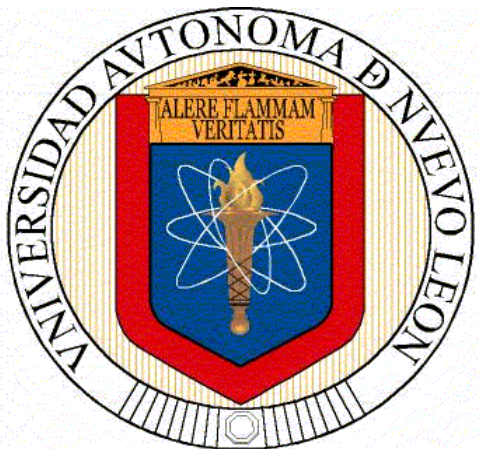


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA
UTILIZANDO COMO AGENTE A *Bacillus thuringiensis* (Berliner)**

**Por
Q.B.P. HILDA MARÍA MUÑIZ VILLARREAL**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN
EN MICROBIOLOGÍA**

OCTUBRE, 2014

CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA
UTILIZANDO COMO AGENTE A *Bacillus thuringiensis* (Berliner)

Comité de Tesis

Dra. Lilia H. Morales Ramos
Presidente

Dr. Carlos Fco. Sandoval Coronado
Secretario

Dr. Hugo A. Luna Olvera
Vocal 1

Dra. Licet Villarreal Treviño
Vocal 2

Dra. Isela Quintero Zapata
Vocal 3

CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA

UTILIZANDO COMO AGENTE A *Bacillus thuringiensis* (Berliner)

Dirección de Tesis

Dra. Lilia H. Morales Ramos
Director

Dr. Raúl Rodríguez Guerra
Asesor externo

AGRADECIMIENTOS

A **DIOS** con amor y gratitud por iluminar mi camino, colmar de bendiciones mi vida y mostrarme siempre su inmensa bondad, quien siempre está conmigo.

A la **Dra. Lilia H. Morales Ramos**, por asesorarme con su amplia experiencia en la realización del presente trabajo de investigación, gracias por su confianza, paciencia y comprensión.

A la **Mc. Lucia L. Palacio Cortez**, por su ayuda y apoyo en la realización de este proyecto.

A mis compañeros y amigos del Instituto de Biotecnología, por todo el apoyo brindado durante mis estudios de maestría, por los grandes momentos vividos, Gracias.

DEDICATORIA

A mi Padre el **Sr. Santiago Muñiz Arocha**, por su paciencia, confianza, sacrificio para llegar a esta etapa de mi vida y apoyo incondicional, te quiero mucho.

A mis Hermanos, **Santiago, Socorro y Cristina** la confianza y cariño que me han demostrado siempre.

A toda mi Familia, por haber estado pendientes en mi desarrollo como persona y estudiante, gracias por todo su apoyo.

A la memoria de mi madre **María del Socorro Villarreal Villarreal** (†), porque su recuerdo siempre estará presente, es mi eterno ángel de la guarda, jamás tendré palabras para agradecerle, ni como pagarle todo lo que hizo por mí, su ejemplo será la luz que ilumine mi camino. Sé que desde donde está sigue vigilándome y guiándome por el camino correcto. Su esfuerzo ha rendido su fruto, gracias madre por estar siempre a mi lado.

A mis amigos y a todas aquellas personas quienes me abrieron las puertas de su corazón y me brindaron su cariño, amistad y confianza, gracias por “estar conmigo” y creer en mí.

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo titulado “Control de hongos fitopatógenos de importancia agrícola utilizando como agente a *Bacillus thuringiensis* (Berliner)” se realizó en el Laboratorio L1 del Instituto de Biotecnología de la Facultad Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Lilia Hortencia Morales Ramos.

ÍNDICE

Sección	Página
INDICE	I
INDICE DE TABLAS.	III
INDICE DE FIGURAS.....	IV
NOMENCLATURA.	V
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Agricultura y hongos fitopatógenos	4
2.1.1 Especies de <i>Fusarium</i>	5
2.1.2 Especies de <i>Phytophthora</i>	6
2.1.3 Especies de <i>Cholletotrichum</i>	8
2.1.4 Especies de <i>Macrophomina</i>	9
2.2 Control biológico de fitopatógenos	9
2.3 Calidad fisiológica y sanitaria de la semilla.....	11
2.4 Desarrollo histórico y características generales de <i>B. thuringiensis</i>	11
2.5 <i>Bacillus thuringiensis</i> como agente de control fitopatógeno	12
2.6 Actividad fúngica de <i>Bacillus thuringiensis</i>	13
2.6.1 Producción de enzimas	13
2.6.2 Producción de antibióticos y metabolitos secundarios.....	14
2.6.3 Biopolímeros o polímeros naturales utilizados como adherentes en formulaciones de bioinsecticidas.....	15
2.6.4 Almidón.....	15
2.6.5 Grenetina	15
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. HIPÓTESIS.	18
5. OBJETIVOS.....	19

5.1	Objetivo general	
5.2	Objetivos particulares	
6.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
6.1	Material Vegetal.....	20
6.2	Material microbiológico.....	20
6.2.1	Cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	20
6.3	Hongos fitopatógenos.....	21
6.4	Determinación de antagonismo in vitro de <i>Bacillus thuringiensis</i> contra hongos fitopatógenos.....	21
6.5	Germinación en charola para semillas de chile, tomate y frijol.....	22
6.6	Bioensayo de inocuidad de <i>Bacillus thuringiensis</i> sobre plántulas de chile, tomate y frijol.....	23
6.7	Germinación in vitro para semillas de chile, tomate y frijol.....	23
6.8	Evaluación de potencial antagónico de <i>Bacillus thuringiensis</i> sobre semillas.....	23
7.	RESULTADOS.....	25
7.1	Determinación de antagonismo in vitro de <i>Bacillus thuringiensis</i> contra hongos fitopatógenos.....	25
7.2	Determinación de antagonismo in vitro de las cepas seleccionadas de <i>Bacillus thuringiensis</i> cultivadas en dos medios diferentes contra hongos fitopatógenos.....	26
7.3	Germinación en charolas para semillas de chile, tomate y frijol.....	31
7.4	Bioensayo de inocuidad de <i>Bacillus thuringiensis</i> sobre plántulas de chile, tomate y frijol.....	31
7.5	Germinación in vitro para semillas de chile, tomate y frijol.....	32
7.6	Evaluación del potencial antagónico de <i>Bacillus thuringiensis</i> sobre semillas de frijol, chile y tomate.....	33
7.7	Determinación del potencial antagónico de cepas de <i>B. thuringiensis</i> utilizando semillas de frijol, chile y tomate protegidas con una película a base de almidón-gelatina y la cepa de <i>B. thuringiensis</i> , posteriormente inoculadas con <i>Phytophthora infestans</i>	34
8.	DISCUSIÓN.....	36
9.	CONCLUSIONES.....	39
	LITERATURA CITADA.....	40
	PERSPECTIVAS.....	47
	RESUMEN BIOGRÁFICO.....	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
I. Cepas GM de <i>Bacillus thuringiensis</i> usadas en los ensayos de antagonismo.....	20
II. Cepas HD de <i>Bacillus thuringiensis</i> usadas en los ensayos de antagonismo	21
III. Cepas de hongos fitopatógenos usadas	21
IV. Polímeros Naturales	24
V. Tratamientos utilizados en la evaluación de potencial antagónico de <i>Bacillus thuringiensis</i> sobre semillas	24
VI. Selección de Cepas Antagónicas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	25
VII. Porcentajes de inhibición (72 hrs) para cepas antagonistas de <i>B.thuringiensis</i> cultivadas en dos medios diferentes contra hongos fitopatógenos	26
VIII. Porcentaje de Germinación de semillas en charola alveolares	31
IX. Porcentaje de inocuidad de cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> sobre plántulas de Frijol, Chile y Tomate	31
X. Porcentaje de Germinación de semillas in vitro	32
XI. Porcentaje de Germinación in vitro de semillas sin polímeros expuestas a cultivos de B.t	33
XII. Porcentaje de Germinación in vitro de semillas con cobertura B.t -polímeros	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Efecto del medio de cultivo y las diferentes fracciones usadas en el porcentaje de inhibición para la cepa GM-54	27
2. Efecto del medio de cultivo y las diferentes fracciones usadas en el porcentaje de inhibición para la cepa GM-58	27
3. Efecto del medio de cultivo y las diferentes fracciones usadas en el porcentaje de inhibición para la cepa HD-1	28
4. Efecto del medio de cultivo y las diferentes fracciones usadas en el porcentaje de inhibición para la cepa HD-24	28
5. Efecto del medio de cultivo y las diferentes fracciones usadas en el porcentaje de inhibición para la cepa HD-29	29
6. Efecto del medio de cultivo y las diferentes fracciones usadas en el porcentaje de inhibición para la cepa HD-263	29
7. Efecto del medio de cultivo y las diferentes fracciones usadas en el porcentaje de inhibición para la cepa HD-331	30
8. Comparación del porcentaje de inhibición de <i>P. infestans</i> de las diferentes cepas de <i>B. thuringiensis</i> utilizando el medio CNCT.	30
9. Comparación del porcentaje de germinación de la cepa GM-54 con los diferentes tratamientos probados en semillas de frijol.....	34
10. Comparación del porcentaje de germinación de la cepa GM-58 con los diferentes tratamientos probados en semillas de frijol.....	34
11. Comparación del porcentaje de germinación de la cepa GM-54 con los diferentes tratamientos probados en semillas de tomate.....	35
12. Comparación del porcentaje de germinación de la cepa GM-58 con los diferentes tratamientos probados en semillas de tomate.....	35

NOMENCLATURA

ml	Mililitros
%	Por ciento
°C	Grados Celsius, centígrados
g/l	Gramos por litros
rpm	Revoluciones por minuto
pH	Potencial de hidrogeno
PDA	Agar papa dextrosa
CTP	Caldo triptosa fosfato
hrs.	Horas
v/v	Volumen sobre volumen
PGM	Organismos genéticamente modificados
cm	Centímetro
B.t.	<i>Bacillus thuringiensis</i>
DNA	Acido desoxiribonucleico
RNA	Acido ribonucleico
MS	Sobrenadante del medio melaza
MP	Precipitado del medio melaza
MCT	Cultivo total del medio melaza
CNS	Sobrenadante del caldo nutritivo
CNP	Presipitado del caldo nutritivo
CNCT	Cultivo total del caldo nutritivo

RESUMEN

Numerosas especies de hongos y bacterias en el mundo son conocidas por tener un efecto antagónico sobre otros microorganismos y son utilizadas por el hombre para la regulación de patógenos cuyo hábitat es el suelo. El género *Bacillus*, se encuentra entre los agentes más utilizados para el control biológico debido a cualidades tanto morfológicas como fisiológicas que permiten su ubicuidad en la naturaleza, además ha tenido mucho éxito en la prevención de patologías vegetales causadas por hongos. *B. thuringiensis* es el organismo más exitoso en cuanto a comercialización, este produce un cuerpo paraesporal, denominado δ -endotoxina, y su espectro de hospederos es muy amplio, la especificidad, virulencia, seguridad y potencia contra insectos y organismos patógenos está bien establecida, se sabe que produce una gran diversidad de metabolitos, como bacteriocinas, antibióticos y enzimas extracelulares tales como proteasas y quitinasas, elementos clave en el fenómeno de supresión de patógenos por agentes biológicos. Sin embargo, hay poca información de su potencial antifúngico. El objetivo del presente trabajo fue seleccionar cepas de *B. thuringiensis* con potencial antagónico para controlar hongos fitopatógenos de importancia agrícola, con la finalidad de contar con una alternativa biológica para su control y explorar otras formas para aprovechar la biodiversidad de *B. thuringiensis* para la protección de cultivos agrícolas. Para esto fue evaluada 1) La actividad antagónica de cepas de *B. thuringiensis* sobre hongos fitopatógenos de importancia agrícola, 2) La inocuidad de las cepas de *B. thuringiensis* seleccionadas por presentar efecto antagónico hacia alguno de los hongos fitopatógenos sobre plántulas de frijol, chile y tomate, 3) La actividad antagónica de las cepas de *B. thuringiensis* seleccionadas en el sobrenadante y en el complejo espora cristal, 4) El potencial antagónico de las cepas de *B. thuringiensis* seleccionadas utilizando una película a base de gredina-almidón- cepa antagónica sobre semillas de frijol, tomate y/o chile. Los resultados mostraron que el efecto antagónico de *B. thuringiensis* depende de la cepa utilizada y el hongo fitopatógeno blanco. *P. infestans* fue el fitopatógeno más susceptible y la cepa con mayor porcentaje de inhibición para este hongo fue la HD-263. Este trabajo demuestra que algunas cepas de *B. thuringiensis* pueden ser agentes efectivos de control biológico contra hongos fitopatógenos.

ABSTRACT

In the world numerous species of fungi and bacteria are known to have an antagonistic effect on other microorganisms and are used by man for the control of soil and plant pathogens. The genus *Bacillus* is recognized among the most used agents in biological control both because its morphological and physiological characteristics that allows its ubiquity in nature. This genus has also been very effective in preventing plant diseases caused by fungi. *Bacillus thuringiensis* is the most successful species in terms of marketing, it produces a parasporal body called δ -endotoxin and its host spectrum includes species of Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, nematodes and protozoa. Its specificity, virulence, safety and power against insects and pathogens is well established and it is known to produce a wide range of metabolites, such as bacteriosins, antibiotics and extracellular enzymes, such as proteases and chitinases, key elements in the phenomenon of suppression of pathogenic biological agents. However, there is little information about its antifungal potential. The objective of this work was to select strains of *Bacillus thuringiensis* potentially useful as antagonists against phytopathogenic fungi of agricultural importance, with the aim of having a biological alternative to control them and exploring other ways to take advantage of the biodiversity of the bacteria for the protection of agricultural crops. To do so it was evaluated: 1) the antagonistic activity of *B. thuringiensis* strains on the agricultural phytopathogenic fungi, 2) the safety of the antagonistic strains of *B. thuringiensis* selected on seedlings of bean, tomato and pepper, 3) the antagonistic effect of the culture supernatant and the toxin-spore complex of selected strains and 4) the antagonistic potential of each selected strain in a pectin-gelatin based film covering seeds of bean, tomato and pepper. The results showed that the antagonistic effect depends on the strain of *B. thuringiensis* used as well as the target fungi. However, the most susceptible phytopathogen to *B. thuringiensis* was *P. infestans* and the strain with the highest percentage of growth inhibition for this fungus was HD-263. This work demonstrates that at least some *B. thuringiensis* strains could be effective biological control agents against phytopathogenic fungi.

1. INTRODUCCIÓN

Mundialmente se conoce un grupo importante de hongos y bacterias que presentan efecto antagónico sobre otros microorganismos, el cual es aprovechado por el hombre para la regulación, tanto de patógenos cuyo hábitat es el suelo, como aquellos que se desarrollan en la parte foliar de las plantas (Infante et al. 2009).

Este antagonismo se manifiesta de diferentes formas, como inhibidores del desarrollo o como patógenos de las especies causantes de enfermedades de plantas, y algunos se utilizan para combatir enfermedades cuando se ha demostrado su inocuidad para las plantas, el hombre o los animales (Ezziyani et al. 2004).

De los diversos microorganismos fitopatógenos que atacan a las plantas, como pueden ser los virus, hongos, bacterias, nemátodos, fitoplasmas, y viroides, son los hongos el grupo que más enfermedades ocasiona, se sabe que más de 8,000 especies de hongos pueden causar enfermedades en las plantas. Todas las plantas superiores pueden ser infectadas y dañadas por más de una especie de hongo fitopatógeno, y una especie de hongo fitopatógeno puede atacar a más de una especie de planta (National Academy of Sciences 1980; Agrios 1988).

Los hongos fitopatógenos habitantes del suelo ocasionan daño en todos los suelos de los ecosistemas y agroecosistemas del mundo. Algunos géneros y especies presentan una gran capacidad de adaptación y se encuentran ampliamente distribuidos, mientras que otros presentan características de adaptación más limitadas o bien son sumamente especializados, lo cual restringe su distribución (Cook y Baker 1983). Esta capacidad adaptativa de los hongos fitopatógenos va a depender en gran medida del grado de relación que han desarrollado con sus plantas hospederas, es decir, si son parásitos obligados, parásitos facultativos, o saprófitos facultativos. La cantidad de estudios e investigaciones en algunos grupos depende en gran parte de la importancia económica de los cultivos o plantas que dañan. La importancia de los hongos fitopatógenos del suelo que atacan la raíz, no se limita sólo al daño que ocasionan en las plantas hospederas, sino también debe considerarse el papel que juegan dentro de las cadenas tróficas y en las diversas relaciones que establecen con otros microorganismos del suelo (Agrios 1988; Lumsden 1981).

2. ANTECEDENTES

2.1 Agricultura y hongos fitopatógenos

La agricultura presenta una serie de desafíos, que deben ser enfrentados a diario, para lograr una mayor productividad. Los hongos fitopatógenos ocasionan pérdidas a nivel mundial que ascienden a miles de millones de dólares al año (National Academy of Sciences 1980).

El frijol (*Phaseolous vulgaris L.*) es un cultivo de gran importancia para México, debido a que junto con el maíz (*Zae mays L.*) constituye la base de la alimentación de millones de mexicanos. La pudrición carbonosa, enfermedad causada por el hongo *Macrophomina phaseolina* ha ocasionado daños importantes en frijol y otros cultivos, en climas variados de diferentes regiones de México (Beas et al. 2004).

El tomate cultivado (*Lycopersicon esculentum Mill*) es considerado como una de las hortalizas de mayor importancia en muchos países del mundo, por el gran número de productos que se obtienen. Mundialmente ocupa el segundo lugar en importancia entre las hortalizas debido a su nivel de producción, la cual es superada solamente por el cultivo de la papa.

En México, el frijol está considerado como la segunda especie hortícola más importante, debido a la superficie sembrada y como hortaliza de mayor importancia por sus niveles de producción (Ascencio et al. 2008).

La producción mundial de chile es de 29 millones de toneladas al año, el cultivo del chile es el cultivo hortícola más importante en México, con una producción anual aproximada de 1.8 millones de toneladas, sin embargo este cultivo es susceptible a problemas fitopatógenos como lo es la marchitez o producción de la raíz del chile causada principalmente por los hongos *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Phytophthora capsici*.

El daño por estas enfermedades no sólo se refiere a las pérdidas económicas, sino a la alteración que existe en el crecimiento y desarrollo de las plantas hospederas atacadas por estos microorganismos. En cuanto a las pérdidas económicas, éstas pueden ser de tipo

cuantitativo y/o cualitativo (sabor, textura, color y forma) (Ashworth et al. 1981; Agrios 1988).

Los patógenos de suelo son por definición residentes del suelo, por periodos de tiempo largos o cortos. Los órganos subterráneos de las plantas son afectados directamente y las partes aéreas son afectadas indirectamente por estos patógenos. Las enfermedades por hongos de suelo son más difíciles de controlar que aquellas causadas por patógenos foliares. Algunas de las enfermedades más destructivas en los cultivos son provocadas por patógenos de suelo, tales como: *Fusarium culmorum* (Smititaih), *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* (Kühn), *Phoma terrestris* y *Pythium spp.*

2.1.1 Especies de *Fusarium*

Las especies de *Fusarium* están ampliamente distribuidas en los suelos y sustratos orgánicos, por ejemplo, han sido aislados desde el permafrost en el ártico hasta las arenas del Sahara. Abunda en suelos cultivados de zonas templadas y tropicales y es el hongo más frecuentemente aislado por los fitopatólogos (Booth 1971).

Fusarium es ampliamente reconocido por sus macroconidias fusiformes distintivas, sin embargo, a pesar de esta característica primaria hay muchas dificultades para delimitar el género utilizando la morfología para alcanzar conceptos filogenéticos consistentes (Calle 2005).

Se clasifica a este patógeno según Alexopoulos et al. (1996) de la siguiente manera:

Reino: Mycetae

División: Amastigomycota

Subdivisión: Deuteromycotina

Clase: Deuteromycetes

Sub clase: Hyphomycetidae

Orden: Moniliales

Familia: Tuberculariaceae

Género: *Fusarium*

Este hongo se encuentra naturalmente en el suelo en forma de clamidiospora, micelio asociado a fragmentos de tejidos vegetales o a partículas de humus y las clamidiosporas representan la fuente de inóculo primario (Álvarez 2003). Son patógenos en la mayoría de los cultivos agrícolas, hortícolas y silvícolas del mundo; presentes también en hospedantes silvestres causando síntomas como marchiteces vasculares; pudriciones radicales; cánceres (Agrios 1988).

2.1.2 Especies de *Phytophthora*

La mayoría de las especies de este género son fitopatógenas, las cuales tienen una gran diversidad de hospedantes: frutales, forestales, hortalizas, ornamentales y gramíneas. Un solo hospedante, como manzano, cacao y cerezo, pueden ser atacados por cinco o más especies de este patógeno.

Producen síntomas como ahogamientos, pudriciones radicales y de tubérculos, cánceres del tronco y collar de las plantas, marchiteces, tizones foliares y pudrición de frutos. Algunas de las especies de importancia agrícola de este género se mencionan a continuación:

Phytophthora capsici tiene una extensa distribución en el suelo, se encuentra asociado a cultivos como berenjena, tomate, chile y cucurbitáceas. Ayvar et al. (1994), reportan a *Phytophthora capsici* como el principal causante de la muerte de plantas de chile en pre floración, floración y en llenados de frutos. En zonas como el Bajío y Puebla se registra una disminución en la densidad de plantación de chile de hasta el 100% de mortalidad (Mojica 2009)

Se clasifica a este patógeno según Alexopoulos et al. (1996) de la siguiente manera:

Reino: Stramenophyla

Phyllum: Oomycota

Clase: Oomycetes

Orden: Peronosporales

Familia: Pythiaceae

Género: *Phytophthora*

Especie: *capsici*

Es una especie heterotálica; produce micelio hialino, cenocítico, muy ramificado y toruloso cuando es joven, el cual al envejecer se vuelve liso y las colonias crecen en forma radial. Los esporangióforos simples o ramificados irregularmente, son gruesos, robustos, con un ligero hinchamiento cerca de la base del esporangio. Alta humedad en el suelo y temperaturas que oscilan entre 15 y 20°C con condiciones favorable para su diseminación, los cultivos regados por gravedad son más afectados ya que los propágulos se diseminan a través del agua de riego y pueden transmitirse por medio de los implementos utilizados en las prácticas culturales y por medio de la semilla. La oospora, que representa La fuente de inoculo primario germina y da lugar a un esporangio, el cual puede germinar directamente o dar lugar a zoosporas; las zoosporas se enquistan en la superficie de las raíces o de las hojas y el tubo germinativo produce un apresorio, el cual se fija a la superficie y ejerce presión física, en poco minutos las hifas inician su crecimiento en las células de la epidermis del hospedero (Ramos 2009).

En México existen regiones en donde se tienen perdidas en el cultivo de chile hasta el 80% y estados como Aguascalientes y San Luis Potosí donde la superficie de siembra ha reducido hasta un 60% a causa de este problema (SAGARPA 1996).

Pytophthora infestans es de importancia económica ya que cuando las condiciones son favorables para su desarrollo produce la más seria de todas las enfermedades de la papa. El parasito vive sobre diversas solanáceas (papa, jitomate), especialmente en la papa, a la que causa la enfermedad llamada mildiú, podredumbre, gangrena o tizón tardío de la papa, siendo este último el nombre más generalizado. La infección inicial en los cultivos se hace generalmente en primavera, al colocarse en la tierra fragmentos de papa con objeto de propagarla. Si algunos de estos fragmentos están infectados con fragmento del hongo, al germinar las yemas, el micelio se desarrolla en los brotes y en poco tiempo forma esporangios si las condiciones de humedad y temperatura son favorables (Agrios 1998).

Según Agrios (1998) la clasificación Taxonómica es de la siguiente manera:

Reino: Fungi

División: Eumycota

Subdivisión: Phycomycotina

Clase: Oomycetes
Orden: Peronosporales
Familia: Pythiaceae
Género: Phytophthora
Especie: infestans

2.1.3 Especies de *Colletotrichum*

Colletotrichum sp. Hongos imperfectos, que carecen de estructuras o reproducción sexual (asexual), hasta el momento no se ha visto que las presenten. Las esporas asexuales se forman en un acérvulo. Este hongo ocasiona la antracnosis de muchas plantas de cultivo (Agris 1998).

Reino: Mycetozoa

División: Eumycota

Subdivisión: Deuteromycotina

Clase: Coelomycetes

Orden: Melanconiales

Género: *Colletotrichum*

Este género es uno de los fitopatógenos más importantes del mundo, sobre todo en regiones tropicales, subtropicales y zonas templadas, causa daños de gran importancia económica en numerosas plantas cultivadas, como cereales, pastos legumbres, ornamentales, hortalizas y cultivos perennes incluyendo árboles frutales. Afectando cualquier etapa de la maduración de la planta, desde plántula a plantas maduras y semillas.

Las especies de *Colletotrichum* ocasionan los síntomas típicos conocidos como antracnosis. La pérdida más significativa ocurre cuando es afectada la apariencia de los frutos.

2.1.4 Especies de *Macrophomina*

Macrophomina spp. Pertenece al los ascomicetos que se caracterizan e identifican por sus ascocarpos, ascas y ascoesporas. Sin embargo durante el periodo de crecimiento y la mayor parte del año no se forman dichas estructuras y por lo tanto es difícil encontrarlas en tejidos vegetales enfermos (Agrios 1998).

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Clase: Ascomycetes

Orden: Incertae sedis

Familia: Incertae sedis

Género: *Macrophomina*

Se desarrolla con mayor énfasis en el suelo, con la capacidad de infectar plantas mono o dicotiledóneas, así como la distribución no uniforme en el suelo, presenta una amplia distribución de hospedantes y ataca a plantas silvestres como cultivadas, además se presenta en regiones con climas variados desde áridos hasta tropicales, en todo el mundo.

En México causa daños tan importantes en cultivos como el frijol, así como el ajonjolí, soya, algodón, maíz, cucurbitáceas y sorgo. La posibilidad de ocurrencia de la producción carbonosa es mayor en hospedantes cuyo vigor ha sido reducido por condiciones ambientales desfavorables como las altas temperaturas y el déficit hídrico.

2.2 Control biológico de fitopatógenos

Los microorganismos antagonistas (bacterias, levaduras y hongos) tienen la capacidad de ejercer un efecto de control biológico sobre diferentes patógenos de interés y se han empleado para el control de diversas enfermedades en frutos y vegetales (Hernández et al. 2007).

Los términos “control biológico” y su sinónimo abreviado “biocontrol” han sido empleados en diferentes campos de la biología, mas notablemente en entomología y en

patología vegetal. En entomología, se ha usado para describir el uso de insectos predadores vivos, nematodos entomopatógenos o patógenos microbiales para suprimir o eliminar poblaciones de diferentes plagas de insectos. En patología vegetal, el término se emplea al uso de antagonistas microbiales que controlen enfermedades así como al uso de patógenos de hospederos específicos para controlar melazas (Pal y Gardener et al. 2006).

Ainsworth en 1981, comenta que el concepto de control biológico fue usado por primera vez por Von Tubeuff en 1914, con una interpretación amplia del control de un organismo por otro, excluyendo al hombre, menciona que Roberts 1874, acuñó la palabra “Antagonismo” dentro de la microbiología al demostrar la acción antagónica que sufría una bacteria al interactuar con cepas de *Penicillium glaucum*. Asimismo, menciona que Potter, en 1908 fue el primero en reportar la inhibición de patógenos de plantas por metabolitos de otros organismos (Mojica 2009).

Baker y Cook (1974), definieron por primera vez el control biológico en fitopatología como “la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades inductoras de enfermedad de un patógeno o parásito en su estado activo o dormante, por uno o más organismos, que se logra de manera natural o a través de manipulación del ambiente, el hospedante, el antagonista, o por introducción en masa de uno o más antagonistas”

Baker y Cook (1983), modificaron su definición de control biológico en fitopatología a “La reducción de la cantidad de inóculo o de las actividades inductoras de enfermedades de un patógeno que se logra mediante la acción de uno o más organismos del hombre”.

El control biológico en fitopatología ha buscado la introducción y establecimiento generalmente de solo un aislamiento de determinada cepa antagónica que, en grandes cantidades, es introducido en el suelo contra uno o varios fitopatógenos con origen en el suelo (Mojica 2009).

Los antagonistas contribuyen a la atenuación de los daños que causan las enfermedades, en los agroecosistemas donde existan condiciones para su desarrollo y conservación. Para lograr este objetivo los microorganismos beneficiosos presentan diferentes modos de acción que les permiten ejercer su efecto biorregulador. Estos atributos, de conjunto con la capacidad de multiplicarse abundantemente, se encuentran

entre los de mayor importancia para su selección como agentes de control biológico (Danay et al. 2009).

2.3 Calidad fisiológica y sanitaria de la semilla

Las condiciones fitosanitarias de un lote de semilla, conjuntamente con la pureza genética y la calidad fisiológica, constituyen el principal elemento de la calidad. Aun no se ha establecido la correlación entre la presencia de diversos patógenos de semillas y sus efectos sobre la calidad fisiológica, pero en algunos casos, bajos niveles de infección pueden causar pérdidas de rendimiento del 50% o más. La Asociación Internacional de Análisis de Semillas define la calidad de semillas como la presencia o ausencia de organismos (hongos, bacterias, virus, nematodos o insectos) que provocan enfermedades. Moreno-Martinez (1993) menciona que los hongos que se alojan en la semilla causan daños de distinta índole, que afectan y disminuyen el vigor del grano, e incluso, si la infección es severa, pueden provocar la muerte del embrión (Lozano et al. 2006).

2.4 Desarrollo histórico y características generales de *Bacillus thuringiensis*

La existencia de *Bacillus thuringiensis* fue descubierta por un bacteriólogo japonés Ishawata en 1901, el cual aisló un bacilo de la hemolinfa del gusano de seda *Bombix mori*, dándole el nombre de *Bacillus soto*. En 1911 en Alemania Berliner aisló un microorganismo similar de larvas de *Anagasta kuehniella* destacando la presencia de un cuerpo paraesporal dentro de éste, al cual le dio el nombre de *Bacillus thuringiensis* que es como se le conoce actualmente. A finales de 1920 y principios de 1930 se implementó el uso de *Bacillus thuringiensis* para el control biológico (Muñiz 2007).

El género *Bacillus*, independientemente de su ubicación taxonómica, se encuentra entre los agentes más adecuados para el control biológico debido a cualidades tanto morfológicas como fisiológicas que permiten su ubicuidad en la naturaleza (Meadows et al.1992).

Este género además ha tenido mucho éxito en la prevención de patologías vegetales causadas por hongos. *B. thuringiensis* es el organismo más exitoso en cuanto a la comercialización. Éste produce un cuerpo paraesporal, denominado δ -endotoxina formada por una o varias proteínas cristal insecticida (PsCI)], que es tóxico a lepidópteros, dípteros, coleópteros, nemátodos y protozoarios. Sin embargo, su potencial antifúngico es desconocido, a pesar de su especificidad, virulencia, seguridad y potencia contra organismos patógenos. Además, produce una gran diversidad de metabolitos, entre los que destacan: bacteriocinas, antibióticos y enzimas extracelulares (como proteasas y quitinasas), elementos clave en el fenómeno de supresión de patógenos por agentes biológicos.

2.5 *Bacillus thuringiensis* como agente de control fitopatógeno

Las especies de *Bacillus* tienen la característica de estar exitosamente distribuidas en diferentes tipos de suelo, teniendo alta tolerancia al calor, mostrando un rápido crecimiento en cultivos líquidos y fácilmente forman esporas resistentes, agente con gran potencial biológico. Sin embargo, la evaluación de bacterias se ha centrado principalmente en la supresión de la enfermedad, pero la dinámica de la población y los mecanismos de supresión en suelo de patógenos vegetales por *Bacillus spp.* no se han investigado extensivamente (Mojica 2009).

La especie *Bacillus* gran positiva es rara vez utilizada como agentes de control biológico y ha recibido un estudio menos intensivo que el uso de bacterias gran negativas. Los antagonistas estudiados han sido principalmente *Bacillus subtilis* y ocasionalmente *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus polymixa* (Utkhede 1984; Silo et al. 1994).

Bacillus thuringiensis es un bacilo entomopatogénico gran positivo formador de esporas que pertenece al grupo de *Bacillus cereus* que abarca seis especies descritas y validadas (Daffonchio et al. 2000).

Es una bacteria ubicua, exitosamente difundida en el ambiente incluyendo suelo; insectos y otros hábitats; productos almacenados y almacenes; materiales vegetales y ambientes acuáticos (Glare y O'Callaghan 2000; Hernandez et al. 2005).

A *Bacillus thuringiensis* se le considera cosmopolita, pues sus esporas se han aislado de suelo (Meadows et al. 1992), de larvas de insectos enfermos (Kaelin et al. 1994), de productos almacenados (Karamanlidou et al. 1991) y hojas de árboles (Meadows et al. 1992; Sanchez y Peña 1995), aunque es más frecuente aislarla de productos almacenados, pues las condiciones ambientales del almacén permiten la persistencia de sus esporas (Martinez y Sánchez 1998) incluyendo la rizosfera de plantas (Medrano et al. 2000).

Se ha utilizado como bioinsecticida para el control de insectos plaga en la agricultura y enfermedades en humanos, constituye más del 90% de los biopesticidas comercialmente disponibles.

Los genes cry son expresados en muchas plantas permitiendo su protección contra insectos patógenos y plantas genéticamente modificadas (PGM) de acuerdo con genes de la toxina de *Bacillus thuringiensis* representa cerca del 19% del área cultivada transgénica total del mundo (Mojica 2009).

2.6 Actividad fúngica de *Bacillus thuringiensis*

2.6.1 Producción de Enzimas

Las quitinasas se encuentran en una amplia gama de organismos, incluyendo bacterias, hongos y plantas más evolucionadas, desempeñando diversos papeles en su origen (Felse y Panda 1999). La pared celular fúngica constituye entre 20-30% del peso seco de la célula, dándole protección contra daño físico y siendo esta la responsable de su forma celular, la pared fúngica está constituida por quitina y β -1-3- glucanasa, es un blanco para una amplia gama de proteínas anti fúngicas, esto incluye especialmente quitinasas y glucanasas las cuales degradan la quitina y glucanos que llevan respectivamente a la lisis de la célula del hongo (Theis y Stahl 2004).

Los microorganismos productores de quitinasas han sido reportados como agentes de control biológico para diferentes clases de enfermedades fúngicas de plantas. En el grupo de *Bacillus cereus* se encontraron cepas productoras de quitinasas efectivas en el control biológico de hongos fitopatógenos (Mojica 2009).

Se han reportado quitinasas producidas por *Bacillus thuringiensis* var. cepa *israelensis* mostró inhibición fúngica entre 45-100% cuando se probó en cultivos de crecimiento, la adición de esta quitinasa en semillas de soya infectadas con *Sclerotium rolfsii* incrementaron la germinación de 25-90%. Además de su papel como factor sinérgico para el realce del potencial insecticida *Bacillus thuringiensis*, quitinasas de este microorganismo son promisorias en el control biológico de hongos fitopatógenos y para la preservación de semillas almacenadas (Reyes et al. 2004).

2.6.2 Producción de antibióticos y metabolitos secundarios

La Zwitermicina A (ZwA), fue primeramente identificada por la habilidad de *Bacillus cereus* UW85 al suprimir el damping-off de la alfalfa (Silo et al. 1994). Silo-Sah (1998) demostró que el ZwA tiene un rango de inhibición en diversos protistas, oomycetes, hongos y bacterias. La actividad inhibitoria de este antibiótico contra oomycetes puede ser de gran interés para el control de hongos fitopatógenos filamentosos, en donde las quitinasas pueden no tener actividad puesto que carecen de quitina celular (Theis y Stahl. 2004).

El modo de acción de ZwA no se entiende o se desconoce todavía, sin embargo se ha sugerido una asociación entre los efectos en potencial de la membrana, la actividad RNA polimerasa, y la sensibilidad a ZwA. Se ha demostrado que el antibiótico ZwA también es producido por *Bacillus thuringiensis*. Estudios recientes demuestran que el cluster 38.6 kb de biosíntesis de ZwA *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* cepa YBT-1520 tiene una organización similar a la de *Bacillus cereus* UW85.

La cianida hidrogenasa es un metabolito secundario producido típicamente de la glicina por hongos y bacterias durante la fase temprana de crecimiento estacionario (Mojica 2009).

2.6.3 Biopolímeros o polímeros naturales utilizados como adherentes en formulaciones de bioinsecticidas

Dentro del grupo de los biopolímeros encontramos tres subgrupos o categorías las cuales son:

- Proteínas, como la seda, fibras musculares y enzimas.
- Ácidos nucleicos (DNA y RNA)
- Polisacáridos, como la pectina, quitina, quitosan, almidón, entre otros.

La mayor parte de los polisacáridos se pueden clasificar también de acuerdo a sus funciones biológicas como:

- Polisacáridos de reserva, como el almidón y el glucógeno
- Polisacáridos estructurales, por ejemplo la celulosa y la quitina (Horton et al. 1995; Lehninger et al. 1995)

2.6.4 Almidón

El almidón, el polisacárido del almacenaje de los cereales, legumbres y tubérculos, es una materia prima renovable y extensamente disponible para una variedad de aplicaciones industriales. El maíz es la fuente primaria del almidón, aunque cantidades considerables de almidón se producen de la papa, trigo y arroz en Europa, el Oriente y los Estados Unidos. Cada año cerca del 20% de éste es consumido por industrias no alimenticias en Europa (Suvorova et al. 1995).

2.6.5 Grenetina

La Grenetina posee en grado sumo las propiedades características de los coloides hidrofílicos facilitando la formación de emulsiones, suspensiones y geles lo cual aunado a su naturaleza proteica, la convierten en un producto muy versátil de utilización extensiva en las industrias alimentaria, farmacéutica, fotográfica y otras más. La grenetina en general, contiene 85% de proteínas, 12% de agua y de 1-2% de sales. Como es un nutriente para los

microorganismos, cuando hay altas concentraciones de ellos las enzimas que secretan la atacan y se produce una degradación rápida de sus propiedades.

3. JUSTIFICACIÓN

La pérdida económica generada en la agricultura a nivel mundial por microorganismos fitopatógenos a través de los años, surge la necesidad de buscar nuevas estrategias para el control de hongos fitopatógenos que atacan a una gran variedad de cultivos. En este trabajo se evaluará el potencial antagónico de cepas de *Bacillus thuringiensis* contra hongos fitopatógenos con la finalidad de explorar otras formas de su utilización para la protección de cultivos agrícolas.

4. HIPÓTESIS

Alguna de las cepas de colección de *Bacillus thuringiensis* tienen efecto antagónico sobre hongos fitopatógenos de importancia agrícola.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Demostrar el uso potencial de *Bacillus thuringiensis* como agente antagónico de hongos fitopatógenos utilizando 17 cepas de *Bacillus thuringiensis* de la colección del Instituto de biotecnología contra algunos de los principales hongos fitopatógenos.

5.2 Objetivos Particulares

1. Evaluar la actividad antagónica in vitro de 17 cepas de *Bacillus thuringiensis* de la colección GM y HD sobre los siguientes hongos fitopatógenos de importancia agrícola: *Fusarium solani*, *Phytophthora infestans*, *Colletotrichum spp.*, *Macrophomina spp.*
2. Evaluar la inocuidad de las cepas de *Bacillus thuringiensis* seleccionadas por presentar efecto antagónico hacia alguno de los hongos fitopatógenos sobre plántulas de frijol, chile y tomate.
3. Determinar actividad antagónica de las cepas de *Bacillus thuringiensis* seleccionadas en el sobrenadante y en el complejo espora cristal.
4. Determinar el potencial antagónico de las cepas de *Bacillus thuringiensis* seleccionadas utilizando una película a base de grenetina-almidón- cepa antagónica sobre semillas de frijol, tomate y/o chile.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material Vegetal

Se utilizaron semillas de chile, tomate y frijol, las cuales se desinfectaron en una solución de hipoclorito sódico al 2%, durante 5 minutos, lavándose tres veces con agua destilada estéril y se pusieron a germinar en contenedores con una mezcla de tierra y humus de lombriz en proporción (1:1/2) esterilizada. Los contenedores se mantuvieron en invernadero hasta el desarrollo de la quinta hoja verdadera.

6.2 Material microbiológico

6.2.1 Capas de *Bacillus thuringiensis*

Las 17 cepas GM y HD de *Bacillus thuringiensis* que se probaron como agentes antagonistas fueron proporcionadas por la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

La activación de las cepas se llevó a cabo en tubos de ensayo con 5 ml de caldo nutritivo a pH 7, incubando a 30°C durante 24 h, 150 rpm. Posteriormente, se resembraron en tubos de agar nutritivo inclinado a pH 7, incubando a 28°C durante 48 h.

Tabla I. Cepas GM de *Bacillus thuringiensis* usadas en los ensayos de antagonismo.

GM-1	GM-7	GM-18
GM-2	GM-10	GM-54
GM-3	GM-13	GM-58

Tabla II. Cepas HD de *Bacillus thuringiensis* usadas en los ensayos de antagonismo

HD-1	HD-37	HD-263
HD-24	HD-53	HD-331
HD-29	HD-73	

6.3 Hongos fitopatógenos

Los 5 hongos fitopatógenos usados fueron proporcionados por la colección del INIFAP de general Terán, Nuevo León, se conservaron en cajas con medio PDA (agar papa dextrosa) previamente esterilizado a 121°C durante 20 minutos.

Tabla III. Cepas de hongos fitopatógenos usadas

<i>Macrophomina spp</i>
<i>Fusarium solani</i>
<i>Pythophthora infestans</i>
<i>Colletotrichum spp</i> ⁷
<i>Colletotrichum spp</i> ⁸

6.4 Determinación de antagonismo in vitro de *Bacillus thuringiensis* contra hongos fitopatógenos

Para determinar la capacidad de inhibición de crecimiento con cada uno de los hongos fitopatógenos, se evaluaron cada una de las cepas de *Bacillus thuringiensis* de tres formas: solo el sobrenadante, el precipitado (esporas-cristales) y el cultivo total. A partir de las cepas activadas de *Bacillus thuringiensis*, se tomaron varias asadas para inocular

matraces Erlenmeyer de 250 ml por cepa con 50 ml de Caldo Triptosa y Fosfato (CTP), los que se incubaron en agitación a 250 rpm a 30° C por 16 hrs. Posteriormente se utilizaron como inóculo en una proporción 1% (V/V) para 100 ml Caldo nutritivo /o Medio melaza en matraces Erlenmeyer de 250 ml, los cuales se incubaron en agitación a 250 rpm a 30° C por 16 hrs.

Los cultivos de *Bacillus thuringiensis* de las cepas que mostraron antagonismos contra los hongos fitopatógenos fueron separados mediante centrifugación a 15,000 rpm durante 20 minutos, para obtener el sobrenadante y precipitado, este último se resuspendió en agua destilada para comparar el efecto de estos contra el cultivo total.

Para llevar a cabo el bioensayo de antagonismo se colocó un disco de agar con el cultivo puro del hongo fitopatógeno a evaluar en el centro de una caja Petri con PDA, posteriormente se trazó un círculo de 6 cm de diámetro rodeando el inóculo fúngico con una suspensión bacteriana del antagonista a una concentración de 10^9 , los experimentos se realizaron por duplicado.

Las cajas fueron incubadas a 27 °C, 72 horas, posteriormente se determinó el diámetro del crecimiento radial, tasa de crecimiento y el porcentaje de inhibición y se comparó con el control en donde la suspensión bacteriana fue sustituida por agua destilada estéril. Los resultados se expresan como el porcentaje de las medidas de inhibición correspondiente a cada una de las cepas bacterianas.

El porcentaje de inhibición fue calculada usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = (1 - (\text{crecimiento fúngico} / \text{crecimiento del control}) \times 100)$$

6.5 Germinación en charola para semillas de chile, tomate y frijol

Para esta prueba la siembra se realizó en charolas plásticas, los cuales fueron llenados con una mezcla de tierra y humus de lombriz en proporción (1:1/2) esterilizada, como sustrato. Posteriormente se depositaron 5 semillas por cada charola, la siembra se efectuó a una profundidad de 5 cm, esta prueba se realizó por duplicado utilizando 50 semillas por siembra, las charolas se incubaron a temperatura ambiente. La germinación

de las semillas se contabilizó a los 14 días después de la siembra. Se realizó el mismo procedimiento con cada una de las diferentes semillas utilizadas

6.6 Bioensayo de inocuidad de *Bacillus thuringiensis* sobre plántulas de chile, tomate y frijol

A partir de las cepas activadas de *Bacillus thuringiensis*, se tomaron varias asadas para inocular matraces Erlenmeyer de 250 ml por cepa con 50 ml de Caldo Triptosa y Fosfato (CTP), los cuales se incubaron en agitación a 250 rpm a 30° C por 16 hrs. Posteriormente se utilizaron como inóculo en una proporción 1% (V/V) para 100 ml Caldo nutritivo en matraces Erlenmeyer de 250 ml, los cuales se incubaron en agitación a 250 rpm a 30° C por 16 hrs.

Las soluciones preparadas fueron asperjadas sobre 25 plántulas para evaluar el daño causado a los 15 días de la aspersión del inóculo, el experimento se realizó por duplicado.

6.7 Germinación in vitro para semillas de chile, tomate y frijol

Para esta prueba la siembra de las semillas previamente desinfectadas se realizó en cajas Petri con agar agua al 2% las cuales contenían 3 semillas cada una, se utilizaron 150 semillas por siembra y se incubaron a temperatura de laboratorio. La germinación de las semillas se contabilizó a los 14 días después de la siembra. Se realizó el mismo procedimiento con cada una de las diferentes semillas utilizadas

6.8 Evaluación de potencial antagónico de *Bacillus thuringiensis* sobre semillas

Para la preparación de semillas cubiertas con *Bacillus thuringiensis*- polímero, se utilizó una mezcla de polímeros gnetina–almidón a proporciones ya previamente establecidas por (Rosas 2002), la cual se mezcló con el cultivo total de *Bacillus thuringiensis* que contenía una concentración 10^9 células/ml, la proporción final de polímeros utilizada se muestra en la siguiente tabla:

Tabla IV. Polímeros Naturales

Componentes	g/l
Grenetina	8
Almidón Modificado	127

Cada uno de los cultivos obtenidos se puso en un vaso de precipitado, en agitación a velocidad media, sobre una base magnética, se le añadió gradualmente el almidón modificado y la grenetina previamente disuelta en 20 ml de agua, incrementando paulatinamente la velocidad de agitación hasta obtener una solución uniforme y homogénea, en la cual las semillas fueron sumergidas y posteriormente se dejaron secar para formar la cubierta Bt-polímero. Para realizar el bioensayo se utilizaron los siguientes tratamientos:

Tabla V. Tratamientos Utilizados en la Evaluación de potencial antagónico de *Bacillus thuringiensis* sobre semillas

T1: Semillas sin polímeros-Bt y sin inoculación de hongo
T2: Semillas sin polímeros-Bt e inoculadas con hongo
T3: Semillas con polímeros-Bt e inoculadas con hongo
T4: Semillas con polímeros-Bt sin inoculación de hongo
T5: Semillas con polímeros- sin -Bt y sin hongo (Control)
T6: Semillas sin polímeros- sin -Bt y sin hongo (Control)

La inoculación con el hongo fitopatógeno se realizó utilizando una solución de 10^6 zoosporas/ml en la cual se sumergieron las semillas y se dejaron secar. Posteriormente 20 semillas se colocaron en agar agua al 2% para observar la germinación de las mismas, el experimento se realizó por duplicado.

7. RESULTADOS

7.1 Determinación de antagonismo in vitro de *Bacillus thuringiensis* contra hongos fitopatógenos

Se evaluaron las 17 cepas de *Bacillus thuringiensis* contra los hongos fitopatógenos, utilizando cultivos totales para cada uno de los medios de cultivos.

Tabla VI. Selección de Cepas Antagónicas de *Bacillus thuringiensis*

Cepas	<i>Macrophomina spp</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Pytophthora infestans</i>	<i>Colletotrichum spp</i> ⁷	<i>Colletotrichum spp</i> ⁸
GM-1					X
GM-2					
GM-3					
GM-7					
GM-10					
GM-13					
GM-18					
GM-54			X	X	X
GM-58			X	X	X
HD-1		X	X	X	X
HD-24			X	X	X
HD-29			X		
HD-37					
HD-53					
HD-73					
HD-263			X		
HD-331			X	X	

X= Cepas que mostraron inhibición contra los hongos seleccionados para los medios de cultivos Caldo Nutritivo y Medio Melaza

Los resultados de la prueba de selección de cepas antagonias mostraron que 7 de las 17 cepas de *B. thuringiensis* tuvieron efectos antagónicos contra 4 de los hongos fitopatógenos probados.

7.2 Determinación de antagonismo in vitro de las cepas seleccionadas de *Bacillus thuringiensis* cultivadas en dos medios diferentes contra hongos fitopatógenos

Los cultivos totales fueron separados en tres tratamientos; sobrenadante, precipitado y cultivo total, para evaluar el porcentaje de inhibición de cada una de las cepas de B.t. contra los diferentes hongos fitopatógenos, los resultados se presentan en la tabla VII

Tabla VII. Porcentajes de inhibición (72 hrs) para cepas antagonistas de *B.thuringiensis* cultivadas en dos medios diferentes contra hongos fitopatógenos.

	<i>Pytophthora infestans</i>		<i>Colletotrichum spp^a</i>		<i>Colletotrichum spp^b</i>		<i>Fusarium solani</i>	
	MM	CN	MM	CN	MM	CN	MM	CN
GM-1								
Sobrenadante	-	-	-	-	13.75	33.75	-	-
Precipitado	-	-	-	-	28.75	43.18	-	-
Cultivo Total	-	-	-	-	9.6	28.57	-	-
GM-54								
Sobrenadante	67.08	69.62	22.41	4.16	41.25	35	-	-
Precipitado	64.55	68.98	36.66	24.13	42.5	47.72	-	-
Cultivo Total	56.96	63.92	32.35	32.43	33.33	32.85	-	-
GM-58								
Sobrenadante	50.63	62.65	3.44	2.08	32.5	21.25	-	-
Precipitado	57.59	54.43	15	12.06	13.75	20.45	-	-
Cultivo Total	56.96	59.49	19.11	17.56	22.22	17.14	-	-
HD-1								
Sobrenadante	58.22	56.32	36.25	43.9	37.8	42.68	9.09	5
Precipitado	58.86	56.96	36.84	47.56	42.85	43.18	9.09	4.76
Cultivo Total	60.12	59.49	44.59	45.12	52.32	41.66	6.81	15
HD-24								
Sobrenadante	58.22	63.29	30.65	34.48	38.46	38.46	-	-
Precipitado	59.49	67.72	4.76	11.76	39.18	42.1	-	-
Cultivo Total	67.72	60.75	41.17	29.31	50	51.28	-	-
HD-29								
Sobrenadante	52.53	57.59	-	-	-	-	-	-
Precipitado	52.53	49.36	-	-	-	-	-	-
Cultivo Total	52.53	60.12	-	-	-	-	-	-
HD-263								
Sobrenadante	67.08	60.12	-	-	-	-	-	-
Precipitado	63.29	65.18	-	-	-	-	-	-
Cultivo Total	64.55	68.35	-	-	-	-	-	-
HD-331								
Sobrenadante	47.46	50.63	27.5	41.46	-	-	-	-
Precipitado	55.06	51.89	30.26	42.68	-	-	-	-
Cultivo Total	52.53	52.53	27.02	42.68	-	-	-	-

*CN= Caldo Nutritivo, MM=Medio Melaza

Los resultados de la prueba mostraron que el hongo mas susceptible a *B. thuringiensis* para ambos cultivos probados fue *Phytophthora infestans*.

Se realizaron análisis de varianza mediante la prueba de tukey (los valores con la misma letra son similares estadísticamente de acuerdo a esta prueba), para las cepas de *B.*

thuringiensis que mostraron antagonismo contra el hongo de *Phytophthora infestans* se les determinó el efecto antagónico de los diferentes tratamientos en los dos medios de cultivo diferentes vs *Phytophthora infestans*.

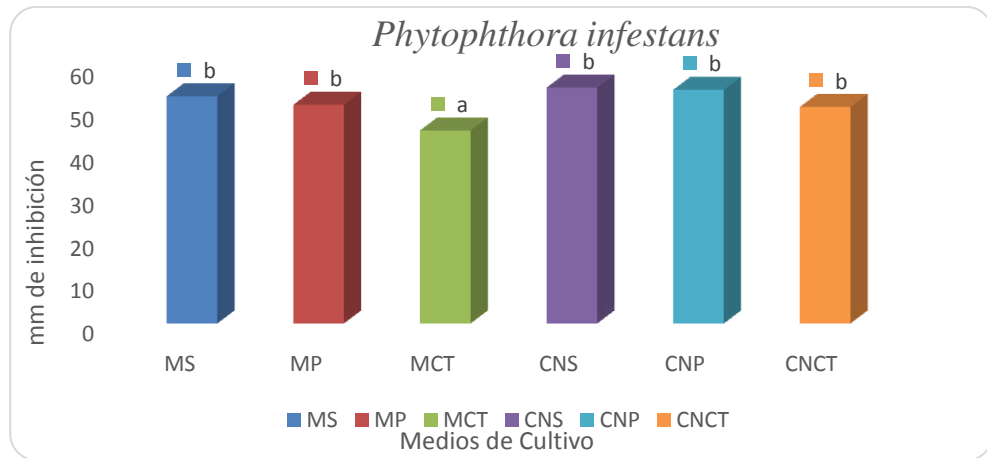


Figura 1. Efecto del medio de cultivo y de las diferentes fracciones usadas en el porcentaje de inhibición para la cepa GM-54. MS= Melaza sobrenadante, MP= Melaza precipitado, MCT= Melaza cultivo total, CNS= Caldo nutritivo sobrenadante, CNP= Caldo nutritivo precipitado, CNCT= Caldo nutritivo cultivo total.

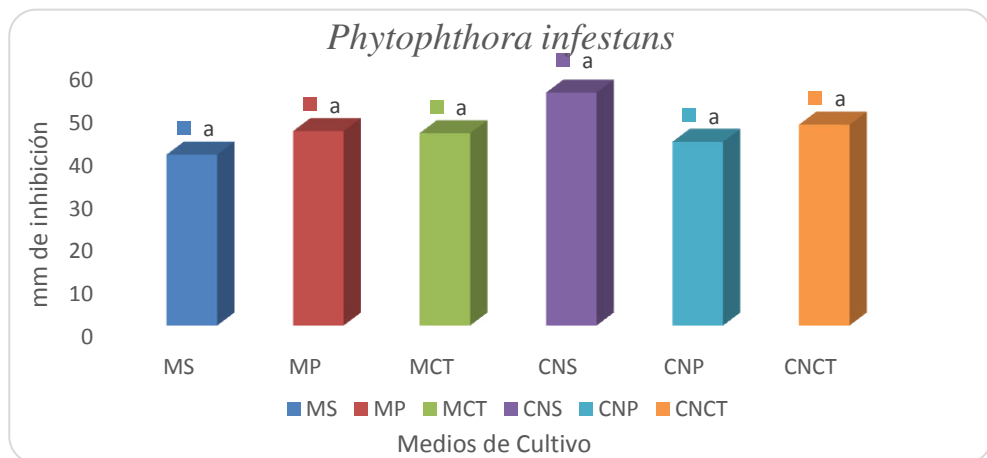


Figura 2. Efecto del medio de cultivo y de las diferentes fracciones usadas en el porcentaje de inhibición para la cepa GM-58. MS= Melaza sobrenadante, MP= Melaza precipitado, MCT= Melaza cultivo total, CNS= Caldo nutritivo sobrenadante, CNP= Caldo nutritivo precipitado, CNCT= Caldo nutritivo cultivo total.

La cepa GM-34 mostró diferencia significativa entre los tratamientos mientras que la cepa GM-58 no mostraro diferencia significativa.

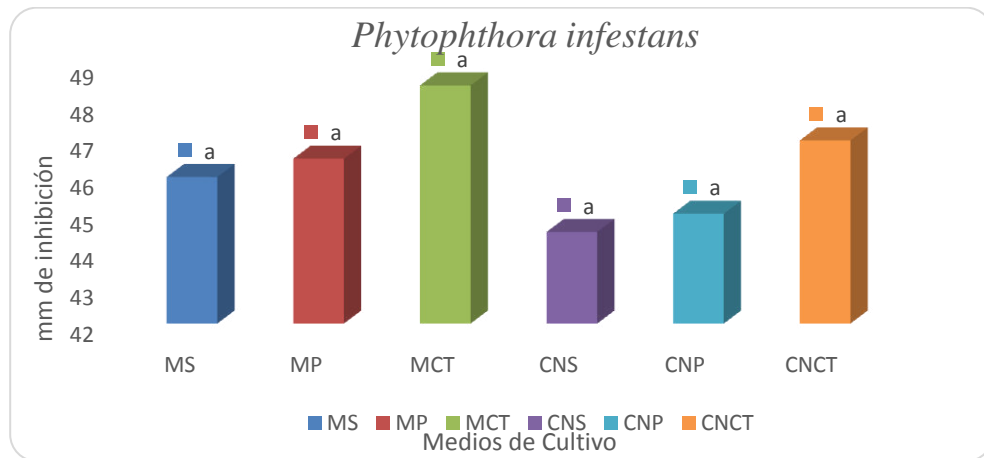


Figura 3. Efecto del medio de cultivo y de las diferentes fracciones usadas en el porcentaje de inhibición para la cepa HD-1. MS= Melaza sobrenadante, MP= Melaza precipitado, MCT= Melaza cultivo total, CNS= Caldo nutritivo sobrenadante, CNP= Caldo nutritivo precipitado, CNCT= Caldo nutritivo cultivo total.

La cepa HD-1 no mostró diferencia significativa entre los tratamientos usados.

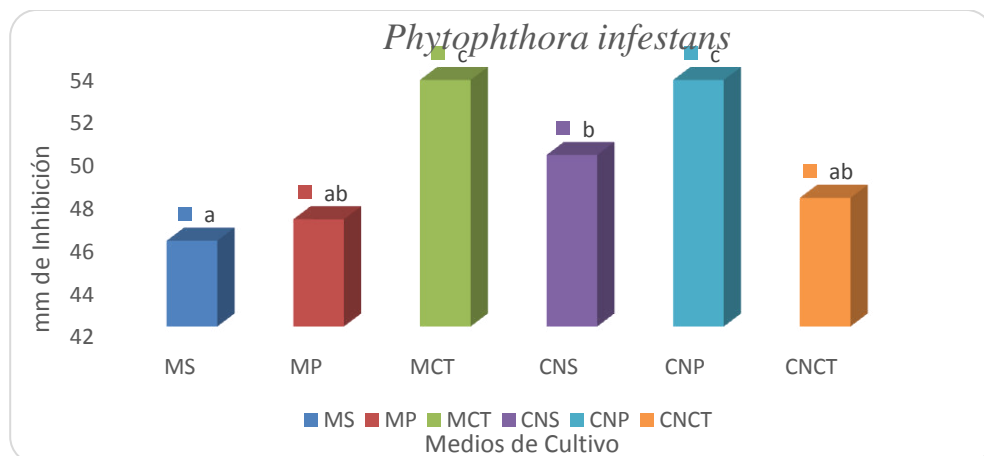


Figura 4. Efecto del medio de cultivo y de las diferentes fracciones usadas en el porcentaje de inhibición para la cepa HD-24. MS= Melaza sobrenadante, MP= Melaza precipitado, MCT= Melaza cultivo total, CNS= Caldo nutritivo sobrenadante, CNP= Caldo nutritivo precipitado, CNCT= Caldo nutritivo cultivo total.

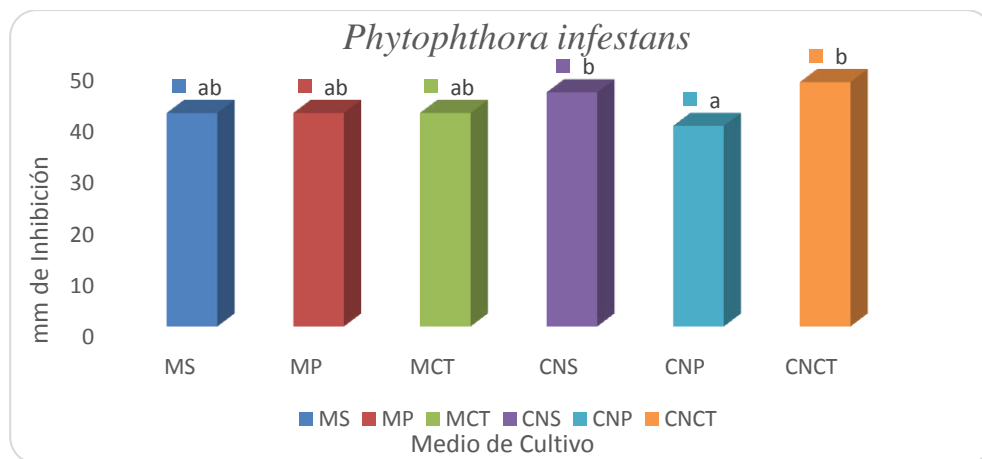


Figura 5. Efecto del medio de cultivo y de las diferentes fracciones usadas en el porcentaje de inhibición para la cepa HD-29. MS= Melaza sobrenadante, MP= Melaza precipitado, MCT= Melaza cultivo total, CNS= Caldo nutritivo sobrenadante, CNP= Caldo nutritivo precipitado, CNCT= Caldo nutritivo cultivo total.

Las cepa HD-24 y HD-29 mostraron diferencia significativa entre los tratamientos usados.

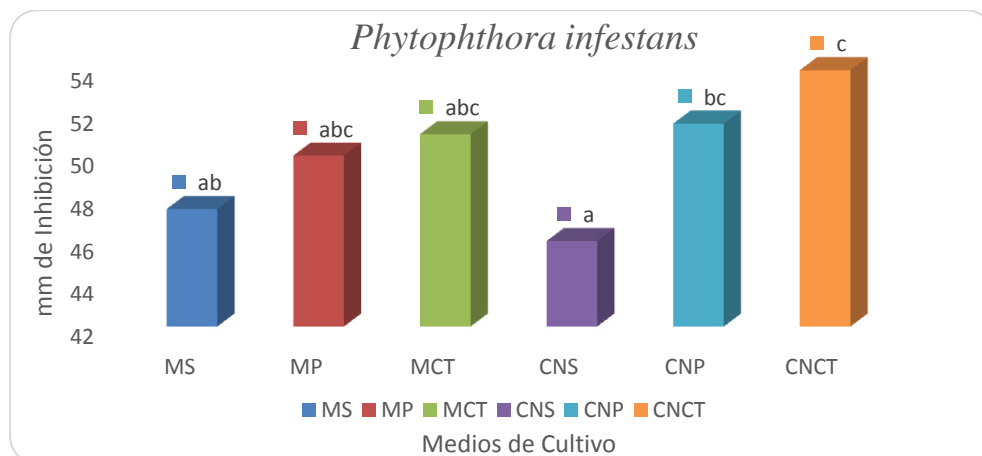


Figura 6. Efecto del medio de cultivo y de las diferentes fracciones usadas en el porcentaje de inhibición para la cepa HD-263. MS= Melaza sobrenadante, MP= Melaza precipitado, MCT= Melaza cultivo total, CNS= Caldo nutritivo sobrenadante, CNP= Caldo nutritivo precipitado, CNCT= Caldo nutritivo cultivo total.

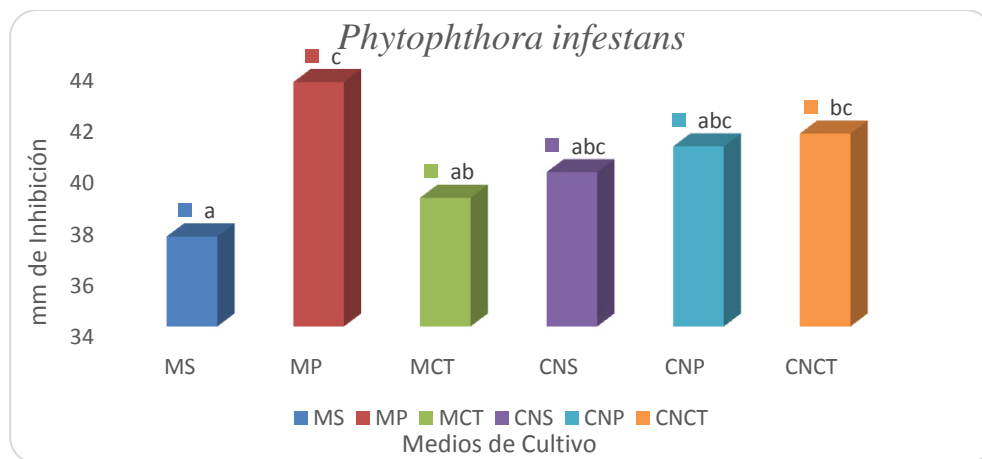


Figura 7. Efecto del medio de cultivo y de las diferentes fracciones usadas en el porcentaje de inhibición para la cepa HD-331. MS= Melaza sobrenadante, MP= Melaza precipitado, MCT= Melaza cultivo total, CNS= Caldo nutritivo sobrenadante, CNP= Caldo nutritivo precipitado, CNCT= Caldo nutritivo cultivo total.

Las cepa HD-226 y HD-331 mostraron diferencia significativa entre los tratamientos usados. En base a los resultados anteriores se seleccionó el tratamiento CNCT de *B. thuringiensis* ya que mostró mayor actividad antagónica contra *Phytophthora infestans*.

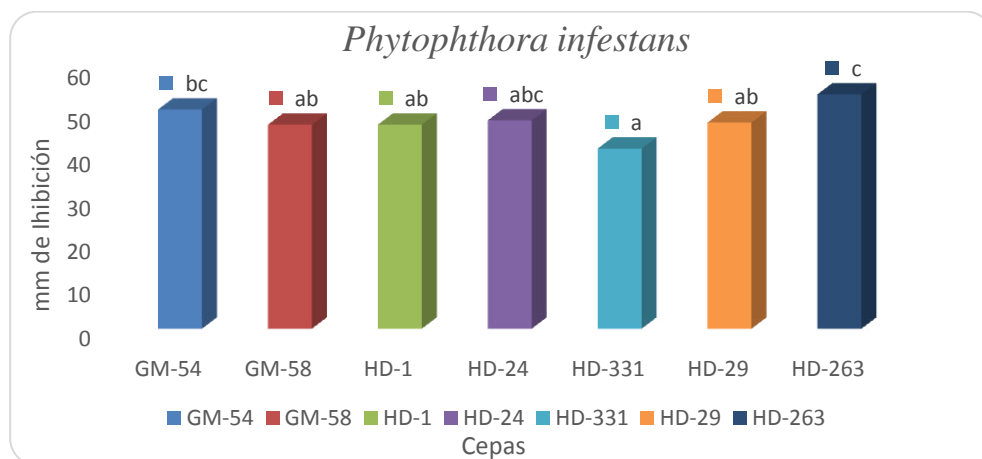


Figura 8. Comparación del porcentaje de inhibición de *P. infestans* de las diferentes cepas de *B. thuringiensis* utilizando el medio CNCT.

Las cepas de *B. thuringiensis* mostraron diferencia significativa para el medio CNCT.

7.3 Germinación en charola para semillas de chile, tomate y frijol

Se llevo a cabo la germinación de semillas de frijol, chile y tomte para evaluar la calidad de las semillas, los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla VIII. Porcentaje de Germinación de semillas en charola alveolares.

Tipo de Semilla	% Germinación
Frijol	98.00%
Chile	96.00%
Tomate	97.33%

Los resultados de la prueba de germinación realizada para las semillas de frijol, chile y tomate comprueba la calidad de las semillas.

7.4 Bioensayo de inocuidad de *Bacillus truringiensis* sobre plántulas de chile, tomate y frijol

Para la evaluación de la inocuidad de *Bacillus turingiensis* hacia las semillas, se probaron los cultivos totales sobre las plántulas de chile, tomate y frijol.

Tabla IX. Porcentaje de inocuidad de cepas de *Bacillus thuringiensis* sobre plántulas de Frijol, Chile y Tomate.

Cepa	% Inocuidad
GM-54	100%
GM-58	100%
HD-24	100%
HD-29	100%
HD-263	100%
Control	100%

Las cepas de *B. thuringiensis* probadas sobre plántulas mostraron ser 100% inocuas.

7.5 Germinación in vitro para semillas de chile, tomate y frijol

La prueba de germinación in vitro de las semillas de chile, tomate y frijol, fue llevada a cabo para determinar la calidad de las semillas.

Tabla X. Porcentaje de Germinación de semillas in vitro.

Tipo de Semilla	% Germinación
Frijol	98.66%
Chile	90.66%
Tomate	94.66%

Los resultados de la prueba de germinación realizada para las semillas de frijol, chile y tomate comprueba la calidad de las semillas.

7.6 Evaluación de potencial antagónico de *Bacillus thuringiensis* sobre semillas de frijol, chile y tomate

Para la evaluación del potencial antagónico de *Bacillus thuringiensis* primero se determinó la inocuidad de B.t. midiendo el porcentaje de germinación in vitro para las semillas inoculadas con cada una de las cepas sin polímeros y con polímeros, los resultados se muestran en las siguientes tablas.

Tabla XI. Porcentaje de Germinación in vitro de semillas sin polímeros expuestas a cultivos de B.t

Cepa	Frijol	Chile	Tomate
GM-54	80.00	36.66	63.33
GM-58	73.33	46.66	70.00
HD-24	66.66	33.33	73.33
HD-29	76.66	63.33	66.66
HD-263	76.66	43.33	70.00
Control	60.00	50.00	46.66

El menor porcentaje de germinación para todas las cepas probadas fue observado sobre las semillas de chile.

Tabla XII. Porcentaje de Germinación in vitro de semillas con cobertura B.t -polímeros.

Cepa	Frijol	Chile	Tomate
GM-54	60.00	26.66	46.66
GM-58	66.66	53.33	60.00
HD-24	73.33	33.33	66.66
HD-29	86.66	20.00	76.66
HD-263	63.33	43.33	50.00
Control	73.33	33.33	70.00

El menor porcentaje de germinación para todas las cepas probadas fue observado sobre las semillas de chile.

7.7 Determinación del potencial antagonístico de cepas de *B. thuringiensis* utilizando semillas de frijol, chile y tomate protegidas con una película a base de almidón-gelatina y la cepa de *B. thuringiensis*, posteriormente inoculadas con *Phytophthora infestans*.

Se realizaron análisis de varianza mediante la prueba de tukey (los valores con la misma letra son similares estadísticamente de acuerdo a esta prueba), para los resultados de los semillas tratadas.

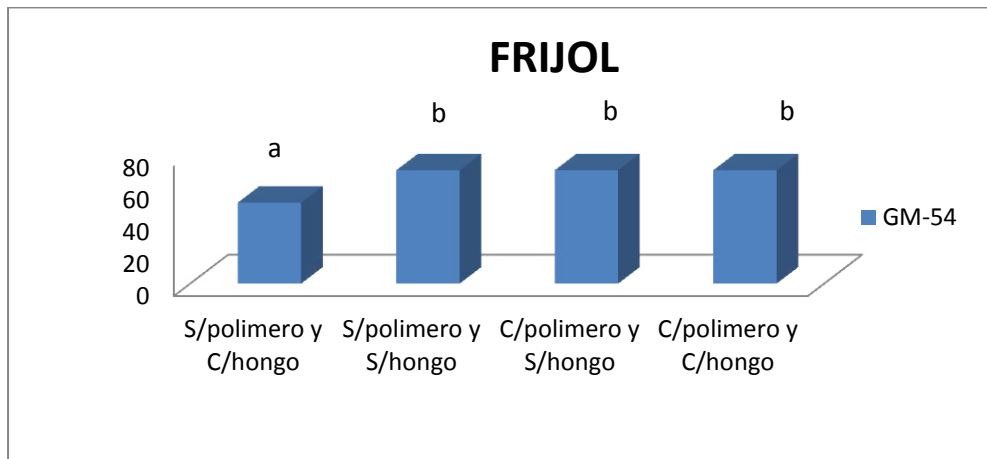


Figura 9. Comparación del porcentaje de germinación de la cepa GM-54 con los diferentes tratamientos probados en semillas de frijol.

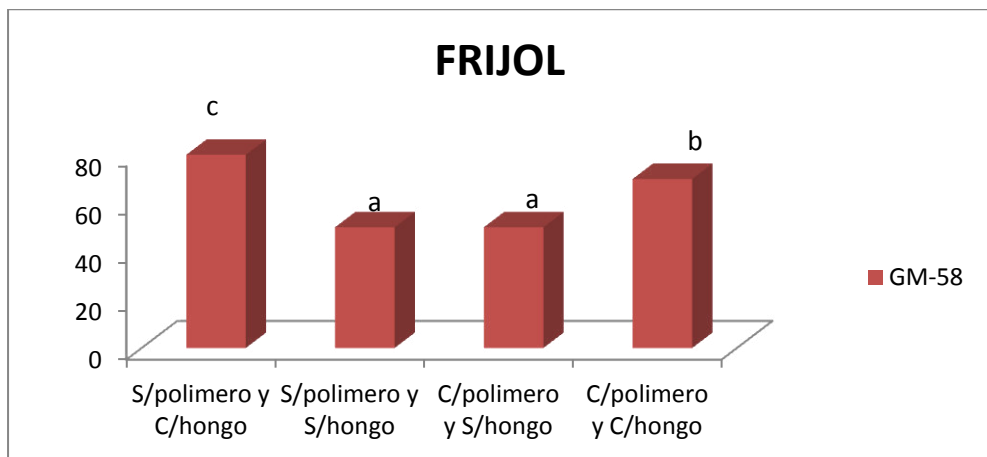


Figura 10. Comparación del porcentaje de germinación de la cepa GM-58 con los diferentes tratamientos probados en semillas de frijol.

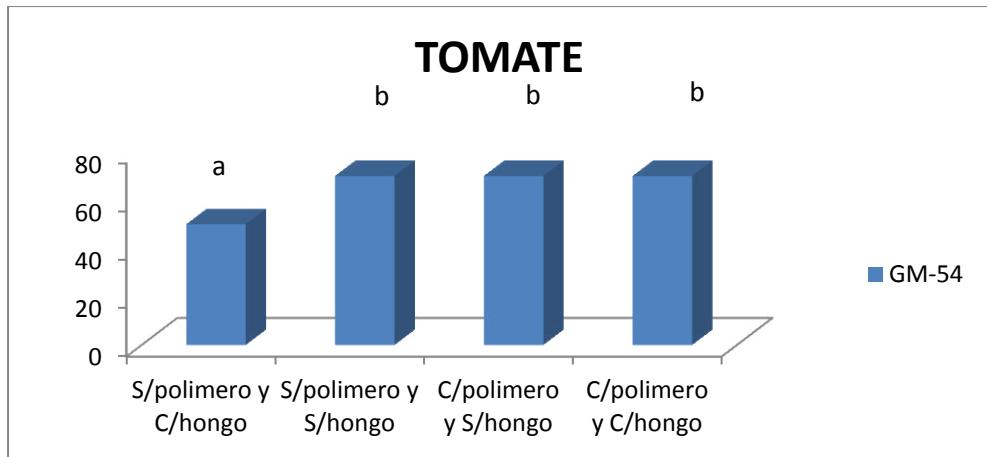


Figura 11. Comparación del porcentaje de germinación de la cepa GM-54 con los diferentes tratamientos probados en semillas de tomate.

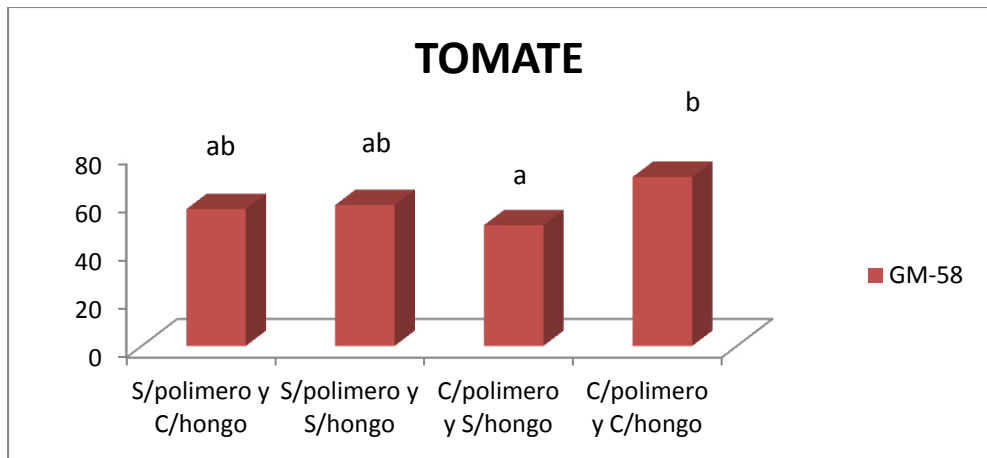


Figura 12. Comparación del porcentaje de germinación de la cepa GM-58 con los diferentes tratamientos probados en semillas de tomatel.

8. DISCUSIÓN

Está ampliamente documentado que cepas de una misma especie, pueden exhibir diferentes capacidades para producir toxinas e inhibir el crecimiento de diferentes microorganismos (Di Pietro et al.1991; Choi et al. 1999). La mayoría de las cepas de *Bacillus spp.* producen muchas clases de antibióticos como bacilomicina, fungimicina, micosuptilina y zwittermicina, los cuales son efectivos en la supresión del crecimiento de patógenos (Pal y Gardener 2006). En el presente estudio, la prueba de inhibición mostró resultados favorables para ocho de las 17 cepas de *B. thuringiensis* probadas, contra 5 hongos fitopatógenos, se encontró que *Phytophthora infestans* fue el más susceptible a la inhibición, mientras que el hongo fitopatógeno *Macrophomina spp.* no fue afectado por ninguna de las cepas de *B. thuringiensis* probadas.

El efecto inhibidor de las cepas de *B. thuringiensis* en hongos fitopatógenos se puede asociar a la producción de enzimas que pueden actuar contra la pared celular, esto es debido a que algunas bacterias antagónicas de hongos fitopatógenos producen quitinasas (Mavingi y Heulin 1994; Asaka y Soda 1996). En el presente trabajo se utilizaron dos medios de cultivo. Los mejores porcentajes de inhibición mostrados por las cepas de *B. thuringiensis* crecidas en caldo nutritivo contra los hongos probados fueron los encontrados para *Phytophthora infestans* con las siguientes cepas de B.t: GM-54 (63.92%), HD-263 (68.35%), HD-24 (60.75%), HD-29 (60.12 %), GM-58 (59.49%), HD-1 (59.49%) y HD-331 (52.53%). Para las cepas crecidas en medio melaza los también se observaron contra *Phytophthora infestans* con los resultados siguientes: GM-54 (56.96%), HD-263 (64.55%), HD-1 (60.12%), HD-29 (52.53 %), GM-58 (56.96%), HD-24 (67.72%) y HD-331 (52.53%).

Los resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y una comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$), las cepas GM-58 y HD-1 no mostraron diferencia significativa entre los medios de cultivo utilizados. El resto de las cepas de *B. thuringiensis* mostraron diferencias significativa entre ellas en los diferentes medios de cultivo probados, el medio CNCT fue el que mostró mayor porcentaje de inhibición para *Phytophthora infestans* con las cepa GM-54 y HD-29 y HD-263, las cepas restantes

mostraron el mayor porcentaje de inhibición para *Phytophthora infestans* al utilizar el medio melaza HD-24 (MCT) y HD-331 (MP). Las cepas HD-24 en medio melaza y HD-263 en caldo nutritivo mostraron diferencia significativa contra al resto de las cepas de B.t. probadas.

Se debe destacar que la cepa HD-263 (68.35%) mostró diferencia significativa con respecto al porcentaje de inhibición comparada con el resto de las cepas probadas para CTCN.

También se probaron tres fracciones de los diferentes cultivos en los dos medios utilizados para el crecimiento de las cepas de *B. thuringiensis*, los sobrenadantes y precipitados de las cepas fueron comparados con los resultados de los cultivos totales. Esto fue realizado con la finalidad de probar si alguno de los componentes del cultivo ejercían un mayor porcentaje de inhibición contra *Phytophthora infestans*. Los mejores resultados se encontraron en los cultivos totales probablemente a la presencia de enzimas proteolíticas de *B. thuringiensis*, y a la acción sinérgica de las quitinasas y proteínas Cry utilizados en el control biológico de fitopatógenos según lo reportado por Barboza y colaboradores en 1999.

El uso constante y creciente de los productos que se obtienen a partir de *B. thuringiensis* se debe a su alta especificidad, así como a su inocuidad para insectos benéficos, plantas y mamíferos, incluidos los humanos (Tamez et al. 2007), los resultados para la prueba de inocuidad de *B. thuringiensis* sobre plántulas de frijol, chile y tomate mostraron que las cepas probadas fueron 100% inocuas.

De acuerdo con Sayer (1982) la prueba de germinación se emplea para medir el máximo potencial de viabilidad de las semillas y señala que se han establecido criterios para evaluar las plántulas al final de un periodo específico para determinar si poseen las estructuras necesarias para la producción de plantas normales por ello la prueba requiere de las condiciones óptimas para obtener todo el potencial de germinación normal de la semilla.

Los resultados de germinación en el presente estudio muestran para las semillas de frijol un 98.66%, para chile 90.66% y para tomate 94.66%, sin embargo la experiencia de quienes se dedican a la tecnología de semillas indican con gran frecuencia, que la calidad

fisiológica de semillas es influenciada por el medio ambiente, las condiciones ambientales pueden no ser favorables al momento de la siembra y el porcentaje de plántulas emergidas pueden ser inferior a la germinación determinada en el laboratorio (Marcos Filho et al. 1987).

Las especies de *Bacillus* son candidatos ideales como agente de control biológico para usarse en los tratamientos a las semillas dentro del programa de control de patógenos del suelo causantes de enfermedades de las plantas (Walker et al. 1998), ya que se encuentran en la rizosfera (Medrano et al. 2000).

Los resultados de los tratamientos usados en las semillas de frijol, chile y tomate fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y una comparación de medias de Tukey, los tratamientos en las semillas de chile no mostraron diferencia significativa contra el resto de los tratamientos probados, sin embargo los tratamientos con las cepas GM-54 y GM-58 sobre semillas de frijol y tomate mostraron diferencias significativas entre ellas. El tratamiento que mostró un mayor porcentaje de germinación fue el de semillas con polímero- *Bacillus thuringiensis* y hongo. Lo que muestra el efecto protector de la película Bt- polímero impidiendo que el entomopatógeno ataque a la semilla evitando su germinación u obtener una plántula enferme.

9. CONCLUSIONES

1. Se logró demostrar el uso potencial de *B. thuringiensis* como agente de control de hongos fitopatógenos.
2. De las 17 cepas probadas de *B. thuringiensis*, solo 8 de estas mostraron efectos antagónicos contra los hongos fitopatógenos probados.
3. *Phytophthora infestans* fue el hongo fitopatógeno que mostró mayor susceptibilidad para las cepas GM-54, GM-58, HD-1, HD-24, HD-29, HD-263 y HD-331.
4. Las cepas crecidas en el medio de cultivo CNCT mostraron mayor efecto antagónico para la mayoría de las cepas probadas.
5. La cepa HD-263 de *B. thuringiensis* mostró un mayor efecto antagónico contra *Phytophthora infestans*.
6. Las cepas de *Bacillus thuringiensis* fue 100% inocua para las plántulas de frijol, chile y tomate.
7. Las semillas tratadas con polímeros y con hongos para las cepas GM-54 y GM-58 mostraron el porcentaje de germinación más alto.

LITERATURA CITADA

Agrios N. G. 1985. Fitopatología. Cuarta Edición. LIMUSA. México, D.F. pp. 756

Agrios, G.N. 1988. Plant Pathology. Third Edition. Academic Press. New York. pp 803

Agrios G.N. 1998. Fitopatología. Segunda Edición. UTEHA NORIEGA EDITORES , pp 125-130, 52-53.

Alexopouloulos CJ, Mims CW, Blackwell M. 1996. Introducción a la Micología. Ed. Jhon Wiley and Sons Inc. Cuarta Edición. USA. pp 756.

Álvarez ZR. 2003. El Biocontrol con *Trichoderma* y *Bacillus* como un factor del manejo integrado de la marchitez vascular del chile. Memorias del XXX Congreso de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. South Padre Island, Texas, USA. pp 120.

Asaka O, Shoda M. 1996. Biocontrol of *Rizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. Applied and Environmental Microbiology 62:4081-4085

Ascencio-Álvarez, A., López-Benítez, A., Borrego-Escalante, F., Rodríguez-Herrera, S.A., Flores-Olivas, A., Jiménez-Díaz, F. y Gámez-Vázquez, A.J. 2008. Marchitez vascular del tomate: I. Presencia de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología 26:114-120.

Ashworth, L.J., Huisman, O.C., Weinhold, A.R. & Hancock, J.G. 1981. Estimating Yield Losses Caused by Soil-Borne Fungi. In: Crop Loss Assessment Methods. Supplement 3. Chiarappa, L. (ed.) pp. 91-95. FAO. CAB. England, U. K.

Ayvar SS, Sosa-Moss M, Rosas R, Villarreal GL. 1994. Compendio de enfermedades de algunos cultivos de México. Vol.1 SARH. Serie Sanidad Vegetal. México; DF. pp 209.

Baker K.F. y Cook R.J. 1974. Biological Control of Plant pathogens. Freeman. San Francisco, CA, EEUU. pp 432.

Barbosa CJE, Contreras JC, Velásquez RR, Bautista JM, Gómez RM, Cruz CR, Ibarra JE. 1999. Selection of chitinolytic strains of *Bacillus thuringiensis*. Biotechnology Letters 21:1125-1129.

Beas Fernández, R., Reyes Franco, M.C., Medina Fernández, M., Hernández Delgado, S., y Mayek Pérez, N. 2004. *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de Aguascalientes: relación patogénica y genética con aislamientos de otras regiones de México. Revista Mexicana de Fitopatología 22:172-177.

Booth C. 1971. The genus *Fusarium* Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, Uniteds Kindom.

Calle Bellido Juan 2005. Caracterización Morfológica y molecular de hongos fitopatogenos de suelo e identificación de bacterias folaries en el cultivo de cebolla. Universidad de Puerto Rico, recinto universitario de Mayaguez. pp 5.

Choi KC, Young C, An SH, Yook B. 1999. Effects of antagonistic bacteria and soil borne pathogenic fungi on growth of pasture plant seedlings. Korean Journal of Dairy Science 21:41-48.

Cook, R.J. & Baker, K.F. 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minn. 539

Daffonchio D., Cherif A., Borin S. 2000. Homoduplex and heteroduplex polymorphisms of the amplified ribosomal 16S-23S internal transcribed spacers describe genetic relationships in the “*Bacillus cereus* group”. Applied and Environmental Microbiology 66: 5460-5468.

Di pietro D, Gut MR, Pachlatko JP, Schwinn A. 1991. Role of antibiotics produced by *Chaetomium globosum* in biocontrol of *Pythium ultimum*, a causal agent of damping-off. Phytopathology 82:131-135.

Ezziyyani Mohammed, , Pérez Sánchez C., Requena M.E., Ahmed Sid Ahmed & Candela M.E. 2004. Evaluación del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*. Anales de Biología 26: 61-68.

Glare TR, O’Callaghan M. 2000. Characterisation. In: *Bacillus thuringiensis: Biology, Ecology and Safety*, J. Wiley and Sons Ltd, West Sussex PO19 1UD, UK, pp 71-79.

Hernandez C.S., Andrewa R., Ferré Y.B.J. 2005. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from potato-growing areas in Bolivia. Journal Invertebrate Pathology 88:8-16.

Hernández Lauzardo, A.N., Bautista Baños, S., Velázquez del Valle, M.G. y Hernández Rodríguez, A. 2007. Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. Revista Mexicana de Fitopatología 25:66-74.

Herrera Teófilo y Miguel Ulloa 1998. El Reino De Los Hongos, Microbiología básica y aplicada. Segunda Edición. México. pp 183, 55-56.

Horton H. R., Moran L. A., Ochs R. S., Rawn J. D., Scrimgeour. 1993, Bioquímica, Editorial Prentice Hall Hispanoamericana.

Infante D., Martínez B., González N. y Reyes Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Revista Protección Veg. Vol. 24 No.1; 14-21.

Karamanlidou G.; Lambropoulos A.F. ; Kolais S.I. ; Manolis T. ; Ellar D. and Kastritsis C. 1991. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to laboratory populations of the olive fruit fly (*Dacus oleae*). Appl. Environ. Microbiol. 57: 2277-2282.

Lehninger A. L., Nelson D. L., Cox M. M. 1995, Principios de Bioquímica, Editorial Omega, Segunda Edición.

Lozano Ramírez, N., Mezzalama, M., Carballo Carballo, A. y Livera Hernández, A. 2006. Efectos de fungicidas en la calidad fisiológica de la semilla de trigo harinero (*Triticum aestivum* L.) y su eficacia en el control de *Fusarium graminearum* Schwabe [*Gibberella zeae* (Schwein.) Petch.] y *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker [*Cochliobolus sativus* S. Ito y Kurib.]. Revista Mexicana de Fitopatología 24:115-121.

Lumsden, R.D. 1981. Ecology of Mycoparasitism. In: The Fungal Community. Its Organization and Role in the Ecosystem. Wicklow, D. T. y Carroll, G. C. (eds.), pp. 295-318. Mycology Series. Marcel Dekker, Inc. New York.

Marcos FJ, Cícero SM, Silva WR. 1987. Avaliação de qualidade das sementes. Piracicaba; FEALQ. pp. 230.

Martinez M.H.; Sánchez Yáñez J.M. 1998. Presencia y Sobrevivencia de *Bacillus thuringiensis* en Granos de Almacén. Morelia, Mich., México.

Mavingui P.; Heulin T. 1994. *In vitro* chitinase and antifungal activity of a soil, rhizosphere and rhizoplane population of *Bacillus polymyxa*. Soil Biology and Biochemistry 26: 801-803.

Meadows M.P.; Ellis D.J.; Jarret P. and Burges H.D. 1992. Distribution, frequency and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. Appl. Environ. Microbiol. 58 :1344-1350.

Medranao G.M.A.; Luna O.H.A.; Sánchez-Yáñez J.M.2000. Sobrevivencia de Células Vegetativas de *Bacillus thuringiensis* en la Espermósfera/Rizósfera de Frijol. Terra 18(4): 333-337

Mojica Marin Virgilio 2009. *Bacillus thuringiensis* como agente de control Biológico del complejo de la marchitez del chile (*capsicum annuum L.*).Universidad Autónoma de Nuevo León.

Muñiz Villarreal H.M. 2006. Recuperación del complejo de *Bacillus thuringiensis* utilizando polímeros naturales. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

National Academy of Sciences. 1980. Desarrollo y Control de las Enfermedades de las Plantas. Control de Plagas de Plantas y Animales. Vol 1. Editorial Limusa. México. pp. 223

Pal K.K. y B. M. Gardener 2006. Biological control of plant pathogens. The Plant Health Instructor DOI: 10.1094/PHIA-2006-1117-02.

Ramos Sandoval R.U. 2009. Actividad Antagónica de *Xylaria* sp y otros agentes de Biocontrol contra patógenos del suelo que atacan a plantas de chile *Capsicum annuum*. Universidad Autónoma de Nuevo León. Pp 14

Reyes R.A., Escudero A.B.I., Aguilar U.G., Hayward J.P.M., Barboza C.J.E.,2004. Antifungal activity of *Bacillus thuringiensis* Chitinase and its potential for the biocontrol of phytopathogenic fungi in soyben sedes. Journal of Food Science 69: 131-134.

Rosas García, N. M. 2002. Elaboración de Formulados de *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* y determinación de la actividad toxica contra larvas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera:Pyralidae) en Laboratorio y campo. Monterrey, Nuevo León, México.

SAGAR. 1996. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos 1996. Tomo II. Secretaria de agricultura ganadería y desarrollo rural, Centro de Estadística Agropecuaria. pp 382-388.

Sánchez-Yáñez J.M. y Peña-Cabriales J.J. 1995. Sobrevivencia de Esporas de *Bacillus thuringiensis* en el Filoplano de Maíz, de Frijol y en el Suelo. International Microbiol Ecology Meeting. México.

Sayers R. 1982. Pruebas de germinación y vigor. Memorias del curso de actualización sobre tecnologías de semillas. UAAAN-AMSAC. pp. 129-136. Buenavista, saltillo, Coahuila México.

Silo Shu L.A. Lathbridge B.J. Raffel S.J, He H., Clardy J. Handelsman J. 1994. Biological Activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. Applied an Enviromental Microbiology 60: 2023-2030.

Suvorova A.I., Tjukova I.S. and Trufanova E.I. 1999 Thermodynamic and difusión properties of biodegradable systems baled on starch and cellulose derivates. Journal of Enviromental Polymer Degradation. Vol.7 N°1 pp 35-40.

Támez, P.; Iracheta M.; Pereira B.; Galán J.L.; Gómez R.; Támez R.; Rodríguez C.: “Caracterización de cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas para larvas de lepidópteros y coleópteros”. Ciencia UANL 8(4):477-782, México, 2007.

Theis T., Stahl U. 2004. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prespective applications. Cellular and Molecilar Life Science 61: 437-455.

Utkhede R.S. 1984. Antagonism of isolates of *Bacillus Subtilis* to *Phytophthora cactorum*. Canadian Botany 62: 1032-1035

Walker R, Powell AA, Seddon B. 1998. *Bacillus* isolates the spermosphere of peas and dwarf French beans whit antifungal activity against *Botrytis cinerea* and *Pythium* species. Journal of Applied Microbiology 84:791-801.

PERSPECTIVAS

El uso de microorganismos en el control de fitopatógenos tiene un gran potencial, ya que esto significa una gran disminución del uso de pesticidas en el campo, lo cual conlleva a la disminución de contaminantes en el ambiente. Esta ventaja promueve la creación de trabajos de investigación en esta área, sin embargo es necesario llevar este tipo de investigaciones a las condiciones de campo.

Es recomendable realizar estudios sobre el impacto de los agentes de control biológico en el ambiente, tal como el tipo de interacción con las plantas, suelo y posibles interacciones con otros microorganismos presentes en el ambiente.

RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Hilda María Muñiz Villarreal

Candidato para el Título Profesional de
Maestría en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis: Control de hongos fitopatógenos de importancia agrícola utilizando como agente a
Bacillus thuringiensis (Berliner)

Campo de estudio: Microbiología Agrícola

Datos personales: Nacida en Monclova, Coahuila, el 09 de Julio de 1981. Hija de Santiago Muñiz Arocha y María del Socorro Villarreal Villarreal.

Educación: Facultad de Ciencias Biologicas de la Universidad Autónoma de Nuevo Leon.
Grado obtenido: Químico Bacteriologo Parasitólogo.

Experiencia Profesional:

Realización de Tesis de Licenciatura en el Departamento de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biologicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.