook, R. J. 1995. Biological control of soil-borne pathogens of wheat: benefits, risks and current challenges. . In Biological control: Benefits and Risks, ed. Hoikkanen H. M. T. and Lynch J. M. Cambridge University Press, England, pp. 149-159.

Wilson, M. and Lindow, S. E. 1993. Release of recombinant microorganisms. Department of Plant Pathology, University of California. Ann. Rev. Microbiol. 47: 14-913.

Yanggen, D., Crissman, C. y Espinoza, P. 2003. Los plaguicidas, impactos en producción, salud y medio ambiente en Carchi, Ecuador, pp. 1-96.

Zamora, C. 2000. Fungicidas para el manejo de enfermedades en hortalizas. Departamento de parasitología agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, p. 122.

Zavaleta, M. E. 2000. Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. Memorias V Curso de Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico, México, pp. 1-10.

Zeigler, R. D. 2001. The genus *Geobacillus*. *Bacillus* genetic stock center catalog of strains, Department of Biochemistry, Ohio State University. Seventh Edition. 3: 1-24.

Zilhao, R., Serrano, M., Isticato, R., Ricca, E., Moran, C. P. and Henriques A. O., 2004. Interactions among CotB, CotG, and CotH during assembly of the *Bacillus subtilis* spore coat. Instituto de Tecnologia Química y Biológica. Journal of Bacteriology, 186: 1110–1119.

Zwieten, V. L., Merrington, G. and Zwieten, V. M. 2004. Review of impacts on soil biota caused by copper residues from fungicide application. Department of Primary Industries, Wollongbar Agricultural Institute, pp. 1-8.