

00361
4

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS**

**“Efecto antagónico de tres cepas de *Bacillus*
sobre *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)**

**P R E S E N T A :
MARÍA CRISTINA CASTRO IBARRA**

DIRECTOR DE TESIS: DR. LEOPOLD FUCIKOVSKY ZAK

México, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Agosto, 2 0 0 3.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**PAGINACIÓN
DISCONTINUA**

DEDICATORIAS

**A la memoria de mi padre
Sr. Fernando Castro Zúñiga,
hombre ejemplar**

**A la memoria del Q.B.P.
Marcelo Basaldúa Huerta,
buen amigo y excelente profesor**

**A mi esposo e hijo a quienes amo;
gracias por su apoyo y comprensión**

**A mi madre,
Sra. Lilia Ibarra Ruiz**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a digitalizar en formato electrónico e imprimir el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: María Cristina
Castro Ibarra

FECHA: 16 de octubre, 2023

FIRMA: María Cristina

A mis hermanos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a las siguientes personas e instituciones su valiosa colaboración para alcanzar una de mis más anheladas metas:

Al Dr. Leopold Fucikovsky Zak, Director de Tesis del Instituto de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados, quién siempre me brindó su apoyo y orientación durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Oscar Comas Rodríguez, Coordinador del Programa Supera. ANUIES, e Ing. Rafael Carrasco, Jefe del Área de Sistemas del mismo Programa, por la beca otorgada para realizar y concluir satisfactoriamente este proyecto.

Al Instituto Politécnico Nacional, por brindarme las facilidades de laboratorio y materiales para la realización de la tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que me dio la oportunidad de formarme como profesionista.

A mis sinodales: Dr. Leopold Fucikovsky Zak, Dr. Teófilo Herrera Suárez, Dr. Fernando de la Jara Alcocer, Dra. Genoveva García Aguirre y Dr. Isaac Juan Luna Romero.

Al Q.B.P. José Luis Cortés Aguayo y Dr. Isaac Luna Romero del Laboratorio de Fitopatología E.N.C.B. I.P.N., por su compañerismo y siempre desinteresado apoyo.

Al Dr. Arturo Flores Martínez del Laboratorio de Ecología Vegetal E.N.C.B. I.P.N., por su asesoría en el análisis estadístico presentado en este proyecto.

Al Biól. Marco Antonio Ramírez Olvera de la Central de Instrumentación de Microscopía E.N.C.B. I.P.N., por la toma de fotografías con escala.

Al Q.B.P. Alejandro Gómez-Tagle y al Q.B.P. Ramón Arteaga Garibay, por la toma de fotografías digitales.

A mi esposo, Biólogo Alfredo González Velázquez por la edición de las fotografías.

A los Laboratorios de Química Inorgánica y Bacteriología Médica E.N.C.B. I.P.N., por el análisis fisicoquímico del suelo y la identificación de las cepas de *Bacillus* por API49, respectivamente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONTENIDO

	Páginas
Dedicatorias.....	i
Agradecimientos.....	ii
Contenido.....	iii
Lista de tablas.....	vi
Lista de figuras.....	vii
Lista de apéndices.....	viii
Resumen.....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Ciclo de vida de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>.....	2
2. Sintomatología.....	4
3. Taxonomía.....	4
3.1. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	5
4. El cultivo de <i>Helianthus annuus</i>.....	7
4.1. Origen.....	7
4.2. El cultivo del girasol en México.....	7
4.3. Importancia económica y distribución geográfica.....	7
5. Medidas de Control.....	10
5.1. Control químico.....	10
5.2. Prácticas agrícolas.....	11
5.3. Control biológico.....	12
5.3.1. Control biológico de hongos con otros hongos.....	12
5.3.2. Control biológico de hongos con bacterias.....	12
5.4. Utilización de variedades resistentes.....	13
II. OBJETIVOS.....	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
1. Procedencia de los aislamientos.....	16
2. Evaluación de la patogenicidad de los aislamientos de <i>S. sclerotiorum</i>.....	16
3. Medios de cultivo utilizados.....	17
3.1. Medios sólidos.....	17
3.2. Medios líquidos.....	17
4. Preparación y análisis del suelo.....	17
5. Prueba de germinación.....	18
6. Antagonismo en placa.....	18
6.1. Antagonismo entre <i>S. sclerotiorum</i> y las cepas bacterianas. Mediciones de los halos de inhibición.....	18
6.2. Efecto fungicida o fungistático de las bacterias contra <i>S. sclerotiorum</i>	18

6.3. Antagonismo entre los esclerocios de <i>S. sclerotiorum</i> y las tres cepas bacterianas. Utilización de un anillo metálico para la inoculación de las bacterias.....	19
6.4. Antagonismo entre el micelio de <i>S. sclerotiorum</i> y las tres cepas bacterianas. Utilización del anillo metálico para la inoculación de las bacterias.....	20
7. Antagonismo utilizando extractos bacterianos.....	20
8. Viabilidad de los esclerocios en el laboratorio.....	21
9. Antagonismo de las cepas bacterianas sobre <i>S. sclerotiorum</i> en condiciones de invernadero.....	22
9.1. Efecto antagonico de las cepas bacterianas sobre <i>S. sclerotiorum</i> en la germinación de las semillas de girasol.....	22
9.2. Efecto antagonico de las cepas bacterianas sobre <i>S. sclerotiorum</i> en plantas de girasol maduras.....	23
10. Curvas de crecimiento de las cepas bacterianas.....	25
11. Identificación de las cepas bacterianas.....	25
11.1. Crecimiento anaeróbico en caldo glucosado.....	25
11.2. Crecimiento a 45°C.....	26
11.3. Crecimiento a pH de 5.7.....	26
11.4. Crecimiento en NaCl 3% y NaCl 7%.....	26
11.5. Hidrólisis de almidón.....	26
11.6. Posición de la endospora.....	26
11.7. Reducción de nitratos.....	26
11.8. Tinción de Gram.....	27
11.9. Utilización del citrato.....	27
11.10. Producción de ácidos a partir de carbohidratos.....	27
11.11. Prueba de oxidación-reducción (OF) (medio de Hugh y Leifson).....	27
11.12. Prueba de Voges-Proskauer (V-P).....	28
11.13. Leche tornasolada (prueba de Litmus).....	28
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
1. Evaluación de la patogenicidad de los aislamientos de <i>S. sclerotiorum</i>.....	30
2. Crecimiento en diferentes medios de cultivo.....	30
2.1. Crecimiento de las cepas bacterianas en diferentes medios de cultivo.....	30
2.2. Crecimiento de <i>S. sclerotiorum</i> en diferentes medios de cultivo.....	31
3. Antagonismo en placa.....	32
3.1. Antagonismo entre <i>S. sclerotiorum</i> y las cepas bacterianas, desarrollándose halos de inhibición.....	32
3.2. Efecto fungicida o fungistático de las bacterias sobre <i>S. sclerotiorum</i>	35
3.3. Antagonismo entre los esclerocios de <i>S. sclerotiorum</i> y las tres cepas bacterianas.....	36
3.4. Antagonismo entre el micelio de <i>S. sclerotiorum</i> y las tres cepas bacterianas.....	38
4. Antagonismo utilizando extractos bacterianos.....	38
5. Viabilidad de los esclerocios en el laboratorio.....	42

6. Preparación del suelo para estudios de invernadero.....	44
7. Antagonismo de las cepas bacterianas sobre <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> en condiciones de invernadero.....	44
7.1. Efecto antagónico de las cepas bacterianas sobre <i>S. sclerotiorum</i> en la germinación de las semillas de girasol.....	44
7.2. Efecto antagónico de las cepas bacterianas sobre <i>S. sclerotiorum</i> en la madurez de las plantas de girasol.....	45
8. Curvas de crecimiento de las cepas bacterianas utilizadas en el estudio.....	49
9. Identificación de las bacterias con propiedades antagónicas.....	50
V. CONCLUSIONES.....	52
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	53
VI. APÉNDICES.....	60

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Regiones de producción del girasol a escala mundial	8
2. Estudio fisicoquímico del suelo utilizado para la siembra del girasol	17
3. Diseño experimental. Ocho tratamientos con cinco repeticiones cada uno	23
4. Diseño experimental. Colocación de las macetas dentro del invernadero	24
5. Mediciones de halos de inhibición (cm) producidos entre <i>S. sclerotiorum</i> y las cepas bacterianas B1, B2 y B3 en tres diferentes tiempos	34
6. Diámetros de colonias de <i>S. sclerotiorum</i> , proveniente de esclerocios, inoculando a <i>Bacillus</i> a diferentes tiempos	37
7. Diámetros de colonias de <i>S. sclerotiorum</i> , proveniente de micelio, inoculando a <i>Bacillus</i> a diferentes tiempos	39
8. Diámetros de colonias fúngicas de <i>S. sclerotiorum</i> a diferentes concentraciones y tiempos de los extractos bacterianos probados	40
9. Efecto de las cepas bacterianas B1, B2 y B3 en cultivo sumergido, sobre la viabilidad de los esclerocios de <i>S. sclerotiorum</i>	43
10. Número de plántulas de girasol en las 40 macetas	45
11. Registro mensual promedio del número de apotecios por tratamiento	46
12. Pruebas bioquímicas para la identificación de las cepas de <i>Bacillus</i>	51

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Apotecios de <i>S. sclerotiorum</i> en el suelo.....	5
2. Corte de apotecio de <i>S. sclerotiorum</i> mostrando el excipulo ectal (ee), excipulo medular (em), subhimenio (sh) e himenio (h)	6
3. Asca con ascosporas de <i>S. sclerotiorum</i> (Pared del canal del poro J+)	6
4. Transferencia de micelio más cercano al halo de inhibición (I) y de micelio más alejado del halo (E) a otra placa con medio PDA	19
5. Cepa bacteriana <i>Bacillus</i> 2 (B2) en diferentes medios de cultivo. 5(a) en NBY.- 5(b) en CPG.- 5(c) en BK y 5(d) en PDA	31
6. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> a los 5 días (izquierda) y 7 días (derecha) de crecimiento en PDA. En ésta segunda placa se observan primordios de esclerocios	32
7. Halos de inhibición formados con las cepas bacterianas B1, B2 y B3 a tres diferentes tiempos. 7(a) Halos de inhibición formados con la cepa B1.- 7(b) Halos de inhibición formados con la cepa B2.- 7(c) Halos de inhibición formados con la cepa B3	33
8. Efecto fungistático de las cepas B1(a), B2(b) y B3(c) de <i>Bacillus</i> sobre <i>S. sclerotiorum</i>	35
9. Diámetros de las colonias fúngicas creciendo en dos concentraciones de extracto crudo bacteriano y tres diferentes tiempos	42
10. Número de plantas marchitas de girasol de septiembre a enero en los ocho tratamientos	47
11. Número de plantas marchitas en los dos últimos meses en los ocho tratamientos	47
12. Número de esclerocios hallados en las plantas en los ocho tratamientos	48
13. Curvas de crecimiento de las cepas bacterianas B1, B2 y B3	50

LISTA DE APÉNDICES

Apéndice	Página
1	Medios de cultivo60
2	Reactivos, soluciones y medios para la identificación de las cepas bacterianas62
3	Escala de Mac Farland para la preparación de suspensiones bacterianas67
4	Análisis de varianza (ANDEVA) para los halos de inhibición68
5	
5a	Análisis de varianza (ANDEVA) para los esclerocios como inóculo69
5b	Análisis de varianza (ANDEVA) para el micelio como inóculo69
6	Análisis de varianza (ANDEVA) para los esclerocios y micelio como inóculos70
7	Análisis de varianza (ANDEVA) para los extractos bacterianos71
8	Análisis de varianza (ANDEVA) para la germinación de las semillas de girasol72

RESUMEN

La actividad antagónica de tres cepas de *Bacillus* sobre el hongo fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* fue probada en ensayos *in vitro* y en el invernadero.

En el laboratorio, se tomaron medidas de los halos de inhibición producidos al confrontar a las cepas bacterianas contra el micelio de *S. sclerotiorum* en placas con PDA, hallando diferencias significativas entre las cepas así como entre los tiempos probados. La cepa B1, en comparación a las cepas B2 y B3, presentó una mayor actividad antagónica al inocularla dos días antes de sembrar *S. sclerotiorum*.

Los extractos crudos bacterianos esterilizados de las cepas de *Bacillus* fueron probados en dos concentraciones y tres tiempos, hallando diferencias significativas en su actividad antagónica sobre *S. sclerotiorum*. Las tres cepas bacterianas tuvieron su mayor efecto con los extractos crudos de concentraciones altas provenientes de crecimiento bacteriano de 48 horas.

En el suelo, las cepas bacterianas no tuvieron ningún efecto sobre la severidad de la enfermedad causada por *S. sclerotiorum* en las plantas de girasol.

Las cepas bacterianas denominadas B1 y B2 correspondieron a *Bacillus subtilis*, mientras que la cepa B3 se identificó como *B. amyloliquefaciens*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades causadas por la especie *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (= *Whetzelinia sclerotiorum*), se encuentran distribuidas a escala mundial. Principalmente ocurren en las áreas frescas y húmedas del mundo aunque también pueden hallarse en áreas cálidas y secas

A *S. sclerotiorum* se le cataloga dentro de los hongos fitopatógenos más omnívoros y exitosos que se conocen, reportándose en más de 380 especies de plantas susceptibles (Purdy, 1979). Tales especies se ubican dentro de 64 Familias, algunas de importancia agrícola como las Compuestas, Leguminosas, Crucíferas y Solanáceas.

Entre sus hospederas se hallan plantas de ornato (begonia, crisantemo, petunia, y otras), arbustos y malezas (eneldo, hinojo y otras) y principalmente hortalizas como lechuga, col, zanahoria, frijol, alcachofa, espárrago, brócoli, rábano, papa, calabaza, sandía y otras (Romero, 1993). También se han reportado plantas silvestres como hospederas de *S. sclerotiorum*. Fucikovsky (1987) encontró en el Estado de Sinaloa, México, varias plantas llamadas Iztafiate (*Parthenium* sp) afectadas por *Whetzelinia sclerotiorum* cerca de los canales de riego. Las plantas muestran marchitez y con esclerocios en sus tallos, que eran además distribuidos por el agua a cultivos de importancia como la papa y el jitomate. Otra planta silvestre hospedera de *S. sclerotiorum* es una hierba mala, *Argemone alba* (Lestib.f.) de la Familia de las Papaveráceas, que fue hallada cerca del pueblo de Techuchulco en Tenango del Valle, Edo. de México (Fucikovsky, 2002).

Farr *et al.* en 1989 reportan por géneros las hospederas de *S. sclerotiorum* (= *Whetzelinia sclerotiorum* (Lib.) Korf & Dumont), = *Sclerotinia libertiana* Fuckel.

Además de las ya anotadas, considera como de importancia a: *Allium*, *Amaranthus*, *Ambrosia*, *Arachis*, *Aralia*, *Camellia*, *Capsicum*, *Carthamus*, *Chenopodium*, *Citrus*, *Dahlia*, *Euphorbia*, *Ficus*, *Hedera*, *Helianthus*, *Iris*, *Malus*, *Medicago*, *Nicotiana*, *Persea*, *Prunus*, *Ranunculus*, *Senecio*, *Sorghum*, *Tagetes*, *Trifolium*, *Vicia* y *Vitis* entre otros.

En 1979, Purdy publicó que las pérdidas económicas ocasionadas por *S. sclerotiorum* en diversas hospederas, tan solo en los Estados Unidos, iban de un cero a un 100% y que dichas pérdidas se llegaban a valorar en millones de dólares al año.

Recientemente la enfermedad conocida como pudrición del tallo causada por *Sclerotinia sclerotiorum* en el cultivo de la soya, ha llegado a afectar de manera importante las zonas agrícolas del norte de los Estados Unidos y del sur de Canadá (Kim y Diers, 2000) y la marchitez causada por *S. sclerotiorum* en girasol resulta ser la enfermedad más importante del cultivo en Manitoba y Alberta (Huang y Kozub, 1990).

Sin embargo, para considerar los porcentajes de pérdidas económicas causadas por este hongo fitopatógeno habría que tener en cuenta el tipo de cultivo, las prácticas agrícolas y las condiciones ambientales en las que la enfermedad se presenta. Todo esto influirá en la incidencia de la enfermedad en un año determinado (Buzzell *et al.*, 1993).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Existe una gran variedad de nombres para referirse a la enfermedad causada por *S. sclerotiorum* en sus plantas hospederas, como por ejemplo: la pudrición blanda acuosa del cacahuete y la zanahoria, la marchitez de la col, el ahogamiento del apio, el tizón de las inflorescencias del narciso, la canchrosis del tallo y pudrición de la raíz del trébol (Agrios, 1997), la pudrición del tallo de la papa (Huang y Hoes, 1980) y otros muchos nombres más. Sin embargo, la "caída" de la lechuga (Romero, 1993), la "pudrición del cuello, del tallo y capítulo" del girasol y el mismo "moho blanco" del tallo y de la vaina del frijol (Mendoza, 1993) son los nombres más comunes y que generalmente se asocian rápidamente con la especie.

En todas las hospederas de *S. sclerotiorum* se observan comúnmente sobre el micelio blanco, los esclerocios oscuros en las partes aéreas de las plantas o en la base de sus tallos frecuentemente después de que aparecen los brotes.

En México, varios son los cultivos que han sido gravemente afectados por *S. sclerotiorum*. En el frijol, por ejemplo, el denominado "moho blanco" causó y sigue causando importantes daños en los estados de Puebla (De la Torre, 1991), Sinaloa (Montoya-Angulo *et al.*, 1993) y Veracruz (Becerra y López Salinas, 1994), mientras que la marchitez causada por *S. sclerotiorum* en papa se ha reportado en Coahuila y Nuevo León (Guign, 1992).

1. Ciclo de vida de *Sclerotinia sclerotiorum*

Por lo que respecta al ciclo de vida de *Sclerotinia*, la infección de hospederas susceptibles puede ocurrir por el micelio que se origina de la germinación de esclerocios pequeños en el suelo. Este tipo de germinación que proviene del micelio, se le conoce como miceliogénica. La infección inicial ocurre sólo cuando la materia orgánica existente en el suelo previamente es invadida por el micelio. Esta condición es necesaria para que se de la infección.

El segundo tipo de germinación es la carpogénica, en la que los esclerocios desarrollan apotecios en el suelo. Estos apotecios, de color anaranjado claro y originados de esclerocios localizados en la superficie del suelo o enterrados en el mismo, producen ascosporas que son llevadas por el viento hasta los tejidos senescentes de sus hospederas. Cuando las condiciones de humedad y temperatura son adecuadas, las ascosporas germinan y desarrollan micelio que invade rápidamente plantas sanas.

En condiciones naturales, cuando los factores ambientales le son favorables, la especie *S. minor* (con esclerocios pequeños de 2 milímetros de diámetro en promedio) muestra principalmente el tipo de germinación miceliogénica (rara vez la carpogénica) mientras que las especies *S. trifoliorum* y *S. sclerotiorum* (con esclerocios mayores a 2 mm) presentan el tipo de germinación carpogénica, la germinación miceliogénica en este caso, contribuye mínimamente en el desarrollo de la enfermedad (Abawi y Grogan, 1979).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Las ascosporas de *S. sclerotiorum* pueden mantenerse viables hasta seis días; pasado este tiempo, pocas son las que sobreviven en el campo. Durante ese lapso pueden germinar si las condiciones ambientales les son favorables y estas son menores a 25°C y a 35% de humedad relativa (Caesar y Pearson, 1983).

Al germinar las ascosporas, se desarrolla abundante micelio blanco y, en consecuencia, se producen esclerocios externamente sobre las partes de las plantas afectadas e internamente en cavidades del tallo (médula) o cavidades de los frutos. También pueden desarrollarse en otras partes de las plantas tanto en las cortezas y sistemas vasculares como en el xilema.

Los esclerocios ocasionalmente alcanzan la superficie del suelo donde permanecen por un tiempo o son enterrados durante las labores del campo que desnivelan tal superficie. Después de que los esclerocios han sido acondicionados se pueden desarrollar apotecios o puede formarse micelio directamente, completando de esta manera el ciclo biológico.

En el llamado ciclo de la enfermedad, la penetración a la hospedera puede ocurrir con la formación de apresorios simples o complejos (dependiendo de la dureza de la superficie de la hospedera), según los estudios realizados por Tariq y Jeffries en 1984 utilizando microscopía electrónica de barrido. La formación de apresorios por *S. sclerotiorum* ocurre sobre tejidos sanos, donde tales estructuras somáticas especializadas ejercen presión sobre la cutícula hasta que la rompen, con la subsecuente formación de hifas cuticulares y subcuticulares que coadyuvarán al establecimiento del hongo en cuestión (Lumsden y Dow, 1972). Según Lumsden y otros autores (Lumsden, 1979), es más frecuente la vía de penetración directa que la vía de penetración a través de estomas.

El mismo autor reporta que los sistemas enzimáticos de las especies de *Sclerotinia* no difieren mucho de los de otros fitopatógenos. Por ejemplo, el ácido oxálico que produce, es un metabolito común de muchos otros hongos. Sin embargo, también se han reportado nuevas formas moleculares de pectinasas, β -xilosidasas y celobiosidasas producidas por *S. sclerotiorum*. De hecho, la gran diversidad de enzimas producidas por este hongo fitopatógeno lo coloca dentro de aquéllos organismos con un alto potencial comercial dentro de la microbiología industrial (Riou *et al.*, 1991).

Para que la infección se establezca exitosamente se requiere una compleja combinación de factores que permitan invadir rápidamente los tejidos del hospedero antes de que éste pueda responder.

Dentro de estos factores se podrían citar: la producción de apresorios que le permite al hongo la penetración mecánica, la formación de hifas de rápido desarrollo intercelular entre la corteza y la cutícula del hospedero, la formación de enzimas pectinolíticas y de ácido oxálico que degradan la lámina media, cambios en el pH para favorecer la acción enzimática, la susceptibilidad de las células del hospedero haciéndolas menos resistentes a la invasión y la producción de enzimas capaces de hidrolizar la pared celular y elementos protoplasmáticos que proveen abundante y constante cantidad de nutrientes para el crecimiento de las hifas infectivas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Sclerotinia se disemina por el viento frecuentemente, por medio de sus ascosporas. Otra manera de diseminarse de un campo de cultivo a otro, es por medio del suelo adherido a las plántulas, por equipo de trabajo, por animales o inclusive por el hombre, en forma de esclerocios o micelio en los tejidos enfermos de su hospedero (Adams y Ayers, 1979).

2. Sintomatología

Los síntomas causados por *S. sclerotiorum* dependen mayormente de las hospederas y de las condiciones ambientales en las que se presenta la enfermedad. Sin embargo, existen algunas similitudes entre ellos. Los síntomas más comunes son las manchas irregulares de aspecto acuoso sobre frutas, tallos, hojas o peciolo. Estas manchas a manera de puntos se alargan mostrando micelio algodonoso sobre la lesión. Posteriormente se extiende formando una masa suave y con apariencia acuosa. El micelio generalmente produce en este momento gran cantidad de esclerocios negros, los que son signos diagnósticos de *Sclerotinia*. Sin embargo, también pueden presentarse lesiones secas en tallos o ramas con una obvia separación entre la porción de tejido sano y enfermo. Estas lesiones se alargan y circundan la parte de planta afectada. Las zonas apicales de la planta se tornan de amarillas a café y posteriormente mueren. Las lesiones en el cuello de la planta generalmente causan su muerte. Los esclerocios se desarrollan dentro de la médula del tallo cercano a la superficie del suelo, en las cavidades de los frutos o entre los tejidos (corteza y xilema). (Purdy, 1979), (Ferreira y Boley, 2001).

La continua actividad fúngica resulta en una destrucción casi total del tejido del parénquima y en una apariencia deshilada de los elementos vasculares y estructurales de los tallos, ramas y ramitas de las plantas afectadas.

La infección de las plantas antes de la cosecha resulta en enfermedades de postcosecha, en donde el hongo se extiende de plantas enfermas a sanas tanto en almacenes como en contenedores de transporte.

El signo en casi todas las plantas hospederas es el micelio blanco algodonoso y copioso cuando las condiciones son estables y la subsecuente producción de esclerocios negros de variadas formas y tamaños sobre la superficie de los tejidos afectados.

3. Taxonomía

El género *Sclerotinia* (Discomycetes Inoperculados) incluye solamente tres especies: *S. sclerotiorum*, *S. trifoliorum* y *S. minor*, en las que destacan, como características comunes, la formación de esclerocios que no incorporan tejido del hospedero en su médula, el desarrollo de un excipulo ectal del apotecio compuesto de células globosas y la ausencia de un estado conidial. (Kohn, 1979a)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los **esclerocios** de esta especie crecen superficialmente sobre micelio blanco y denso, globosos a cilíndricos pero muy variables en forma, de 5-15 x 2-8 mm, con una corteza negra externa y un contexto blanco interno; en cultivo se desarrollan en los márgenes de la colonia, frecuentemente formando anillos concéntricos, líneas radiales y otros patrones. La **médula del esclerocio**, de textura oblita y hialina, compacta y entretejida, con células de 5 - 10 μm de ancho con paredes fuertemente gelatinizadas de 2 - 3 μm de grosor. La **corteza del esclerocio** de una capa de 2 - 6 células de apariencia prismática, de color café oscuro, globosas y de 5 - 15 μm de diámetro. **Apotecios** desarrollándose de uno a varios en un esclerocio (Figura 1), de ocráceos a canela en la copa, frecuentemente más oscuros en la base del estípote; receptáculo de 2 - 8 mm de ancho, aplanado a ligeramente cóncavo cuando inmaduro, y de aplanado a convexo cuando maduro, frecuentemente con una depresión central y margen ondulado, disminuyéndose a formar un estípote de 3 - 20 mm de largo y de 1 - 2 mm de ancho. Con un **excípulo ectal**, **excípulo medular** y **subhimenio** característicos (Figura 2). **Ascas** en grupos, con 8 ascosporas cada una, cilíndricas, de 110 - 160 x 6 - 10 μm , con un ápice grueso y una pared del canal del poro J + (Figura 3). **Ascosporas** uniseriadas, hialinas, elipsoidales, bigutuladas, binucleadas, de 10 - 14 x 4 - 5 micrómetros, la relación del radio largo-ancho generalmente mayor de 2. **Paráfisis** hialinas, filiformes, de 2 μm de ancho, septadas, simples o escasamente ramificadas. **Estado microconidial** (*Myrioconium*) con microconidios globosos, hialinos, de 2 - 4 μm de diámetro, producidos de filides en esporoquios o en filides formadas lateralmente en la hifa, sobre la superficie del himenio o del cultivo (Kohn, 1979b).

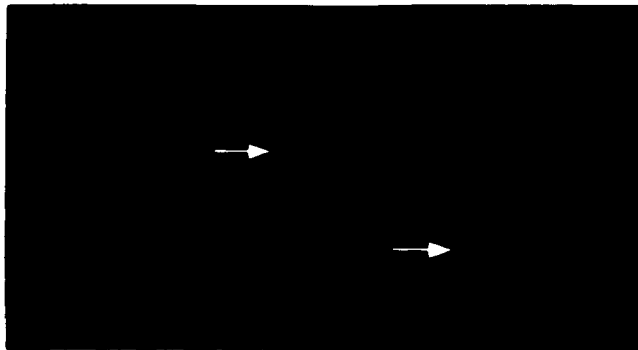


Figura 1. Apotecios de *S. sclerotiorum* en el suelo.

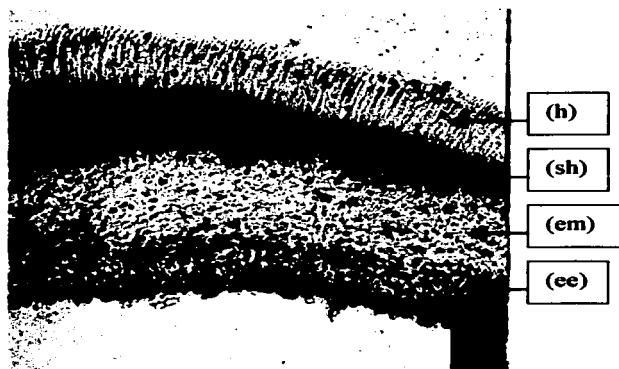


Figura 2. Corte de apotecio de *S. sclerotiorum* mostrando el excipulo ectal (ee), excipulo medular (em), subhimenio (sh) e himenio (h).

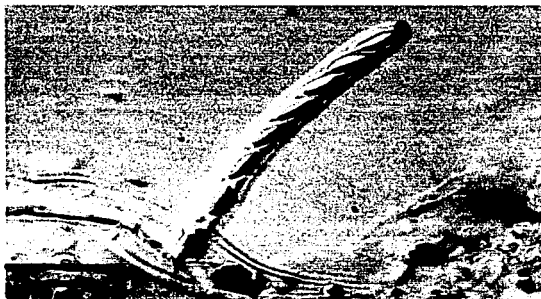


Figura 3. Asca con ascosporas de *S. sclerotiorum* (Pared del canal del poro J+).

4. El cultivo de *Helianthus annuus*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4. El cultivo de *Helianthus annuus*

4.1. Origen

El origen del girasol se remonta a 3000 años a.C., en el norte de México y Oeste de los Estados Unidos, ya que fue cultivado por las tribus indígenas de Nuevo México y Arizona.

El girasol era uno de los principales productos agrícolas empleados en la alimentación por muchas comunidades americanas antes del descubrimiento de América.

La semilla de girasol fue introducida en España por los colonizadores de América y después se extendió al resto de Europa.

El girasol fue cultivado durante más de dos siglos en España y en el resto de Europa por su valor ornamental y no fue sino hasta el siglo XIX cuando comenzó la explotación industrial de su aceite destinado a la alimentación.

4.2. El cultivo del girasol en México

En un programa a nivel nacional, el cultivo de esta oleaginosa se inició en el año de 1971 con una superficie sembrada aproximada de 53, 000 Ha. Las principales regiones donde se cultivó girasol se encontraban en los estados de Querétaro, Guanajuato, Durango y Zacatecas. Desgraciadamente el programa pronto se vino abajo por la falta de organización y desconocimiento del cultivo, además de problemas con plagas, lo que trajo como consecuencia su drástica caída en el año de 1972 (Velázquez-Cágal, 2002).

Un nuevo auge se presenta en los ciclos estivales de 1985 a 1987 con una superficie de 20,000 Ha en el Centro-Sur de Tamaulipas.

Actualmente, el promedio nacional anual de siembra es de aproximadamente 2,000 Ha en estados como Chihuahua y Durango (Velázquez-Cágal, 2002).

En fecha reciente, el Programa Nacional de Oleaginosas publicó que tiene dentro de sus principales metas consolidar la producción nacional de cártamo, canola, ajonjolí y girasol, para tratar de reducir el déficit de aceites que se tiene en el país (Ortegón - Morales, 2002).

4.3. Importancia económica y distribución geográfica

El girasol es una planta típicamente oleaginosa que tiene un papel fundamental en la alimentación humana y además como planta forrajera.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Es también una de las plantas herbáceas de extracción de aceite para consumo humano más cultivadas en el mundo.

Las mayores áreas productoras de esta oleaginosa se encuentran en la antigua URSS, EUA, Argentina, China, Australia, Francia, España, Rumania, Hungría, Yugoslavia, Sudáfrica y Canadá. Dentro de otras regiones se encuentran América Central, América del Sur, África y Asia (Seiler, 1992).

La superficie cultivada de girasol a escala mundial ha ido en constante aumento en los últimos años. En Argentina por ejemplo, dada la superficie cultivada, es uno de los cultivos más importantes de ese país. Su producción se procesa totalmente para la industrialización y comercialización interna o externa tanto como aceite o subproductos, siendo dicho país el primer exportador mundial de ambos. Como cualquier cultivo extensivo, la producción está frecuentemente afectada por problemas fitosanitarios que causan pérdidas en cantidad y calidad del producto obtenido.

En la Tabla 1 se muestran algunos datos de superficies, producciones y comercio internacional en diferentes países y regiones del mundo.

Tabla 1. Regiones de producción del girasol a escala mundial.

Mundo y principales Países	Superficie		Producción		Comercio Internacional	
	Media 1989-91 miles de Ha	1996 miles de Ha	Media 1989-91 miles de t*	1996 miles de t*	Importaciones 1996 miles de t*	Exportaciones 1996 miles de t*
MUNDO	16.384	20.785	22.263	24.786	3.967	4.563
EÚROPA	3.775	4.654	6.374	6.958	2.978	2.000
Unión Europea	2.421	2.449	4.069	3.878	2.812	4.784
España	1.083	1.118	1.088	1.138	553	90
Francia	1.042	891	2.389	1.996	441	473
Países con solicitud de adhesión						
Bulgaria	263	500	427	530	-	95
Hungría	366	473	732	868	30	220
Rumania	435	917	608	1.096	2	19
OTROS PAÍSES						
Australia	139	82	132	68	1	4
Argentina	2.370	3.235	3.664	5.556	4	583
Brasil	60	60	41	30	7	-
Canadá	67	42	104	56	14	28
Estados Unidos	851	1.011	1.156	1.627	21	108
México	1	-	1	-	165	-
Noruega	-	-	-	-	6	-
Turquía	682	585	970	780	640	1

*t = toneladas

Fuente: <http://www.infoagro.com/herbaceos/oleaginosas/girasol2.asp> 13/03/02

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Las principales causas de pérdidas que sufre el cultivo están relacionadas con infecciones producidas por hongos patógenos. Entre ellos, las infecciones producidas por *S. sclerotiorum*, conocida comúnmente como "pudrición o podredumbre del capítulo", representa actualmente la enfermedad más importante que sufre el cultivo en el Sur y Sureste de la Provincia de Buenos Aires.

Esta enfermedad es especialmente temida por los productores de girasol, si se tiene en cuenta las pérdidas tan severas que causa en cantidad y calidad, ya que origina importantes descuentos por cuerpos extraños y/o aumento de la acidez del producto entregado. Aún se recuerda la campaña de 1987/88, donde en ese país se perdieron totalmente 50,000 hectáreas del cultivo y se registraron pérdidas de rendimiento del 50 por ciento en otras 100,000 hectáreas.

En Canadá, la "marchitez" causada por *S. sclerotiorum* en girasol, viene a ser la enfermedad más importante en ese cultivo (Huang y Kozub, 1990). Y lo mismo puede decirse de la "pudrición del tallo" en la grosella en el mismo país (Teo *et al.*, 1989).

Las condiciones de clima fresco y húmedo, favorecen el desarrollo del hongo en muchos cultivos en el mundo.

La superficie cultivada de girasol en México, como se ha visto, dista mucho de países productores como Argentina o los de la Unión Europea. En 1997 la SAGAR reporta la siembra de 3276 Ha de las que se cosecharon 2424 Ha (74 por ciento); producción insuficiente para las necesidades del mercado, por lo que se recurre a la importación.

Por estas razones, se requiere incrementar las áreas dedicadas al cultivo y al rendimiento del mismo, mediante la búsqueda, generación y difusión de estrategias, por lo que en nuestro país la investigación sobre este cultivo se justifica (Vega-Muñoz *et al.*, 2001).

En México, uno de los problemas fitosanitarios a los que se enfrenta normalmente el productor de girasol es precisamente el hongo *S. sclerotiorum*, causante de la "pudrición del cuello, del tallo y del capítulo del girasol" (Mendoza, 1993) considerado muy importante en la disminución de la calidad y producción de aceite vegetal.

Sin embargo, en el año 2001 se presentó en el país una grave infección por *Plasmopara* en esta oleaginosa, superando los daños producidos por *S. sclerotiorum* (Velázquez-Cágal, 2002).

Las variedades utilizadas para producir aceite en México son principalmente del tipo de semillas negras y más pequeñas que las coníferas, que son rayadas. Las principales son: variedad Peredovick, var. Talinay, var. VNIIMK (de la que descienden otras tres líneas), y la var. Cernianka de la que procede la var. Victoria (Velázquez-Cágal, 2002).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5. Medidas de Control

El éxito de las especies de *Sclerotinia* como patógenas de muchos cultivos radica precisamente en su respuesta casi inmediata a condiciones favorables para su desarrollo, además de la habilidad de sus esclerocios para resistir a condiciones adversas.

En el caso específico de *S. sclerotiorum* en girasol, como ejemplo, las condiciones que favorecen su establecimiento y desarrollo en el cultivo son muy similares a las que favorecen altos rendimientos del cultivo (Pereyra *et al.*, 2002).

Las condiciones ambientales favorables y la formación de esclerocios que pueden permanecer viables en el suelo por tres años, hacen a este hongo omnívoro muy difícil de combatir. Sin embargo, varios métodos de control han resultado ser eficientes en el control de *S. sclerotiorum*.

Dentro de los métodos de control que han sido utilizados con diferentes grados de éxito se encuentran: 1) los productos químicos preventivos o los que inhiben la germinación o que destruyen esclerocios, 2) las prácticas agrícolas como medidas de control, 3) la utilización de microorganismos antagonicos y 4) actualmente, la utilización de variedades de algunos cultivos que son medianamente resistentes al patógeno.

5.1. Control químico

En los últimos cuarenta años, varios han sido los productos químicos utilizados para el combate de las enfermedades causadas por *S. sclerotiorum*. Este control se ha enfocado principalmente a la destrucción de sus esclerocios que pueden permanecer en el suelo durante muchos años antes de iniciar una nueva infección en un cultivo susceptible.

Los trabajos realizados en ese campo han tenido un éxito relativo cuando se ha tratado de resultados de laboratorio y de invernadero. Sin embargo los resultados que en el campo se han producido no han sido del todo satisfactorios debido a que interfieren gran número de variables, como la humedad del suelo, la temperatura, las condiciones de dosel en el campo, la luz; afectando todos ellos en la formación y germinación de esclerocios, apotecios y ascosporas.

Por ejemplo, la destrucción de los esclerocios de *S. sclerotiorum* en el suelo con productos como el Vapam, la Cloropicrina y el Mylone fue efectiva en condiciones de laboratorio, mientras que el producto Terraclor tuvo un efecto fungistático más que fungicida en el campo, por lo que este último resulta ser poco efectivo.

La humedad del suelo (92.6%) fue de importancia en el movimiento lateral del producto Vapam. Dicho movimiento disminuyó a humedades por debajo de 78% (Partyka y Mai, 1962).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En otra de las investigaciones sobre fungicidas, el producto Iprodione inhibió el crecimiento micelial en medio sólido y líquido a una concentración de 3 μ M (Reilly y Lamoureux, 1981).

Por su parte, Casale y Hart en 1986 reportaron la inhibición del crecimiento micelial de *S. sclerotiorum* en agar con el producto Metribuzin y el Diuron a una concentración de 50 μ g/ml, y a concentraciones más altas (100 μ g/ml) se redujo el número de esclerocios que desarrollaron estípites. Otros dos productos también fueron estudiados: la Atrazina y la Simazina los que resultaron ser menos inhibitorios del crecimiento micelial y no tuvieron efecto sobre el número de esclerocios que produjeron estípites. Sin embargo, los apotecios que se formaron no se desarrollaron normalmente.

Como la germinación carpogénica es decisiva para la formación de ascosporas, Radke y Grau en 1986 estudiaron el efecto de nueve herbicidas sobre dicha germinación. Sólo el Linuron y el DNBP inhibieron la germinación y el desarrollo del apotecio que también se vio afectada por factores como la profundidad a la que se entierra el esclerocio, la humedad y la temperatura del suelo, la luz, la transición de componentes metálicos y los azúcares.

Por otra parte, las combinaciones de productos como el Benomyl y el Thiram han resultado ser eficientes en la reducción de la germinación de los esclerocios y la producción, velocidad de formación y emergencia de los apotecios en el suelo (Yarden *et al.*, 1986).

Por último, dentro de los herbicidas que han resultado ser eficaces en la disminución de las lesiones causadas por *S. sclerotiorum* se tiene al producto conocido como Lactofen ("Cobra") que ha reducido de un 40% a un 60% la enfermedad (Dann *et al.*, 1999).

5.2. Prácticas agrícolas

En el establecimiento de prácticas culturales para disminuir los daños producidos por *S. sclerotiorum* en sus hospederas, se ha mencionado que el cambio en la época de siembra (Teo *et al.*, 1989), el colocar a las plantas con mayor espacio entre ellas (Huang y Hoes, 1980; Grau y Radke, 1984; Buzzell *et al.*, 1993), el arado profundo (Merriman *et al.*, 1979), el tipo de suelo (Merriman, 1976), la temperatura y humedad del suelo (Cook *et al.*, 1975; Abawi y Grogan, 1975; Caesar y Pearson, 1983; Teo *et al.*, 1989; Nelson *et al.*, 1991; Buzzell *et al.*, 1993), y sobre todo la irrigación y la estructura de dosel del cultivo (Weiss *et al.*, 1980; Grau y Radke, 1984), resultan ser medidas muy efectivas para combatir la enfermedad ya que todas ellas interfieren de alguna manera en el ciclo biológico del hongo en cuestión.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.3. Control biológico

El control biológico, definido como la destrucción parcial o total de poblaciones de patógenos por otros organismos (Agrios, 1997), y como generalmente se comprende en la actualidad, se inició en el siglo XIX, cuando se fusionan los conocimientos biológicos de la humanidad con el desarrollo tecnológico de la agricultura. Sin embargo, se tienen reportes que desde la antigüedad el hombre utilizó depredadores para reducir el número de organismos considerados plaga que dañaban los cultivos (DeBach, 1979).

El concepto de control biológico se ha empleado generalmente desde dos puntos de vista: uno es el económico, en el que se involucran actividades del hombre; y el otro, es el ecológico. En el primero, el control biológico considera la regulación de la abundancia de un organismo debajo del nivel en que causa daños económicos; en el segundo, el control biológico se expresa como la acción de parásitos, depredadores o patógenos para mantener la densidad de población de otro organismo a un promedio más bajo que el que existiría en su ausencia.

5.3.1. Control biológico de hongos con otros hongos

Por otra parte, el control biológico de hongos fitopatógenos utilizando microorganismos antagonistas, se ha desarrollado rápidamente a escala mundial. En la actualidad, se cuenta con hongos micoparásitos como *Trichoderma* sp., combatiendo a algunos de los hongos fitoparásitos habitantes del suelo más importantes como *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia* (Elad *et al.*, 1980), *Sclerotinia* (Dos Santos y Dhingra, 1982; Zizzerini y Tosi, 1985; Anas y Reeleder, 1987; Boland e Inglis, 1989; Trutmann y Keane, 1990; Budge y Whipps, 1991; Knudsen y Eschen, 1991) y *Sclerotium* (Cooper, 1961; Wells *et al.*, 1972; Elad *et al.*, 1980). Otros micoparásitos comunes son: *Sporidesmium sclerotivorum* (Ortiz, 1985; Bullock *et al.*, 1986), *Gliocladium virens* (Tu, 1980; Anas y Reeleder, 1987) y *Coniothyrium minitans* (Zizzerini y Tosi, 1985; Huang y Kokko, 1987; Budge y Whipps, 1991; Whipps *et al.*, 1992), todos ellos controlando eficazmente algunas de las enfermedades producidas por *Sclerotinia*.

5.3.2. Control biológico de hongos con bacterias

Al igual que los hongos, las bacterias de los géneros *Bacillus*, *Enterobacter* y *Pseudomonas* han demostrado ser parásitas o inhibir a hongos fitoparásitos como *Sclerotium cepivorum* (Utkhede y Rahe, 1980, 1983), *Phytophthora* sp., *Pythium* sp. o *Gaeumannomyces tritici*, este último causante de la enfermedad conocida como "pietin del trigo" o "foot rot of wheat" (Romero, 1993).

Otros hongos como *Rhizoctonia*, causante de "damping-off" en remolacha, fue inhibido por *Bacillus subtilis* (Dunleavy, 1955; Olsen y Baker, 1968) y especies de *Bacillus* aisladas de la

rizosfera de plantas de papa, fueron halladas ser antagonicas a *Rhizoctonia solani* (Jiménez, 1996).

También *B. subtilis* inhibió el desarrollo de *Fusarium roseum* en esquejes de clavel (Aldrich y Baker, 1970) y un aislamiento de la Familia Pseudomonadaceae resultó ser antagonica a *Fusarium roseum* (Michael y Nelson, 1972).

En 1986, Mc.Keen y colaboradores descubrieron que algunas de las sustancias antibióticas de una cepa de *B. subtilis* resultaron ser fungistáticas a *Monilinia fructicola*.

Por lo que respecta a *S. sclerotiorum*, aunque varios han sido los estudios con hongos para reducir el inóculo en el suelo, poco es conocido acerca del uso de antagonistas bacterianos. Sólo algunas especies bacterianas de *Bacillus*, dentro de ellas *B. subtilis*, se han reportado como eficientes "in vitro" (Zazzerini *et al.*, 1987) sobre dicho hongo u otros hongos como *Fusarium oxysporum*, *Alternaria* sp y *Botrytis* sp. (López y Virgen, 1994). También se ha reportado a *B. subtilis* con efecto fungistático (Fucikovsky *et al.*, 1989) y con reducción de la enfermedad en el campo (Oedjijono y Dragar, 1993).

A escala comercial, sin embargo, ya se tienen productos biológicos que se afirma que pueden ser utilizados para el control de *S. sclerotiorum* en el campo. Tal es el caso de cepas de *B. subtilis* y *Coniothyrium minitans*.

Las cepas de *B. subtilis* registradas con los nombres QST 713 (serenade, rhapsody y thegro) de las compañías AgraQuest y Taensa, se reportan como fungicidas de amplio espectro con control sobre *Botrytis*, cenicillas, mildiús, tizón temprano y con uso potencial en hortalizas principalmente.

La compañía alemana Prophyta también sacó al mercado el producto Contans WG que prevé las enfermedades causadas por *Sclerotinia* spp. El contenido de dicho agente protector es de 1×10^9 esporas viables por gramo. Una vez aplicado al suelo, *C. minitans* ataca y destruye a los esclerocios del hongo en el suelo, por lo que el inóculo es notablemente disminuido.

5.4. Utilización de variedades resistentes

Aunque pocas han sido las variedades que han mostrado un grado apreciable de resistencia al patógeno *S. sclerotiorum* (Agrios, 1997), gran cantidad de investigación se ha realizado en la búsqueda de genotipos resistentes en cultivos particulares.

Como ejemplo, la selección de variedades resistentes de soya, (Grau y Radke, 1984; Boland y Hall, 1986; Chun *et al.*, 1987; Teo *et al.*, 1989; Nelson *et al.*, 1991; Buzzell, *et al.*, 1993; Pennypacker y Risius, 1999; Kim y Diers, 2000) ha sido una de las principales preocupaciones en Estados Unidos y Canadá en los últimos años, debido a la severidad y daños producidos económicamente por el hongo *S. sclerotiorum*. Dentro de las causas de tal decremento en la producción, se encuentran: los cambios en las prácticas agrícolas, como la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

disminución de la distancia entre las plantas para incrementar la producción, la rotación con cultivos susceptibles y el uso de semillas no certificadas.

Genotipos de soya parcialmente resistentes a *S. sclerotiorum* fueron identificados en los trabajos de Grau y Radke en 1984; Bolland y Hall, 1986 y Kim y Diers, 2000. Por último, las variedades de soya, Maple Presto, Maple Ridge y Maple Arrow fueron las variedades más resistentes de 19 variedades evaluadas contra *S. sclerotiorum* (Nelson *et al.*, 1991).

Con relación al cultivo del girasol, se puede mencionar que a pesar de que las enfermedades causadas por hongos son factores limitantes en la producción a escala mundial, el grado de control genético hacia *Sclerotinia* no se encuentra todavía a un nivel aceptable, aunque se han realizado algunos progresos. Han tenido mayor éxito los estudios de control de la enfermedad causada por *Phomopsis* incorporando fuentes de resistencia genética de especies silvestres de girasol a especies cultivadas del mismo (Seiler, 1992).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el efecto antagónico de tres cepas de *Bacillus* sobre *S. sclerotiorum* en condiciones de laboratorio e invernadero.

Objetivos específicos

Utilizar diferentes medios de cultivo con el fin de seleccionar el más adecuado para el crecimiento del hongo y de las cepas bacterianas.

Determinar cuantitativamente el efecto antagónico de las cepas bacterianas sobre *S. sclerotiorum* midiendo los halos de inhibición formados en placa.

Realizar pruebas de antagonismo en placa, exponiendo el micelio y los esclerocios de *S. sclerotiorum* a las colonias de *Bacillus*.

Comprobar el efecto fungicida o fungistático de las cepas bacterianas en *S. sclerotiorum*.

Determinar el efecto del extracto crudo sobre el desarrollo de *S. sclerotiorum* *in vitro*.

Analizar el efecto inhibitorio de las cepas bacterianas sobre los esclerocios de *S. sclerotiorum* en cultivo estacionario.

Probar el efecto antagónico de las cepas bacterianas sobre *S. sclerotiorum* en condiciones de invernadero para ver si hay protección de la planta de girasol, *H. annuus*.

Realizar curvas de crecimiento de las cepas bacterianas utilizadas.

Identificación a nivel de especie de las cepas de *Bacillus*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Procedencia de los aislamientos

Dos de las cepas de *Bacillus* (denominadas B₁ y B₂) utilizadas en este ensayo fueron proporcionadas por el Dr. Leopold Fucikovsky Zak del Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados en Montecillos, Estado de México, y la tercera cepa (B₃), proviene de un aislamiento del nopal (*Opuntia* sp) del Estado de México, realizado por el Dr. Isaac Luna del Laboratorio de Fitopatología de la E.N.C.B. del I.P.N.

El aislamiento inicial de *S. sclerotiorum* fue obtenido de esclerocios de este hongo localizados en la médula de tallos de girasoles cultivados en campos del Colegio de Postgraduados, Montecillos, Estado de México. El segundo aislamiento de *Sclerotinia sclerotiorum*, provino de esclerocios hallados en un cultivo de lechuga, en San Luis Tlaxiatalmalco, D. F.

2. Evaluación de la patogenicidad de los aislamientos de *S. sclerotiorum*

Para comprobar el carácter patogénico de los dos aislamientos de *S. sclerotiorum* se prepararon tres macetas de 33 X 25 X 13 cm con 2 Kg de suelo cada una. El inóculo e inoculación fueron hechos de la siguiente manera: A partir de cada una de las cepas de *S. sclerotiorum* de cinco días de crecimiento (en medio PDA) por medio de un sacabocados de 4 mm de diámetro, se obtuvieron cilindros del hongo que fueron colocados al centro de cada placa con PDA para tener un total de ocho placas para cada cepa de *S. sclerotiorum*. Las 16 placas fueron incubadas a 28°C durante cinco días, tiempo en que el desarrollo del hongo había cubierto toda la superficie de la placa y se iniciaba la formación de esclerocios.

Inmediatamente después del periodo de incubación, el medio con el hongo fue fragmentado en porciones de 1 cm². El total de fragmentos resultantes de cada una de las ocho placas fueron inoculados en el suelo a una profundidad de 5 cm en cada una de las macetas designadas para el ensayo, la tercer maceta correspondió al testigo.

Por último, en cada una de las tres macetas se sembraron 50 semillas de girasol a 3 cm de profundidad con riego a capacidad de campo y mantenidas bajo condiciones de invernadero.

Cabe hacer notar que de las semillas no germinadas, se hicieron reaislamientos de *S. sclerotiorum* en PDA y los esclerocios obtenidos en las placas, fueron guardados en refrigeración a 3°C para su posterior uso.

Durante todo este trabajo se prepararon placas de PDA de *S. sclerotiorum* en cultivo axénico, que se utilizaron como testigos en las diferentes pruebas. De estas placas también se recuperaron los esclerocios que fueron guardados a 3°C en refrigeración, para ser utilizados en otros ensayos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3. Medios de cultivo utilizados

3.1. Medios Sólidos

Para seleccionar el medio de cultivo para el mejor crecimiento de las bacterias en las pruebas de antagonismo en placa, fueron probados los medios: Caldo nutritivo-Extracto de levadura-Agar (NBY), Casaminoácidos-Glucosa-Peptona (CPG), B de King (BK) (Schaad *et al.*, 2001) y Papa Dextrosa Agar (PDA), mientras que para el aislamiento del hongo *Sclerotinia sclerotiorum* se probaron los medios: Extracto de Malta Agar (EMA), Jugo V₂ Agar (V₂A) y Papa Dextrosa Agar (PDA) (Ulloa y Hanlin, 1978) (Ver Apéndice 1 para los ingredientes).

3.2. Medios Líquidos

Tanto para las cepas bacterianas, como para *S. sclerotiorum*, el caldo Papa Dextrosa (PD) fue utilizado como medio líquido (Apéndice 1).

4. Preparación y análisis del suelo

El suelo utilizado en las pruebas de invernadero de este estudio contenía 60% de tierra negra y 40% de tierra de hoja. En la Tabla 2 se presentan las características físico-químicas del mismo:

Tabla 2. Estudio físico-químico del suelo utilizado para la siembra del girasol.

Análisis mecánico de suelo	migajón-limoso
Humedad	9.8%
pH	6.2
Materia orgánica	13.8
CaCO ₃	0.3
N ₂ Total	8.95%

El suelo fue homogeneizado y distribuido en cuarenta bolsas de polipapel con 2 Kg de suelo en cada una. Posteriormente, se tinalizó* en una autoclave a 10 libras de presión por 60 minutos. Después de 24 horas se repitió el mismo procedimiento.

* La tinalización, proceso donde existe calentamiento repetido en días sucesivos (Atlas, 1990), se utilizó con el propósito de disminuir la carga microbiana que pudiera interferir en el estudio realizado, sin afectar en gran medida la estructura del suelo.

5. Prueba de germinación

A las semillas de girasol (*H. annuus*) de la variedad Peredovick proporcionadas por el Dr. Fucikovsky (Colegio de Postgraduados) que serian empleadas en el invernadero, se les realizó la prueba de viabilidad. Cien semillas se colocaron en hileras de diez en papel estraza humedecido con agua destilada, enrollándolo y etiquetándolo adecuadamente. Los rollos así formados se mantuvieron en cámara húmeda por tres días (Christensen y López, 1962).

6. Antagonismo en placa

6.1. Antagonismo entre *S. sclerotiorum* y las cepas bacterianas. Mediciones de los halos de inhibición

En un primer ensayo se colocaron sobre placas de PDA, por un lado, un pequeño cilindro (5 mm de altura y 4 mm de diámetro) de medio de cultivo con micelio de *Sclerotinia sclerotiorum* y por el otro, en línea y a tres centímetros de distancia, una de las colonias bacterianas sembrada por picadura; de tal suerte que quedaran, el hongo y la bacteria, en los extremos de un diámetro de tres centímetros.

Las tres cepas bacterianas, posibles antagónicas de *Sclerotinia sclerotiorum*, fueron inoculadas en las placas de PDA a tres diferentes tiempos. Así, en un primer caso *Bacillus 1* se sembró dos días después de haber sembrado *Sclerotinia* ($t = 2+$), en un segundo caso *Bacillus 1* se sembró al mismo tiempo (mismo día) en que se sembró *Sclerotinia* ($t = 0$) y por último *Bacillus 1* se sembró dos días antes de sembrar *Sclerotinia* ($t = 2-$). Lo mismo se realizó para las cepas *Bacillus 2* y *Bacillus 3*.

Cada una de las cepas bacterianas se ensayó por triplicado por cada tiempo.

A los siete días de iniciada la prueba, se midió la distancia entre las colonias (halos de inhibición) para posteriormente realizar el análisis estadístico de varianza (ANDEVA) utilizando el programa Statygraphics Versión 5.0 correspondiente.

6.2. Efecto fungicida o fungistático de las bacterias contra *S. sclerotiorum*

El siguiente ensayo comprobaría el efecto fungicida o fungistático que poseían los tres diferentes aislamientos bacterianos. Para ello, de las placas de *Bacillus* sembrado dos días antes de *Sclerotinia* del ensayo anterior, se extrajo un fragmento de micelio de la porción más cercana a la cepa bacteriana (I) y otro fragmento del micelio más distante de la bacteria, a la orilla de la placa (E) y cada uno se colocó en una misma placa y a una distancia entre ellos de ocho centímetros (Figura 4). Se prepararon tres repeticiones con testigos. Las placas se incubaron a 28°C durante cinco días y se observaron los resultados.

Por otra parte, una técnica para saber si las cepas bacterianas tienen un efecto realmente fungicida, es la de colocar micelio más cercano a la colonia bacteriana y micelio más distante

de la bacteria (Figura 4) sobre la misma zona de inhibición formada por las bacterias y, después de 5 días, transferir esos fragmentos de micelio a nuevas placas de PDA. Observar si existe crecimiento micelial o este está ausente.

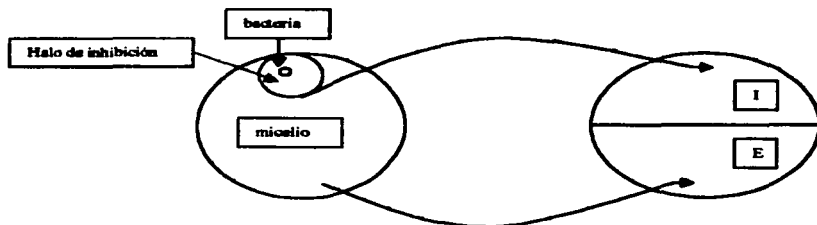


Figura 4. Transferencia de micelio más cercano al halo de inhibición (I) y de micelio más alejado del halo (E) a otra placa con medio PDA.

6.3. Antagonismo entre los esclerocios de *S. sclerotiorum* y las tres cepas bacterianas. Utilización de un anillo metálico para la inoculación de las bacterias

En un tercer ensayo, se hicieron pruebas de antagonismo en placa con esclerocios de *S. sclerotiorum*.

Esclerocios obtenidos de placas de *S. sclerotiorum* de siete días de crecimiento, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3 por ciento por 3 minutos, se lavaron con agua destilada dos veces y fueron colocándose, uno por uno, en el centro de placas con el medio PDA.

Para evitar el exceso de agua sobre el esclerocio en el momento de la siembra, se absorbió ésta con un triángulo de papel filtro estéril para evitar posibles contaminaciones.

La inoculación de las bacterias se realizó con un anillo metálico de 53 mm de diámetro al que se le adaptó un mango metálico para poder ser manipulado. El anillo metálico fue utilizado a manera de un sello. Para la inoculación, el anillo desinfectado con alcohol etílico 96° y flameado, se colocó sobre una cepa bacteriana de 48 horas e inmediatamente se transfirió a una placa con un esclerocio en el centro de la misma.

En este ensayo también se probaron diferentes tiempos de inoculación de bacterias en relación al tiempo de inoculación del hongo. De esta manera, el espacio de tiempo (en días), entre la inoculación de *Bacillus* y *Sclerotinia* fue de: 2 ($t = 2+$) y un día ($t = 1+$) después de

sembrar *Sclerotinia*, de 0 ($t = 0$) cuando *Bacillus* se sembró el mismo día que el hongo y de 1 día ($t = 1-$) cuando *Bacillus* se sembró un día antes de sembrar *Sclerotinia*.

Cada cepa bacteriana fue probada en los tiempos anotados y para cada tratamiento, se realizaron tres repeticiones.

Después de siete días se midieron los diámetros de las colonias fúngicas de todas las placas. Una vez realizado lo anterior, las placas fueron guardadas en el refrigerador para ser utilizadas posteriormente.

6.4. Antagonismo entre el micelio de *S. sclerotiorum* y las tres cepas bacterianas. Utilización del anillo metálico para la inoculación de las bacterias

El micelio de *Sclerotinia sclerotiorum* se obtuvo de placas con el hongo de siete días de desarrollo.

Fragmentos de micelio con medio PDA, de 4 mm de diámetro y 5 mm de altura, se colocaron, uno a uno, en el centro de placas con el mismo medio.

Las cepas bacterianas se inocularon de la misma forma que en el ensayo anterior.

Fueron probados los mismos tiempos que en el ensayo anterior: 2 ($t = 2+$) y un día ($t = 1+$) después de sembrar *Sclerotinia*, de 0 ($t = 0$) cuando *Bacillus* se sembró el mismo día que el hongo y de 1 día ($t = 1-$) antes de sembrar *Sclerotinia*.

Cada cepa bacteriana fue probada en los tiempos anotados y cada tratamiento tuvo tres repeticiones.

De la misma manera que en el ensayo anterior, después de siete días se midieron los diámetros de las colonias fúngicas de los diferentes tratamientos.

7. Antagonismo utilizando extractos bacterianos

Los extractos crudos bacterianos de las tres cepas en estudio fueron obtenidos de la siguiente manera:

Cada cepa bacteriana fue sembrada por estría cruzada en tres placas de PDA e incubada a 28°C por 48 horas.

Después de la incubación, se tomaron dos asadas de cada placa y se transfirieron a tubos de ensaye con 3 mililitros de solución salina al 0.85%. Cada tubo se homogeneizó perfectamente para obtener una suspensión bacteriana con 1.5×10^8 células según la escala de Mac Farland (Kiryaly, 1974). (Apéndice 3)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

De cada suspensión bacteriana se tomaron 0.2 ml, los que se transfirieron a un matraz Erlenmeyer de 250 ml que contenía 100 ml de medio Papa Dextrosa (PD). Este paso se realizó en dos ocasiones, inoculando 0.2 mililitros en otro matraz con 100 ml de PD.

Los medios así inoculados se pusieron en agitación a 150 rpm y a una temperatura de 28°C por 12, 24 y 48 horas.

Los matraces se fueron sacando de la agitadora de acuerdo con los tiempos anotados y enseguida se colocaron en la autoclave a 15 libras de presión por 15 minutos.

En relación con la termotolerancia que poseen algunos antibióticos de *Bacillus*, Dunleavy (1955) reportó que el antibiótico subtilina de *Bacillus subtilis* no perdía su actividad antagonica en el proceso de esterilización a pH de 4 y que su mayor producción ocurrió cuando en el medio existían carbohidratos.

Además de los diferentes tiempos (12, 24 y 48 horas), también se probaron en este ensayo dos concentraciones distintas. Para ello, se vaciaron 15 ml de extracto crudo esterilizado en un matraz Erlenmeyer que contenía 69 ml de PDA (concentración baja) y, por otro lado, se vaciaron 69 ml de extracto crudo esterilizado en un matraz Erlenmeyer que contenía tan sólo 23 ml de PDA (concentración alta). Los matraces así obtenidos se volvieron a colocar en el autoclave a 15 libras de presión por 15 minutos.

Una vez transcurrido ese tiempo, el contenido de cada uno de los matraces se vació en tres cajas de Petri estériles desechables dejándolas en reposo hasta la solidificación del medio. Tres placas con medio PDA para cada uno de los tiempos anotados sirvieron como testigos en este ensayo.

Las tres cepas bacterianas fueron probadas en cada uno de los tiempos y concentraciones anotadas y para cada tratamiento se hicieron tres repeticiones.

Finalmente, en cada una de las placas solidificadas, se colocó centralmente un fragmento de medio con micelio de *S. sclerotiorum* de 4 mm de diámetro y 5 mm de altura. Se realizaron las mediciones de los diámetros de las colonias de *S. sclerotiorum* a los cinco días de inoculación del hongo.

Se aplicó el análisis estadístico de varianza (ANDEVA), correspondiente a los cinco días de crecimiento de *Sclerotinia*.

8. Viabilidad de los esclerocios en el laboratorio

Para este ensayo fueron utilizados esclerocios de *S. sclerotiorum* de 10 días de desarrollo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se prepararon también matraces Erlenmeyer conteniendo 100 ml de PD cada uno, esterilizando a 15 libras durante 15 minutos.

De cada cepa bacteriana fue preparada una suspensión con 1.5×10^8 células para inocular 0.2 ml de la misma en dos matraces con PD.

Enseguida, a cada uno de los matraces inoculados se le agregaron cinco esclerocios desinfectados con hipoclorito de sodio 2% y se dejaron en cultivo estacionario por 2 meses.

El testigo consistió de 2 matraces con PD, inoculados tan sólo con esclerocios de *S. sclerotiorum*.

De la misma manera se prepararon cultivos estacionarios de las cepas de *Bacillus* para observar sus efectos sobre los esclerocios de *S. sclerotiorum* a 1 hora, 12h, 24h, 48h, 7 días y 1 mes.

Transcurrido el tiempo anotado, los esclerocios eran sustraídos de los matraces con unas pinzas y desinfectados con hipoclorito de sodio 2%. Se enjuagaban con agua destilada esterilizada y se colocaban en placas con medio PDA. A los 7 días se observaron y anotaron los resultados.

9. Antagonismo de las cepas bacterianas sobre *S. sclerotiorum* en condiciones de invernadero

9.1. Efecto antagónico de las cepas bacterianas sobre *S. sclerotiorum* en la germinación de las semillas de girasol

Las tres cepas de *Bacillus* fueron consideradas para realizar las pruebas a nivel de invernadero para comprobar su capacidad antagónica *in vivo*.

En este ensayo se utilizaron 80 kg de suelo repartidos en 40 bolsas de polipapel de 5 kg de capacidad, cada una con 2 kg de suelo y tinalizados a 15 libras de presión por una hora.

Por otra parte, de una suspensión bacteriana de la cepa B1, a una concentración de 1.5×10^8 células, se tomaron 2 mililitros para repartir dicho volumen en diez matraces Erlenmeyer con 100 ml de PD cada uno. De la misma manera se inocularon en otros 20 matraces con PD, las cepas bacterianas B2 y B3. Los 30 matraces así inoculados se colocaron en la agitadora a 150 rpm a 37°C por 48 horas.

De acuerdo con el diseño experimental previamente establecido (Tabla 3) y después de 48 horas, los contenidos de los matraces se vaciaron sobre el suelo tinalizado, y aún caliente, en las bolsas de polipapel para ser transportadas al invernadero.

Tabla 3. Diseño experimental. Ocho tratamientos con cinco repeticiones cada uno.

	TESTIGO	B1	B2	B3
S/ScI	1 - 5	11 - 15	21 - 25	31 - 35
C/ScI	6 - 10	16 - 20	26 - 30	36 - 40

S/ScI = Sin *Sclerotinia* C/ScI = Con *Sclerotinia*

Números del 1 al 40 = Números de macetas

Tratamiento 1 = Testigo sin *Sclerotinia*

Tratamiento 2 = Testigo con *Sclerotinia*

Tratamiento 3 = Cepa B1 sin *Sclerotinia*

Tratamiento 4 = Cepa B1 con *Sclerotinia*

Tratamiento 5 = Cepa B2 sin *Sclerotinia*

Tratamiento 6 = Cepa B2 con *Sclerotinia*

Tratamiento 7 = Cepa B3 sin *Sclerotinia*

Tratamiento 8 = Cepa B3 con *Sclerotinia*

En el invernadero se colocaron completamente al azar 40 macetas (Tabla 4), correspondiendo a los ocho tratamientos con sus cinco repeticiones y se vació en ellas el suelo según el diseño experimental.

Los tratamientos correspondieron a la inoculación o no del hongo *Sclerotinia* y a la inoculación de las tres cepas bacterianas además del tratamiento testigo.

Después de una semana, se inoculó el micelio de *S. sclerotiorum* en las macetas correspondientes. Para cada maceta, fueron utilizadas cuatro placas con micelio del hongo de cinco días de crecimiento en PDA. En cada maceta, se retiró con cuidado el suelo superficial necesario para inocular los fragmentos del micelio de 1 cm² de *S. sclerotiorum* de una manera homogénea y a una profundidad de dos centímetros aproximadamente. Al final, se volvió a colocar el suelo superficial para evitar la desecación del micelio.

Para asegurar la presencia de gran cantidad de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en cada maceta, se inoculó por segunda vez y de la misma forma, con las cepas bacterianas B1, B2 y B3 una semana después de haber inoculado el hongo.

Finalmente, en cada una de las 40 macetas se sembraron 25 semillas de girasol a dos centímetros de profundidad. Se regó con agua corriente cada tercer día y se esperaron resultados.

9.2. Efecto antagónico de las cepas bacterianas sobre *S. sclerotiorum* en plantas de girasol maduras

Diez días después del registro de la germinación de las semillas, se procedió a eliminar las plántulas que habían crecido tardíamente y las que estaban demasiado altas, de tal manera que sólo quedaran diez plántulas del mismo tamaño aproximadamente.

Tabla 4. Diseño experimental. Colocación de las macetas dentro del invernadero.

5(T)	23(B2)	14(B1)	21(B2)
25(B2)	29(B2)	4(T)	35(B3)
9(T)	27(B2)	33(B3)	6(T)
12(B1)	28(B2)	37(B3)	34(B3)
36(B3)	17(B1)	15(B1)	39(B3)
8(T)	22(B2)	19(B1)	31(B3)
3(T)	13(B1)	18(B1)	30(B2)
7(T)	10(T)	16(B1)	20(B1)
1(T)	26(B2)	24(B2)	11(B1)
40(B3)	38(B3)	2(T)	32(B3)

B1, B2, B3 = Cepas Bacterianas; T = Testigo; Números del 1 al 40 = macetas colocadas al azar.

Realizada esta primera selección, se efectuó una nueva de otras cinco plántulas ahora completamente al azar, quedando así, al final, las cinco plántulas restantes en cada palangana.

Durante todo el experimento las plantas fueron regadas con agua corriente cada tercer día, procurando mantener un ambiente húmedo dentro del invernadero.

Aproximadamente al mes de iniciado este ensayo, se comenzaron a desarrollar los apotecios del hongo inoculado. Se procedió entonces a contar su número por maceta y registrarlos mensualmente.

Al final del ensayo se retiraron las plantas para registrar el número de plantas marchitas. También se registró el número de esclerocios presentes en las plantas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

10. Curvas de crecimiento de las cepas bacterianas

Las curvas de crecimiento de las tres cepas bacterianas se realizaron utilizando el método de recuento de células viables, con la siembra en placa por extensión (Brock y Madigan, 1993).

De una dilución bacteriana de 0.2 ml / 100 ml de PD esterilizado (muestra), se hicieron diluciones decimales. La primera de ellas (10^{-1}), se realizó con 1ml de la muestra más 9 ml de agua destilada esterilizada contenida en un tubo de ensaye. De la misma manera se prepararon las demás diluciones hasta la última dilución de 10^{-6} . Los tiempos en los que se hicieron las diluciones fueron $t = 0, 3, 6, 9, 12, 24$ y 48 horas. Finalmente, de cada dilución se tomaron por triplicado y en cada tiempo, 0.1 ml que fueron vaciados con una pipeta sobre la superficie de una placa con medio PDA y esparcida de modo uniforme con una varilla estéril de vidrio. Se incubaron las placas a 28°C por 24 horas y se procedió a hacer el conteo de las colonias o UFC después de ese tiempo.

11. Identificación de las cepas bacterianas

Para la identificación de las especies de *Bacillus* utilizadas en esta investigación, se aplicaron diversas pruebas bioquímicas y morfológicas (Wolf y Barker, 1968; Graber, 1970; Király, 1974; Mac Faddin, 1984; Koneman *et al.*, 1985; Brock y Madigan, 1993; Schaad *et al.*, 2001) además de utilizar el sistema comercial API 49, que consta del mismo número de pruebas bioquímicas estandarizadas constituyendo un kit de identificación. Las pruebas llevadas a cabo se anotan a continuación:

Cabe mencionar que para cada prueba bioquímica y por cada cepa, se realizaron tres repeticiones.

11.1. Crecimiento anaeróbico en caldo glucosado

Colonias aisladas de las cepas en estudio fueron inoculadas en caldo glucosado (Apéndice2), haciendo crecer a las bacterias en condiciones anaeróbicas. Para ello fueron utilizados dos métodos: con aceite mineral y con frasco GasPak.

El aceite mineral (2 ml) se agregó a cada tubo de ensaye inmediatamente a la inoculación de la bacteria en caldo glucosado.

En un frasco GasPak fueron colocados los tubos inoculados con las tres cepas bacterianas y un catalizador químico que consume las trazas de O_2 que hayan quedado en la campana o en el medio de cultivo.

Después de 48 horas, se revisaron los tubos para comprobar el crecimiento bacteriano.

11.2. Crecimiento a 45° C

Placas de PDA con las cepas bacterianas en estudio fueron colocadas en la estufa a 45°C durante 5 días. Se observó si existía o no crecimiento.

11.3. Crecimiento a pH de 5.7

El medio PDA se ajustó al pH de 5.7 utilizando soluciones de NaOH 1M y HCl 1M, para posteriormente vaciarlo en cajas de Petri. Las placas así obtenidas se inocularon con las cepas bacterianas en estudio y se pusieron a incubar a 30°C por 48 horas.

11.4. Crecimiento en NaCl 3% y NaCl 7%

Se preparó caldo nutritivo para obtener medio con 3g de NaCl /100 ml de agua y 7g de NaCl / 100 ml de agua (Apéndice 2). Se incubó a 30°C por 2 días. La turbidez del medio indica el crecimiento bacteriano.

11.5. Hidrólisis de almidón

Las cepas bacterianas en estudio se inocularon en placas de agar-almidón (Apéndice 2) y se incubaron a 30°C por 5 días. Después de este tiempo, se inundaron con una solución de lugol e hidróxido de potasio. Una prueba positiva se demuestra por la presencia de zonas sin color alrededor de la colonia, lo que indica la hidrólisis del almidón.

11.6. Posición de la endospora

Se resuspendieron las colonias bacterianas en agua destilada. Una gota de cada suspensión fue colocada sobre un extremo del portaobjetos, el cual se inclinó hasta que la gota se secó al aire. Para si observación se hizo la tinción del extendido usando el verde de malaquita durante 10 minutos, y como colorante de contraste la safranina por 15 segundos (Apéndice 2). Luego se lavó con agua y se dejó secar al aire.

Los cuerpos bacilares se tiñen de rojo-anaranjado y las esporas de verde.

11.7. Reducción de nitratos

Se inocularon las tres cepas bacterianas en estudio en un medio a base de extracto de carne y peptona en tubos de ensaye que contenían a su vez tubos de Durham. Después de incubar a 30°C por 24 horas, se añadieron 4 gotas de los reactivos A y B a cada tubo (Apéndice 2).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El desarrollo de un color rojo tras agregar los reactivos señalados indica la presencia de nitritos y representa una reacción positiva para la reducción de nitratos.

11.8. Tinción de Gram

La tinción de Gram se realizó utilizando colonias bacterianas de 24 horas. Una o dos asadas de las colonias crecidas en ese tiempo se suspendieron en 3 ml de agua destilada estéril en un tubo de ensaye. Enseguida se procedió a colocar una gota de la suspensión en un extremo de un portaobjetos el cual se inclinó para que la gota fuera deslizándose a lo largo del mismo. Se secó ligeramente a la flama. Una vez seca la extensión se cubrió con cristal violeta durante un minuto. Se enjuagó con agua corriente y se añadió lugol durante otro minuto. Se enjuagó de nueva cuenta con agua. Posteriormente se decoloró con alcohol (30 segundos), se lavó ligeramente y contrastó con safranina durante unos 10 segundos. Se terminó lavando con agua y secando al aire (Apéndice 2).

Las células Gram-positivas adquieren un color púrpura mientras que las células Gram-negativas se tiñen de anaranjado-rojizo.

11.9. Utilización del citrato

Para esta prueba fue necesario tomar colonias de las cepas en estudio e inocularlas en el medio citrato de Simmons (Apéndice 2) contenido en tubos con agar inclinado. Se incubaron a 30°C por 48 horas.

El desarrollo de un color azul intenso después del tiempo de incubación indica una prueba positiva y revela que el microorganismo en estudio ha sido capaz de utilizar el citrato contenido en el medio.

11.10. Producción de ácidos a partir de carbohidratos

Para comprobar la formación de ácidos a partir de carbohidratos se preparó base de caldo rojo fenol (Apéndice 2), vaciándose en tubos de ensaye con campanas de Durham para la producción de gas. Por otra parte se elaboraron seis soluciones azucaradas de los carbohidratos: lactosa, arabinosa, xilosa, ramnosa, celobiosa y manitol al 1% que fueron pasadas por filtros milipore antes de vaciar a los tubos de ensaye con caldo rojo fenol. El medio base rojo fenol cambia a color amarillo cuando la bacteria fermenta el azúcar probada.

11.11. Prueba de oxidación-reducción (OF) (medio de Hugh y Leifson)

La producción de ácidos a partir de la degradación oxidativa de la glucosa se puede detectar

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN.

con medios sensibles de óxidofermentación como el de Hugh y Leifson. En éste la cantidad de proteínas se encuentra disminuida y la de carbohidratos aumentada si se compara con medios de fermentación de hidratos de carbono comunes. Esta menor relación proteínas-carbohidratos reduce la formación de aminas alcalinas que pueden neutralizar las pequeñas cantidades de ácidos derivados del metabolismo oxidativo. Por último, la consistencia semisólida del agar permite que los ácidos formados en la superficie se difundan por todo el medio, facilitando la visualización del viraje del indicador de pH azul de bromotimol del azul al amarillo.

Al medio de Hugh y Leifson se le agregó la solución de glucosa (Apéndice 2) y se vació en tubos de ensaye esterilizados. Se inocularon dos tubos con cada cepa bacteriana y a uno de ellos se le adicionó inmediatamente 2 ml de aceite mineral para propiciar condiciones de anaerobiosis en el medio.

Se incubaron los tubos a 30°C durante 48 horas.

11.12. Prueba de Voges-Proskauer (V-P)

En esta prueba se determina el acetilmetilcarbinol (acetoína) formado en el medio por la acción del metabolismo bacteriano por el tratamiento con hidróxido de potasio y en presencia de oxígeno atmosférico.

En tubos de ensaye con 3 ml de caldo V-P (Apéndice 2), se incubaron las cepas bacterianas durante 48 horas a 30°C. Al finalizar este período, se transfirió un mililitro de cada tubo a un tubo de ensaye limpio añadiendo luego 0.6 ml de α -naftol al 5% y 0.2 ml de KOH al 40 %.

Se agitó cuidadosamente para exponer el medio al oxígeno atmosférico y se dejó reposar por 15 minutos.

Pasado el tiempo señalado y en una prueba positiva, se observa un cambio del color propio del medio al rojo, lo que revela la presencia de diacetilo, producto de oxidación de la acetoína.

11.13. Leche tornasolada (prueba de Litmus)

La fermentación de la lactosa, la hidrólisis de la caseína y la reducción del tornasol se determinaron con esta prueba.

En tubos con leche tornasolada (Apéndice 2), se inocularon las tres cepas en estudio dejándose incubar a 30°C por 48 horas. Después de este tiempo se revisaron los tubos y se anotaron los resultados. En una prueba positiva la tonalidad tornasol cambia a un color rojo rosado (fermentación de la lactosa) e inclusive, puede presentarse como una leucobase (reducción del tornasol). La hidrólisis de la caseína se manifiesta por una aclaración acuosa

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

del medio causada por la digestión del precipitado formado y las proteínas de la leche, por las enzimas proteolíticas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Evaluación de la patogenicidad de los aislamientos de *S. sclerotiorum*

Para este ensayo fueron utilizadas semillas de girasol de la variedad Peredovick, que alcanzaron un 96% de germinación.

A los diez días de haber sembrado 150 semillas de girasol en tres macetas, según el Inciso III. 2. de Materiales y Métodos, se procedió a contar el número de plántulas crecidas en cada maceta. Se registró también el número de semillas no germinadas.

En la primera maceta, en donde se había inoculado *S. sclerotiorum* aislado del girasol, se contaron 20 plántulas y 30 semillas sin germinar, lo que dio un porcentaje del 40% de germinación.

En la segunda maceta con *S. sclerotiorum* aislado de la lechuga, también se calculó un 40% de germinación.

En la tercera maceta con 50 semillas de girasol y sin inóculo fúngico (testigo), el porcentaje de germinación fue del 92%.

Como se puede apreciar, tanto el aislamiento de *S. sclerotiorum* del girasol como el aislamiento obtenido de la lechuga produjeron el mismo porcentaje de germinación de las semillas (40%). El porcentaje restante lo constituyeron las semillas no germinadas. Por los resultados, se estableció que los dos aislamientos podían ser utilizados indistintamente en este trabajo. Sin embargo, el aislamiento de *S. sclerotiorum* del girasol fue sustituido por el aislamiento de la lechuga cuando se consideró que el primer aislamiento tenía mayor tiempo de ser manipulado en el laboratorio, por lo que podía representar más adelante, un menor grado de patogenicidad.

2. Crecimiento en diferentes medios de cultivo

2.1. Crecimiento de las cepas bacterianas en diferentes medios de cultivo

Cada una de las cepas bacterianas con potencialidad de ser antagónicas a *S. sclerotiorum* se hicieron crecer en los medios: NBY, CPG, BK y PDA (Inciso III 3.1. de Materiales y Métodos).

Comparando el crecimiento de cada una de las cepas bacterianas en los cuatro diferentes medios de cultivo, se estableció que el medio PDA resultó ser el de mayor utilidad para este trabajo por permitir un crecimiento más homogéneo de las colonias bacterianas, mientras que en medios como el CPG (Fig. 5b) las colonias presentan un crecimiento arborescente, semejante a una estrella.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El crecimiento en los diferentes medios fue similar en las tres cepas. De ahí que en la Fig. 5 se ilustra sólo el crecimiento de *Bacillus 2* (B2), en los 4 medios de cultivo.

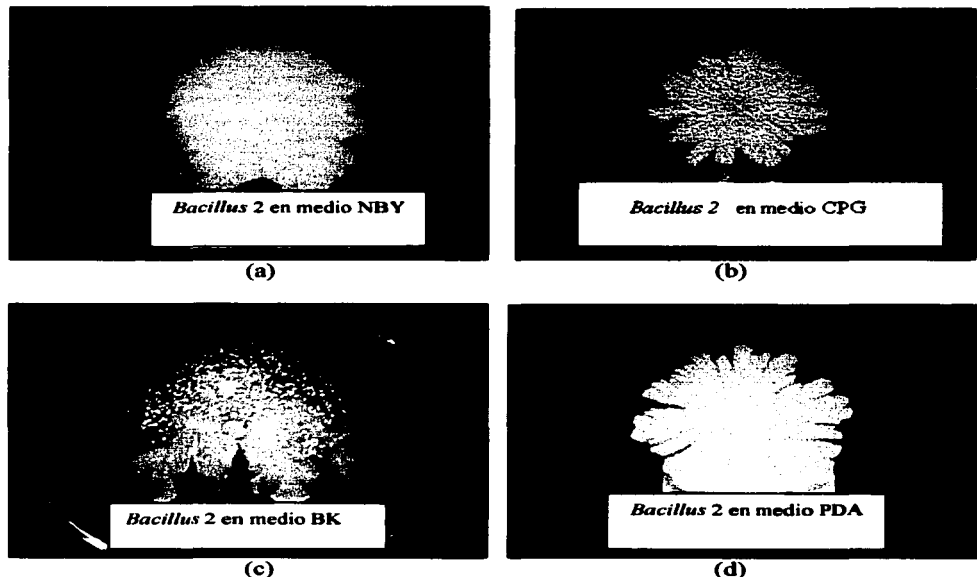


Figura 5. Cepa bacteriana *Bacillus 2* (B2) en diferentes medios de cultivo. 5(a) en NBY.- 5(b) en CPG.- 5(c) en BK y 5(d) en PDA.

2.2. Crecimiento de *S. sclerotiorum* en diferentes medios de cultivo

Fragmentos de micelio del hongo (de 4mm de diámetro) fueron sembrados en los medios V₈A, EMA y PDA (Inciso III 3.1. de Materiales y Métodos).

Después de 5 días se comparó el crecimiento de *S. sclerotiorum* en los tres medios anotados con los resultados siguientes: El hongo en EMA mostró un crecimiento micelial muy pegado al medio de cultivo. En este medio se formaron muy escasos esclerocios y de diferentes tamaños; el crecimiento en general fue escaso, no llegando a cubrir la superficie del medio. En V₈A el crecimiento también fue escaso, sin llegar a abarcar el máximo

diámetro de la placa. En el centro de la colonia fúngica se formó abundante micelio aéreo y con escasos esclerocios.

En PDA el micelio abarcó el máximo diámetro de la placa (9 centímetros) y con gran número de primordios de esclerocios en el borde de la colonia.

Como consecuencia de los resultados anotados se optó por utilizar en este trabajo, como medio general el PDA para el crecimiento de *S. sclerotiorum* (Fig. 6).

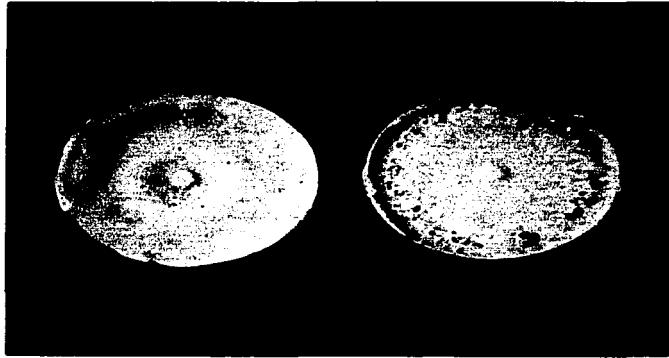


Figura 6. *Sclerotinia sclerotiorum* a los 5 días (izquierda) y 7 días (derecha) de crecimiento en PDA. En esta segunda placa se observan primordios de esclerocios.

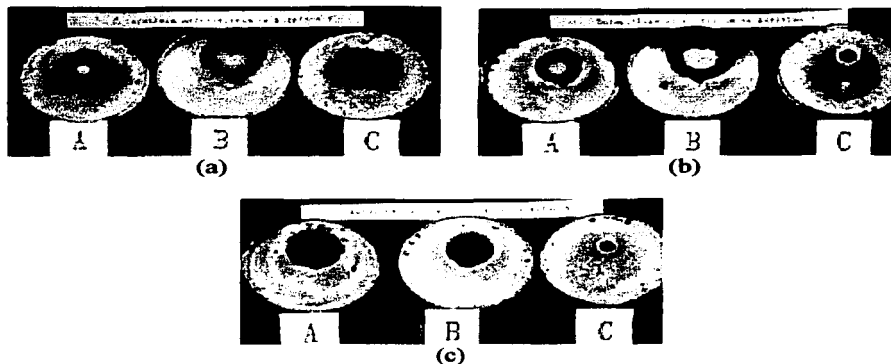
3. Antagonismo en placa

3.1. Antagonismo entre *S. sclerotiorum* y las cepas bacterianas, desarrollándose halos de inhibición

A los siete días de haber sembrado en placa a *S. sclerotiorum* con las tres cepas bacterianas (*Bacillus* spp.) en diferentes tiempos (Inciso III 6.1. de Materiales y Métodos), se observó la formación de halos de inhibición (Figura 7) que fueron medidos en cinco puntos distintos de confrontación.

En la Figura 7 se muestra que hubo inhibición del crecimiento de *S. sclerotiorum* con las tres cepas bacterianas. Sin embargo, es más notable la inhibición con las cepas B1 y B2, en todos los tiempos, comparada con la cepa B3. También se nota que la cepa B1 fue más

eficiente para producir los halos de inhibición sembrándola dos días antes de *Sclerotinia*, si se compara con las otras dos cepas, probadas en ese tiempo.



A=*Bacillus* inoculado el mismo día en el que se sembró *Sclerotinia*; B=*Bacillus* inoculado un día antes de sembrar *Sclerotinia*; C=*Bacillus* inoculado un día después de sembrar *Sclerotinia*.

Figura 7. Halos de inhibición formados con las cepas bacterianas B1, B2 y B3 a tres diferentes tiempos. 7(a) Halos de inhibición formados con la cepa B1.- 7(b) Halos de inhibición formados con la cepa B2.- 7(c) Halos de inhibición formados con la cepa B3.

En la Tabla 5 se anotan los resultados de las mediciones realizadas en los halos de inhibición de *S. sclerotiorum* frente a las tres cepas bacterianas, en diferentes tiempos.

Al realizar el análisis estadístico de varianza (ANDEVA) de los resultados anotados en la Tabla 5, se demuestra que existen diferencias significativas entre las cepas bacterianas ($P < 0.0001$) y los tiempos de inoculación probados ($P < 0.0001$) (Apéndice 4).

La cepa bacteriana denominada B1, tuvo mayor efecto antagónico que las otras dos cepas probadas en los tres tiempos anotados. Es decir, al sembrar B1 dos días antes de *Sclerotinia*, el mismo día y dos días después de sembrar al hongo.

La cepa B2 se desarrolló casi igual sembrada dos días antes de *Sclerotinia* que sembrada al mismo tiempo. Por lo que se podría considerar para el caso que, si se inoculara dos días antes o el mismo día, esto no afectaría en su grado de inhibición.

Tabla 5. Mediciones de halos de inhibición (cm) producidos entre *S. sclerotiorum* y las cepas bacterianas B1, B2 y B3 en tres diferentes tiempos.

HALOS DE INHIBICION							
<i>Bacillus</i> inoculado dos días después de sembrar <i>Sclerotinia</i> (t = 2+)							
		Distancia entre la colonia bacteriana y fúngica (cm) (5 mediciones por placa)					Promedio
Scl/B1	Placa 1	0.3	0.3	0.2	0.3	0.5	0.51(0.2726)
	Placa 2	0.3	0.6	0.9	0.9	0.8	
Scl/B2	Placa1	0.4	0.3	0.3	0.2	0.3	0.24(0.0843)
	Placa2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	
Scl/B3	Placa1	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.14(0.0516)
	Placa2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	
<i>Bacillus</i> inoculado al mismo tiempo que <i>Sclerotinia</i> (t = 0)							
		Distancia entre la colonia bacteriana y fúngica (cm) (5 mediciones por placa)					Promedio
Scl/B1	Placa 1	1.3	1.1	0.6	1.0	1.4	0.99(0.2514)
	Placa 2	1.1	1.0	0.9	0.8	0.7	
Scl/B2	Placa1	0.8	0.8	0.9	0.8	0.7	0.78(0.0918)
	Placa2	0.8	0.9	0.8	0.7	0.6	
Scl/B3	Placa1	0.5	0.4	0.5	0.4	0.5	0.41(0.0875)
	Placa2	0.3	0.3	0.5	0.4	0.3	
<i>Bacillus</i> inoculado dos días antes de sembrar <i>Sclerotinia</i> (t = 2-)							
		Distancia entre la colonia bacteriana y fúngica (cm) (5 mediciones por placa)					Promedio
Scl/B1	Placa 1	1.9	1.8	1.6	1.7	1.8	1.76(0.1264)
	Placa 2	1.8	2.0	1.6	1.7	1.7	
Scl/B2	Placa1	0.8	1.0	0.9	0.8	1.0	0.81(0.1370)
	Placa2	0.7	0.6	0.9	0.7	0.7	
Scl/B3	Placa1	0.7	0.6	0.7	0.7	0.7	0.77(0.2162)
	Placa2	0.6	0.5	1.1	1.1	1.0	

Scl/B1 = *Sclerotinia* vs *Bacillus* 1; Scl/B2 = *Sclerotinia* vs *Bacillus* 2; Scl/B3 = *Sclerotinia* vs *Bacillus* 3
El valor entre paréntesis, corresponde a la desviación estándar.

La cepa B3, fue la menos eficiente como antagonista de *S. sclerotiorum*; en los tres tiempos probados fue la que presentó menor grado de antagonismo, por lo que no podría recomendarse para subsecuentes estudios de control biológico.

La determinación del antagonismo por la simple observación de los halos de inhibición puede considerarse una prueba cualitativa (Jiménez-Delgadillo, 1996). La medición, en cambio, de los halos de inhibición formados, se considera una prueba cuantitativa efectiva (Utkhede y Rahe, 1983) para la determinación de la actividad antagonista que poseen algunos microorganismos. Los resultados obtenidos en este ensayo confirman que, en realidad, pueden realizarse comparaciones de las actividades antagonistas de cepas bacterianas utilizando los halos de inhibición como parámetros de medición, y que las cepas

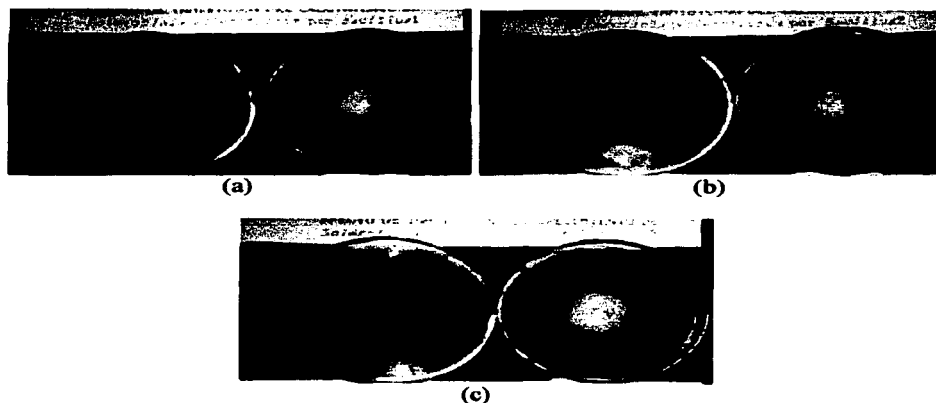
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

de *Bacillus* probadas tienen grados diferentes de inhibición sobre el crecimiento del hongo fitopatógeno *S. sclerotiorum*.

3.2. Efecto fungicida o fungistático de las bacterias sobre *S. sclerotiorum*

Después de transcurridos cinco días de la inoculación del micelio más cercano a la colonia bacteriana y del más alejado de la misma (Figura 4), según lo anotado en el Inciso III 6.2. de Materiales y Métodos, se observó que las cepas bacterianas B1 y B2 tuvieron un efecto fungistático más que fungicida sobre *S. sclerotiorum*, ya que hubo crecimiento del hongo, aunque este fue realmente escaso. No sucedió lo mismo con la cepa B3, donde el crecimiento del hongo fue mucho mayor si se compara con las otras dos cepas (Figura 8). En los tres incisos de la Figura 8, la placa de la derecha corresponde siempre al testigo.

Por otra parte, es de notar que en la cepa B2 el mayor efecto fungistático se observa sobre el micelio más cercano a la colonia fúngica (I), que sobre el micelio más alejado (E) (Figura 8b).



En las tres fotografías: La placa de la derecha corresponde al testigo de *S. sclerotiorum*. La placa de la izquierda muestra la mitad superior marcada con la letra I, que corresponde al micelio más cercano al halo de inhibición, y la letra E marcada con la mitad inferior, se refiere al micelio más alejado del halo.

Figura 8. Efecto fungistático de las cepas B1(a), B2(b) y B3(c) de *Bacillus* sobre *S. sclerotiorum*.

De las tres cepas, la cepa B3 fue la que presentó el menor efecto fungistático por el mayor crecimiento del micelio de *Sclerotinia* en contacto con la colonia bacteriana (Figura 8c). El efecto fungistático en cepas de *Bacillus* y específicamente de *B. subtilis*, ha sido reportado en trabajos como el de McKeen y colaboradores en 1986 sobre el hongo fitopatógeno *Monilinia fructicola* causante de la enfermedad conocida como "podrición café" y el de Fucikovsky y colaboradores de 1989, donde se reportan dos aislamientos de *Bacillus* con efecto fungistático sobre varios hongos de importancia fitopatológica, dentro de ellos *S. sclerotiorum*.

3.3. Antagonismo entre los esclerocios de *S. sclerotiorum* y las tres cepas bacterianas

Después de 7 días de incubación a 28°C, se midieron los diámetros de las colonias fúngicas crecidas en las placas con PDA y en donde se habían inoculado las cepas bacterianas utilizando un anillo metálico (Inciso III 6.3. de Materiales y Métodos) a diferentes tiempos.

Los resultados de esta prueba se anotan en la Tabla 6 donde se observa que los diámetros de las colonias fúngicas, provenientes de esclerocios, varían dependiendo del tiempo transcurrido entre la inoculación de las cepas bacterianas y la inoculación del hongo fitopatógeno.

Así, los diámetros de las colonias de *Sclerotinia* en general son mayores cuando las bacterias se inocularon días después del hongo. Los diámetros de las colonias fúngicas van aumentando conforme van pasando los días, sin observar un efecto de las cepas bacterianas sobre dicho crecimiento.

El tiempo le permitió al hongo crecer y a la vez, disminuir el posible efecto antagónico que podían tener las bacterias sobre el mismo hongo.

Sin embargo, cuando *Bacillus* se inoculó el mismo día (al mismo tiempo) que *Sclerotinia* y también cuando se inoculó un día antes del hongo, se observa que *Bacillus* tuvo un efecto antagónico sobre el hongo ya que éste no creció. El valor dado de 0.4 cm corresponde al diámetro promedio del esclerocio inoculado inicialmente. Se obtuvo el mismo resultado con las tres cepas bacterianas probadas.

En este ensayo no hubo un efecto antagónico significativo de *Bacillus* sobre el crecimiento de *Sclerotinia* ($P = 0.531$) cuando las cepas bacterianas se inocularon días después del hongo. Sin embargo, cuando las bacterias se inocularon en la placa el mismo día que *Sclerotinia* o un día antes, el crecimiento del micelio fue nulo. El tiempo de inoculación de la bacteria, antes de sembrar el hongo, fue un factor determinante para que se observara un efecto antagónico sobre éste ($P = < 0.001$) (Apéndice 5a).

Tabla 6. Diámetros de colonias de *S. sclerotiorum*, proveniente de esclerocios, inoculando a *Bacillus* a diferentes tiempos.

Sc/B	Diámetro de colonia fúngica (cm)				Promedio
<i>Bacillus</i> inoculado dos días después de sembrar <i>Sclerotinia</i> (t = 2+)					
Sc/B1	Pl 1	1.2	1.2	1.2	1.36(0.1322)
	Pl 2	1.4	1.4	1.4	
	Pl 3	1.5	1.5	1.5	
Sc/B2	Pl 1	1.1	1.1	1.1	0.96(0.4444)
	Pl 2	1.4	1.4	1.4	
	Pl 3	0.4	0.4	0.4	
Sc/B3	Pl 1	1.1	1.1	1.1	1.63(0.5291)
	Pl 2	2.3	2.3	2.3	
	Pl 3	1.5	1.5	1.5	
<i>Bacillus</i> inoculado un día después de sembrar <i>Sclerotinia</i> (t = 1+)					
Sc/B1	Pl 1	0.4	0.4	0.4	0.50(0.1500)
	Pl 2	0.7	0.7	0.7	
	Pl 3	0.4	0.4	0.4	
Sc/B2	Pl 1	0.4	0.4	0.4	0.63(0.3500)
	Pl 2	0.4	0.4	0.4	
	Pl 3	1.1	1.1	1.1	
Sc/B3	Pl 1	0.6	0.6	0.6	0.46(0.1000)
	Pl 2	0.4	0.4	0.4	
	Pl 3	0.4	0.4	0.4	
<i>Bacillus</i> inoculado el mismo día de sembrar <i>Sclerotinia</i> (t = 0)					
Sc/B1	Pl 1	0.4	0.4	0.4	0.40(0.0000)
	Pl 2	0.4	0.4	0.4	
	Pl 3	0.4	0.4	0.4	
Sc/B2	Pl 1	0.4	0.4	0.4	0.40(0.0000)
	Pl 2	0.4	0.4	0.4	
	Pl 3	0.4	0.4	0.4	
Sc/B3	Pl 1	0.4	0.4	0.4	0.40(0.0000)
	Pl 2	0.4	0.4	0.4	
	Pl 3	0.4	0.4	0.4	
<i>Bacillus</i> inoculado un día antes de sembrar <i>Sclerotinia</i> (t = 1-)					
Sc/B1	Pl 1	0.4	0.4	0.4	0.40(0.0000)
	Pl 2	0.4	0.4	0.4	
	Pl 3	0.4	0.4	0.4	
Sc/B2	Pl 1	0.4	0.4	0.4	0.40(0.0000)
	Pl 2	0.4	0.4	0.4	
	Pl 3	0.4	0.4	0.4	
Sc/B3	Pl 1	0.4	0.4	0.4	0.40(0.0000)
	Pl 2	0.4	0.4	0.4	
	Pl 3	0.4	0.4	0.4	

Sc/B1 = *Sclerotinia* vs *Bacillus* 1; Sc/B2 = *Sclerotinia* vs *Bacillus* 2; Sc/B3 = *Sclerotinia* vs *Bacillus* 3
 Pl 1 = placa 1; Pl 2 = placa 2; Pl 3 = placa 3.

El valor entre paréntesis, corresponde a la desviación estándar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Al mes de mantener en refrigeración a 3°C las placas donde aparentemente no había crecido el hongo (cuando *Bacillus* se sembró el mismo día y un día antes de *Sclerotinia*), sobre el fragmento inicial inoculado, se presentó crecimiento de micelio aéreo. Con esta observación, se confirma el efecto fungistático de *Bacillus* sobre *Sclerotinia*. Este crecimiento del micelio, en muchas ocasiones, llegó hasta la tapa de la caja de Petri, pero nunca sobrepasó el diámetro del fragmento (en este caso, del esclerocio) inoculado inicialmente.

3.4. Antagonismo entre el micelio de *S. sclerotiorum* y las tres cepas bacterianas

Con este ensayo, similar al anterior, se intentó conocer cual era la estructura fúngica más idónea para la prueba; esto es, si era mejor utilizar el micelio de *S. sclerotiorum* o era más recomendable usar esclerocios.

Si se comparan los resultados de este ensayo (Tabla 7) con los resultados de la Tabla 6, se evidencia que, en general, los diámetros de las colonias fúngicas producidas por el micelio, tendieron siempre a ser mayores que los diámetros de las colonias fúngicas provenientes de los esclerocios.

El análisis estadístico (Apéndice 5b) comprueba que el crecimiento del micelio en este ensayo, no se vio influido por las cepas bacterianas probadas ($P = 0.0079$), y que existió un efecto antagónico por *Bacillus* cuando las bacterias se inocularon un día antes de *S. sclerotiorum* ($P = < 0.0001$).

El análisis estadístico, donde se comparan el esclerocio y el micelio (Apéndice 6), establece que el utilizar esclerocios es mejor que hacerlo con el micelio ($P = < 0.0001$) debido, probablemente, a que el crecimiento del micelio a partir de estas estructuras es más lento, lo que daría a su vez más tiempo para que los antibióticos generados por las bacterias antagónicas se difundieran en el medio de cultivo y así observar con mayor claridad su efecto antagónico.

4. Antagonismo utilizando extractos bacterianos

Cinco días después de haber incubado a 28°C a *S. sclerotiorum* en las placas, con dos concentraciones del extracto bacteriano y a tres tiempos distintos (Inciso III 7. de Materiales y Métodos), se procedió a medir el crecimiento de las colonias fúngicas.

Los diámetros de las colonias fúngicas crecidas a diferentes concentraciones y tiempos se anotan en la Tabla 8.

Se hace notar que a los cinco días todas las placas consideradas testigo, presentaban buen crecimiento del micelio de *Sclerotinia* (nueve centímetros de diámetro) con el desarrollo de primordios de esclerocios.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 7. Diámetros de colonias de *S. sclerotiorum*, proveniente de micelio, inoculando a *Bacillus* a diferentes tiempos.

<i>Scl/B</i>	Diámetro de la colonia fúngica (centímetros)				Promedio
<i>Bacillus</i> inoculado dos días después de sembrar <i>Sclerotinia</i> (t = 2+)					
<i>Scl/B1</i>	PI 1	3.6	3.6	3.6	3.60(0.0000)
	PI 2	3.6	3.6	3.6	
	PI 3	3.6	3.6	3.6	
<i>Scl/B2</i>	PI 1	4.0	4.0	4.0	4.10(0.0866)
	PI 2	4.2	4.2	4.2	
	PI 3	4.1	4.1	4.1	
<i>Scl/B3</i>	PI 1	3.4	3.4	3.4	3.53(0.1000)
	PI 2	3.6	3.6	3.6	
	PI 3	3.6	3.6	3.6	
<i>Bacillus</i> inoculado un día después de sembrar <i>Sclerotinia</i> (t = 1+)					
<i>Scl/B1</i>	PI 1	2.2	2.2	2.2	2.33(0.3605)
	PI 2	2.0	2.0	2.0	
	PI 3	2.8	2.8	2.8	
<i>Scl/B2</i>	PI 1	2.4	2.4	2.4	2.53(0.2000)
	PI 2	2.8	2.8	2.8	
	PI 3	2.4	2.4	2.4	
<i>Scl/B3</i>	PI 1	1.9	1.9	1.9	2.03(0.1322)
	PI 2	2.2	2.2	2.2	
	PI 3	2.0	2.0	2.0	
<i>Bacillus</i> inoculado al mismo tiempo que <i>Sclerotinia</i> (t = 0)					
<i>Scl/B1</i>	PI 1	0.6	0.6	0.6	0.46(0.1000)
	PI 2	0.4	0.4	0.4	
	PI 3	0.4	0.4	0.4	
<i>Scl/B2</i>	PI 1	0.8	0.8	0.8	0.76(0.3041)
	PI 2	1.1	1.1	1.1	
	PI 3	0.4	0.4	0.4	
<i>Scl/B3</i>	PI 1	1.1	1.1	1.1	1.06(0.0500)
	PI 2	1.1	1.1	1.1	
	PI 3	1.0	1.0	1.0	
<i>Bacillus</i> inoculado un día antes de sembrar <i>Sclerotinia</i> (t = 1-)					
<i>Scl/B1</i>	PI 1	0.4	0.4	0.4	0.40(0.0000)
	PI 2	0.4	0.4	0.4	
	PI 3	0.4	0.4	0.4	
<i>Scl/B2</i>	PI 1	0.4	0.4	0.4	0.40(0.0000)
	PI 2	0.4	0.4	0.4	
	PI 3	0.4	0.4	0.4	
<i>Scl/B3</i>	PI 1	0.4	0.4	0.4	0.40(0.0000)
	PI 2	0.4	0.4	0.4	
	PI 3	0.4	0.4	0.4	

Scl/B1 = *Sclerotinia* vs *Bacillus* 1; *Scl/B2* = *Sclerotinia* vs *Bacillus* 2; *Scl/B3* = *Sclerotinia* vs *Bacillus* 3
 PI 1 = placa 1; PI 2 = placa 2; PI 3 = placa 3.

El valor entre paréntesis, corresponde a la desviación estándar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 8. Diámetros de colonias fúngicas de *S. sclerotiorum* a diferentes concentraciones y tiempos de los extractos bacterianos probados.

Diámetro de colonia fúngica (cm) (12 horas)		
Cepas	Concentración baja	Concentración alta
B1	7.5	3.4
	1.0	4.5
	1.0	0.4
Promedio	3.1(3.7527)	2.7(2.1221)
B2	9.0	2.7
	9.0	3.0
	9.0	2.0
Promedio	9.0(0.0000)	2.5(0.5131)
B3	9.0	6.0
	9.0	9.0
	9.0	9.0
Promedio	9.0(0.0000)	8.0(1.7320)
Diámetro de colonia fúngica (cm) (24 horas)		
Cepas	Concentración baja	Concentración alta
B1	0.4	0.4
	0.4	0.4
	0.4	0.4
Promedio	0.4(0.0000)	0.4(0.0000)
B2	2.0	0.4
	6.0	0.4
	7.0	0.4
Promedio	5.0(2.6457)	0.4(0.0000)
B3	8.0	2.5
	8.0	2.5
	6.5	1.0
Promedio	7.5(0.8660)	2.0(0.8660)
Diámetro de colonia fúngica (cm) (48 horas)		
Cepas	Concentración baja	Concentración alta
B1	3.5	0.4
	0.4	0.4
	0.4	0.4
Promedio	1.4(1.7897)	0.4(0.0000)
B2	0.4	0.4
	0.4	0.4
	2.0	0.4
Promedio	0.9(0.9237)	0.4(0.0000)
B3	4.0	0.4
	0.4	0.4
	0.5	0.4
Promedio	1.6(2.0502)	0.4(0.0000)

B1 = *Bacillus* 1; B2 = *Bacillus* 2; B3 = *Bacillus* 3

El valor entre paréntesis, corresponde a la desviación estándar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El análisis estadístico de varianza, indica que existieron diferencias significativas entre las cepas bacterianas ($P = < 0.0001$), entre las concentraciones probadas ($P = < 0.0001$), así como entre los diferentes tiempos ensayados ($P = < 0.0001$) (Apéndice 7).

Las tres cepas bacterianas probadas presentan diferente efecto antagónico sobre *S. sclerotiorum*. La cepa B1, como en los ensayos anteriores, fue la cepa con mayor grado de antagonismo a *S. sclerotiorum*. En cuanto a la cepa B3, ésta tuvo el menor grado de antagonismo en todos los casos.

Es de hacer notar que el menor efecto antagónico se dio, como era de esperarse, a las menores concentraciones de los extractos bacterianos de las tres cepas. En general, en las concentraciones bajas *S. sclerotiorum* creció más que en las concentraciones altas.

En relación con los tiempos probados (12h, 24h y 48 horas) también existen diferencias significativas. El efecto antagónico fue mayor (medido por el menor diámetro de colonias fúngicas) a mayor tiempo de crecimiento bacteriano (48 horas de agitación). Lo mismo aconteció en las tres cepas bacterianas estudiadas.

Después de 10 días de iniciado el ensayo, se observó un mayor crecimiento del hongo, sobre todo en aquéllas placas rotuladas de 12 horas. El hongo a ese tiempo presentó buen crecimiento, con un micelio blanco cubriendo toda la superficie de la placa y, en general, desarrollo de primordios de esclerocios. Solamente en las placas de mayor concentración de extracto de la cepa B1 no se formaron esclerocios (Figura 9).

Con estos resultados, nuevamente se enfatiza la acción fungistática de las cepas probadas, al menos, por lo que respecta a los extractos provenientes de cultivos de tan solo 12 horas de crecimiento.

A los 10 días, y en relación con las placas de 24 horas, se observó el crecimiento de un micelio escaso y ralo, pero sin formación de esclerocios en las dos concentraciones de las cepas B2 y B3. Por otra parte, la cepa B1 a este tiempo y en las dos concentraciones, presentó efecto fungicida debido a que no hubo crecimiento de *S. sclerotiorum* (Figura 9).

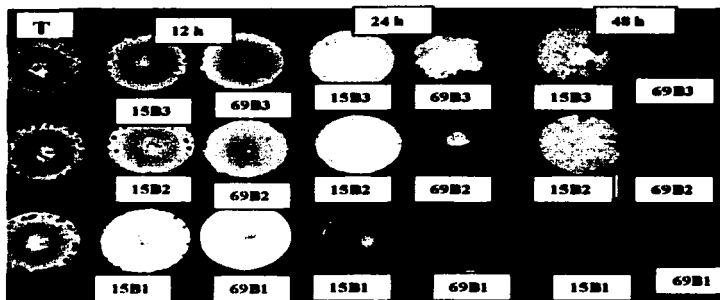
Por último, en las placas rotuladas de 48 horas, sólo en las bajas concentraciones de extracto de las cepas B2 y B3 se presentó un crecimiento ralo del micelio y sin formación de esclerocios. En la cepa B1 y en las altas concentraciones de extracto de las cepas B2 y B3, el hongo no formó micelio ni desarrolló esclerocios (Figura 9).

La acción fungicida de las tres cepas bacterianas estudiadas es muy notoria en las altas concentraciones del extracto y al tiempo de 48 horas.

Por lo que respecta al efecto de la temperatura sobre los extractos crudos se comprobó que la sustancia o sustancias antagónicas que producen las cepas de *Bacillus* estudiadas, son termotolerantes debido a que sus extractos crudos fueron esterilizados al calor antes de confrontarlos con el hongo en cuestión. Además, esta esterilización se hizo en dos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ocasiones, una, al esterilizar los cultivos después de haber cumplido los tiempos de 12h, 24h y 48 horas. La otra esterilización se realizó después de mezclar los extractos crudos esterilizados con el medio PDA no solidificado, para posteriormente vaciar en las cajas de Petri (Inciso III 7. de Materiales y Métodos).



T = Testigos; 15B3 y 69B3 concentración baja y alta del extracto crudo de la cepa B3; 15B2 y 69B2 concentración baja y alta del extracto crudo de la cepa B2; 15B1 y 69B1 concentración baja y alta del extracto crudo de la cepa B1; 12h, 24h y 48h corresponden al tiempo en horas del crecimiento bacteriano.

Figura 9. Diámetros de las colonias fúngicas creciendo en dos concentraciones de extracto crudo bacteriano y tres diferentes tiempos.

5. Viabilidad de los esclerocios en el laboratorio

En este ensayo, se probó el efecto de las cepas de *Bacillus* sobre la germinación de los esclerocios, a diferentes tiempos, según la técnica anotada en el Inciso III 8. de Materiales y Métodos.

La viabilidad de los esclerocios después de mantenerlos en cultivo bacteriano sumergido durante una hora, 12 h, 24h, 48h, 7 días, 1 mes y 2 meses se anota en la Tabla 9.

Al transcurrir los tiempos anotados, la viabilidad de los esclerocios se determinó al colocarlos en medio PDA para su germinación.

Las cepas bacterianas estudiadas, se comportaron de manera similar en cuanto al efecto sobre la viabilidad de los esclerocios. Las tres cepas inhibieron el desarrollo de los esclerocios desde las 48 horas. En los cultivos sumergidos por 7 días, un mes y dos meses, los esclerocios no presentaron desarrollo de micelio.

Existieron diferencias con los testigos desde las 48 horas. En ese tiempo de exposición los esclerocios de los testigos sí fueron viables, mientras que los esclerocios provenientes de los cultivos sumergidos bacterianos ya no germinaron. Lo mismo aconteció con los esclerocios de los testigos de 7 días.

Tabla 9. Efecto de las cepas bacterianas B1, B2 y B3 en cultivo sumergido sobre la viabilidad de los esclerocios de *S. sclerotiorum*.

TIEMPO	CEPAS BACTERIANAS			TESTIGO
	B1	B2	B3	
1h	Viables	viables	viables	viables
12h	Viables	viables	viables	viables
24h	Viables	viables	viables	viables
48h	no viables	no viables	no viables	viables
7 días	no viables	no viables	no viables	viables
1 mes	no viables	no viables	no viables	No viables. Sólo viables los esclerocios de la 2ª generación
2 meses	no viables	no viables	no viables	No viables. Sólo viables los esclerocios de la 2ª generación

En los matraces que no tenían inóculo bacteriano (testigo) con uno y dos meses, los esclerocios llegaron a formar micelio que posteriormente dio origen a una segunda generación de esclerocios. Al transferir los esclerocios al medio PDA, los que fueron inoculados inicialmente ya no germinaron (no fueron viables), mientras que los esclerocios de la segunda generación resultaron viables.

Desde las 48 horas se observó un efecto antagónico de las cepas bacterianas sobre la viabilidad de los esclerocios.

Con este ensayo se demostró el efecto antagónico de las cepas B1, B2 y B3, sobre la germinación de los esclerocios de *S. sclerotiorum* a partir de las 48 horas. Se observó que el tiempo de exposición de las bacterias sobre los esclerocios es determinante en la viabilidad de los mismos. En los cultivos bacterianos sumergidos de 48 horas, 7 días, un mes y dos meses, los esclerocios no germinaron, mientras que en los matraces testigo los esclerocios germinaron, desarrollaron micelio y éste, a su vez, formó una segunda generación de esclerocios.

El antagonismo de *Bacillus*, evidenciado por la falta de viabilidad en los esclerocios de *S. sclerotiorum*, es atribuido a la producción de antibióticos desde las 48 horas del cultivo bacteriano, que inhibieron la germinación de los esclerocios.

En relación con la producción de antibióticos por *Bacillus*, Brathwaite, en 1978, reporta que la inhibición de la germinación, crecimiento y producción de los esclerocios de *Sclerotium rolfsii* en el suelo, se atribuyó a antibióticos de *Bacillus subtilis*.

6. Preparación del suelo para estudios de invernadero

La preparación del suelo se realizó según lo señalado en el Inciso III 4. de Materiales y Métodos.

Como se indicó, el suelo antes de ser utilizado para el estudio de invernadero, se tinalizó a 115°C por 60 minutos, para disminuir la carga microbiana que pudiera interferir en dicho estudio.

En este proceso, donde se utiliza el vapor como un tratamiento selectivo de calor, se eliminan los fitopatógenos del suelo sin destruir algunos de los microorganismos saprófitos antagonistas residentes (en particular las bacterias y actinomicetos) (Olsen y Baker, 1968).

7. Antagonismo de las cepas bacterianas sobre *Sclerotinia sclerotiorum* en condiciones de invernadero

7.1. Efecto antagonístico de las cepas bacterianas sobre *S. sclerotiorum* en la germinación de las semillas de girasol.

A los ocho días de haber sembrado las semillas de girasol (Inciso III 9.1. de Materiales y Métodos), se procedió a contar el número de semillas germinadas.

La germinación de las semillas ocurrió en todas las macetas a los ocho días de sembrar; el número de plántulas por maceta se reporta en la Tabla 10.

Al analizar los resultados se advierte que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos con y sin *Sclerotinia* ($P = 0.108$), ni entre las cepas y el testigo ($P = 0.206$), por lo que se puede afirmar que las cepas bacterianas no tuvieron ningún efecto en el desarrollo de *S. sclerotiorum*; pero tampoco el hongo fitopatógeno influyó en la germinación de las semillas de girasol (Apéndice 8).

Tabla 10. Número de plántulas de girasol en las 40 macetas.

Maceta	Plántulas	Maceta	Plántulas	Maceta	Plántulas	Maceta	Plántulas
1	25	11	25	21	22	31	22
2	23	12	25	22	25	32	23
3	25	13	24	23	21	33	23
4	22	14	22	24	24	34	23
5	23	15	25	25	23	35	25
6	23	16	25	26	23	36	23
7	22	17	23	27	24	37	23
8	25	18	23	28	24	38	21
9	22	19	23	29	23	39	21
10	24	20	23	30	23	40	22

Los resultados del nulo efecto antagónico de las especies de *Bacillus* sobre *S. sclerotiorum*, permite especular sobre la posibilidad de que dicho efecto quizás se podría haber observado si se hubiera agregado al suelo mayor cantidad de inóculo bacteriano, antes de sembrar las semillas de girasol. De tal manera que cuando comenzara la germinación de las semillas, las bacterias ya hubieran tenido influencia en la viabilidad del hongo fitopatógeno, aunque esta influencia se viera hasta la madurez de las plantas.

7.2. Efecto antagónico de las cepas bacterianas sobre *S. sclerotiorum* en la madurez de las plantas de girasol

A los diez días de registrar el número de plántulas por maceta (Tabla 10), se eliminaron las plántulas necesarias para dejar sólo diez en cada maceta. De éstas, se eligieron por sorteo cinco plántulas que se dejaron ahí hasta terminar el ensayo (Inciso III 9.2. de Materiales y Métodos). A partir de esa fecha, se fue observando el desarrollo de pequeños esclerocios oscuros y superficiales en las macetas inoculadas con *S. sclerotiorum*.

En una de las macetas testigo, inoculada tan sólo con *S. sclerotiorum*, se halló una plántula caída e invadida con micelio y dos esclerocios. La plántula había alcanzado 12 centímetros de altura. Éste fue el único caso donde se observó crecimiento miceliogénico del hongo en cuestión.

El desarrollo de apotecios sobre esclerocios superficiales o semienterrados en el suelo, se inició casi al mes de haber sembrado las semillas de girasol. Los apotecios crecían en grupos o solitarios, llegando a medir tres centímetros en promedio.

Mensualmente se registraba el número de apotecios en las macetas inoculadas con *S. sclerotiorum*. Ningún apotecio se desarrolló en las macetas de los tratamientos (Tabla 3) sin *Sclerotinia*.

En la Tabla 11 se anota el número de apotecios por maceta registrado durante cuatro meses.

Como se puede observar, el número de apotecios varió en el tiempo y según el tratamiento. En el mes de noviembre se produjo el mayor número de ascocarpos en todos los tratamientos con *S. sclerotiorum*. En particular, fue en el tratamiento 2 (testigo) donde se observó el mayor número de apotecios por mes, a excepción del tratamiento 6 (cepa B2 con *Sclerotinia*) (Tabla 3) donde, precisamente, en el mes de noviembre se presentó el mayor número de apotecios.

Tabla 11. Registro mensual promedio del número de apotecios por tratamiento.

Tratamiento	Septiembre	Octubre	Noviembre	Enero
1	0	0	0	0
2	0	21	130	70
3	0	0	0	0
4	0	15	96	37
5	0	0	0	0
6	0	18	171	30
7	0	0	0	0
8	0	1	68	25

Se hace notar que en el tratamiento 8 (cepa B3 con *Sclerotinia*), se tuvo un menor número de apotecios en todos los meses, en comparación con los demás tratamientos.

En la Figura 10 se observa como se fue presentando la marchitez en los girasoles a través del tiempo, en los ocho tratamientos. Por ejemplo, desde el mes de octubre se inició la marchitez en plantas del tratamiento 2 (sólo con *Sclerotinia*). Sin embargo, la marchitez generalizada comenzó en el mes de diciembre, cuando macetas inoculadas con las cepas bacterianas y *Sclerotinia*, además del testigo (tratamientos 2, 4 y 8) presentaron un gran número de plantas marchitas. La excepción fue observada en el tratamiento 6 (B2 más *Sclerotinia*), donde hubo menor cantidad de plantas marchitas, si se compara con el testigo.

También se observó una cierta correlación entre el número de apotecios y el grado de marchitez presente en las plantas. Cuando el mayor número de apotecios se observaba en el mes de noviembre, un mayor número de plantas marchitas se presentaba justo al siguiente mes. Se puede decir que las condiciones ambientales fueron adecuadas para la germinación de las ascosporas en las plantas, lo que fue causa de su marchitez. Esta correlación no es válida con el tratamiento 6 (B2 con *Sclerotinia*) porque aún y cuando se presentan un gran número de apotecios, hubo solamente una planta marchita al siguiente mes.

En la Figura 11 se incluye el número de plantas marchitas por tratamiento para los dos últimos meses. Como se puede apreciar en el mes de diciembre, el mayor número de plantas

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

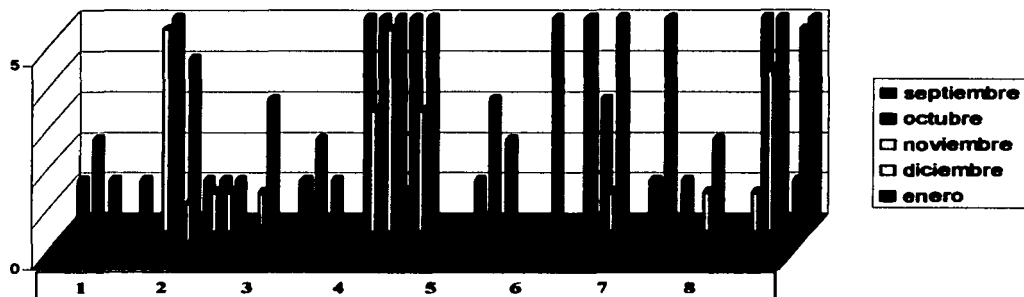


Figura 10. Número de plantas marchitas de girasol de septiembre a enero en los ocho tratamientos.

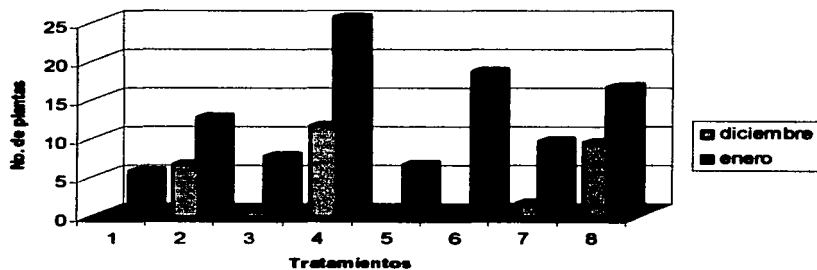


Figura 11. Número de plantas marchitas en los dos últimos meses en los ocho tratamientos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

marchitas se presentó en los tratamientos con *Sclerotinia*. Sin embargo, al comparar el tratamiento 2 (inoculado sólo con el hongo) con los tratamientos 4 y 8, se observó un aumento de plantas marchitas en estos últimos, pero una disminución del número de plantas marchitas en el tratamiento 6 correspondiente a las macetas inoculadas con la cepa B2 y el hongo *Sclerotinia*.

En el mes de enero se extrajeron las plantas de las macetas y se procedió a analizar sus raíces, tallos y receptáculos florales.

Al revisar las raíces se encontró pudrición seca y, en ocasiones, desarrollo de esclerocios en el cuello de las plantas. Tales esclerocios fueron gruesos, oscuros y amorfos, pareciendo formar en ocasiones una sola estructura rodeando la base del tallo.

Algunos de los tallos presentaban esclerocios en su interior, a la vez que un micelio blanco y algodonoso. Los esclerocios en esta ocasión fueron muy largos (hasta 1 centímetro) y delgados, del mismo grosor del tallo. Se ubicaban hasta 10 centímetros por arriba de la superficie del suelo.

El número de esclerocios por tratamiento se anota en la Figura 12.

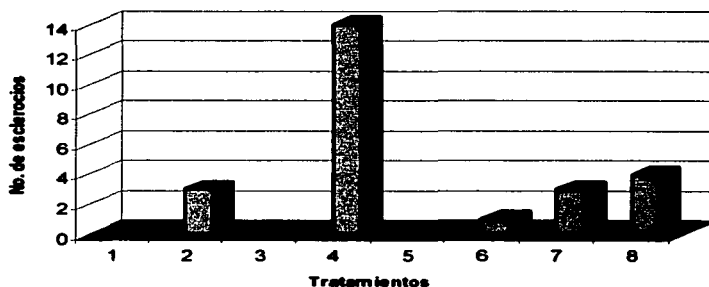


Figura 12. Número de esclerocios hallados en las plantas en los ocho tratamientos.

De los receptáculos florales se aisló a *S. sclerotiorum*, colocando pequeñas porciones de los mismos, previamente lavados y desinfectados, en placas de PDA.

No se realizó análisis estadístico de la longitud de las plantas debido a que hasta el momento de sacarlas de las macetas, casi todas presentaban la misma altura, siendo esta de noventa centímetros aproximadamente.

Al respecto, aunque se ha reportado que algunos aislamientos de *Streptomyces* y de *Bacillus* spp. han funcionado como promotores de crecimiento (Utkhede y Rahe, 1980), en este trabajo no se observó ninguna diferencia entre el tamaño de las plantas inoculadas con *Bacillus* de las plantas sin inóculo bacteriano.

Como se puede apreciar por los resultados del ensayo en el invernadero, no se halló efecto antagonico de las cepas bacterianas sobre el hongo *Sclerotinia sclerotiorum*. Varias pudieron ser las causas de tales resultados. Una de ellas consistió en la forma de inoculación de las bacterias; quizás si se hubiera realizado una bacterización de las semillas de girasol, antes que integrar a las bacterias directamente al suelo, se podría haber estado con mayor posibilidad de inhibir el desarrollo del hongo. Sin embargo, esto no se realizó para imitar las condiciones en las que las bacterias se encuentran normalmente en la naturaleza.

Por la misma razón, no se prefirió la inoculación del hongo utilizando esclerocios embebidos en los caldos bacterianos, aunque esta técnica pudiera haber resultado efectiva considerando los resultados de viabilidad de los esclerocios.

El tamaño del inóculo bacteriano agregado al suelo, pudo haber sido en mayor cantidad, lo que deberá considerarse en estudios semejantes. Al respecto, Aranda y Fucikovskiy (1996) reportaron que al aplicar *B. subtilis* (1.5×10^6 cel/ml) semanalmente a una dosis de 100 ml en macetas de 5 Kg con suelo esterilizado y sembrado con tubérculos de dos variedades de papa e inoculadas con fitopatógenos (dentro de ellos *Sclerotinia* sp.), hallaron diferencias significativas para los parámetros evaluados; número de tubérculos producidos y peso de los mismos. No así para la variable talla de los tubérculos.

Al encontrarse las bacterias en desventaja en cuanto a la densidad de inóculo, la cantidad de sustancias antibióticas producidas en el suelo quizás no fueron suficientes para inhibir el crecimiento del micelio y el subsiguiente desarrollo de los esclerocios. Los esclerocios, a su vez, formaron apotecios. Sin embargo, el número de apotecios en los tratamientos inoculados con B1 y B3 resultó menor que el número de apotecios en el tratamiento testigo.

8. Curvas de crecimiento de las cepas bacterianas utilizadas en el estudio

Esta parte del trabajo tuvo la finalidad de conocer principalmente el tiempo en el que las bacterias en estudio llegaban a la fase estacionaria donde normalmente se producen los antibióticos, metabolitos secundarios inhibidores de desarrollo microbiano.

Por otro lado, se conoce que las bacterias formadoras de endosporas (como es el caso de *Bacillus*) producen toxinas que inhiben el desarrollo de otros microorganismos, y la producción de estas endosporas la hacen después de que el cultivo ha entrado a la fase estacionaria (Brock y Madigan, 1993).

El realizar las curvas de crecimiento de las bacterias en estudio, permitió establecer los tiempos apropiados de utilización de las mismas como antagonicas de *S. sclerotiorum*.

En la Figura 13 se representan las curvas de crecimiento de las bacterias usadas durante el estudio.

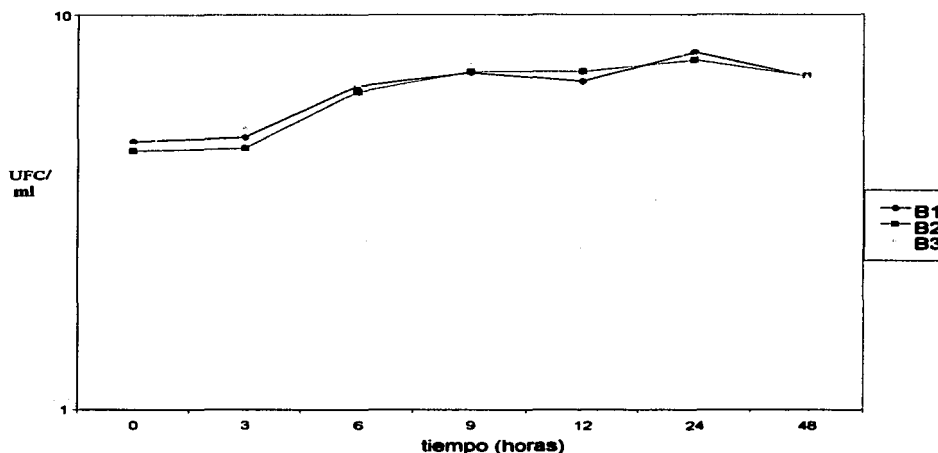


Figura 13. Curvas de crecimiento de las cepas bacterianas B1, B2 y B3.

Las tres cepas bacterianas de *Bacillus* presentaron curvas de crecimiento similares. Como se observa, después de las 24 horas el crecimiento tiende a disminuir y a las 48 horas el crecimiento bacteriano se encuentra en la fase estacionaria.

La formación de los antibióticos responsables de la actividad antagonista de las cepas B1, B2 y B3 después de las 48 horas, se reafirma con los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* de los halos de inhibición, extractos bacterianos y viabilidad de los esclerocios en donde, a las 48 horas, se observan efectos antagonistas sobre *S. sclerotiorum*.

9. Identificación de las bacterias con propiedades antagonistas

Para la identificación de las bacterias utilizadas en este estudio fueron realizadas varias pruebas bioquímicas, además de utilizar el sistema diagnóstico de identificación conocido como API 49 según lo establecido en el Inciso III 11. de Materiales y Métodos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los resultados de las pruebas bioquímicas para determinar las especies de *Bacillus* se anotan en la Tabla 12.

De acuerdo con la prueba de diagnóstico API49 utilizada y los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas en el laboratorio, las cepas denominadas B1 y B2 corresponden a la especie *Bacillus subtilis* mientras que la cepa B3 pertenece a la especie *Bacillus amyloliquefaciens*.

Tabla 12. Pruebas bioquímicas para la identificación de las cepas de *Bacillus*.

	B1	B2	B3
Tinción de Gram	+	+	+
Posición de la espora Central	+	+	+
Crecimiento a 45°C	+	+	+
Crecimiento a pH 5.7	+	+	+
Crecimiento en NaCl 3%	+	+	+
Crecimiento en NaCl 7%	+	+	+
Reducción de nitratos	+	+	+
Utilización de citrato	+	+	-
Crec anaeróbico en caldo glucosado	-	-	-
Carbohidratos:			
Arabinosa	+	+	+
Celobiosa	+	+	+
Lactosa	+	-	+
Manitol	+	+	+
Ramnosa	+	+	+
Xylosa	+	+	-
Prueba V-P	+	+	+
Hidrólisis de almidón	+	+	+
Leche tomasolada (Litmus)	+	+	+

Las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de las cepas de *Bacillus* fueron obtenidas de los siguientes autores: (Wolf y Barker, 1968; Schaad, 1988; Harwood, 1989). Para cada prueba y cada cepa se hicieron tres repeticiones. Los resultados concuerdan con los citados en la bibliografía.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

V. CONCLUSIONES

Dos de los aislamientos de *Bacillus* fueron identificados como *Bacillus subtilis* y el tercero como *B. amyloliquefaciens*

Las dos cepas de *B. subtilis* y la cepa de *B. amyloliquefaciens* probadas en este estudio, presentaron actividad antagónica sobre *S. sclerotiorum in vitro*.

La cepa denominada B1 de *B. subtilis* tuvo el mayor grado de antagonismo en pruebas específicas *in vitro*, como la medición de halos de inhibición y extractos crudos bacterianos, comparándola con la cepa B2 de *B. subtilis* y la cepa B3 de *B. amyloliquefaciens*.

Las cepas de *Bacillus subtilis* tienen un buen potencial para ser consideradas en estudios de control de *S. sclerotiorum*. No se considera lo mismo para la cepa de *B. amyloliquefaciens*.

Las cepas de *Bacillus* estudiadas tuvieron un efecto fungistático sobre *S. sclerotiorum*.

Los antibióticos producidos por *B. subtilis* resultaron ser termoestables, pues conservaron, en los extractos crudos esterilizados, su actividad antagónica sobre *S. sclerotiorum*.

S. sclerotiorum causó marchitez en las plantas de girasol, produciendo además pudrición basal seca con la formación de esclerocios en la médula de la planta y fuera de ella.

Ninguna de las cepas de *Bacillus* en las concentraciones usadas y aplicadas al suelo, resultaron ser efectivas en la disminución de la marchitez causada por *S. sclerotiorum* en las plantas maduras de girasol, bajo las condiciones experimentales de este estudio.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abawi, G.S. and R.G. Grogan. (1975). Source of primary inoculum and effects of temperature and moisture on infection of beans by *Whetzelinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 65:300-309.
- Abawi, G.S. and R.G. Grogan. (1979). Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 69(8):899-904.
- Adams, P.B. and Ayers, W.A. (1979). Ecology of *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 69(8):896-898.
- Agrios, G.N. (1997). *Plant Pathology*. Academic Press. San Diego California, USA. p. 635.
- Aldrich, J. and R. Baker. (1970). Biological control of *Fusarium roseum* f.sp.dianthi by *Bacillus subtilis*. *Plant Disease Reporter*. 54(5):446-448.
- Anas, O. and R.D. Reeleder. (1987). Recovery of fungi and arthropods from sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in Quebec muck soils. *Phytopathology* 77(2):327-331.
- Aranda, S. y L. Fucikovskyy. (1996). Evaluación del efecto de *Bacillus subtilis* en la producción del cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) bajo condiciones de invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología* 14(2):166
- Armentrout, V.N. and A.B.A.M. Baudoin. (1988). Isolation of fungi and bacteria. In: Baudoin, A.B.A.M., G.R. Hooper, D.E. Mathre, R.B. Carroll (eds). *Laboratory exercises in plant pathology: an instructional kit*. APS Press, St. Paul Minnesota, USA. pp.23-28.
- Atlas, R. M. (1990). *Microbiología. Fundamentos y aplicaciones*. CECSA. México. p. 887.
- Brathwaite, C.W.D. (1978). Inhibition of *Sclerotium rolfsii* by *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* and its significance in the biological control of Southern blight of pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.). In: Utkhede, R.S. and J.E. Rahe. (1980). Biological control of onion white rot. *Soil Biology and Biochemistry* 12: 101-104.
- Becerra Leor E. y E. López Salinas. (1994). Enfermedades del cultivo de frijol en el trópico de México. *Memorias XXI Congreso Nacional de Fitopatología*. Cuernavaca, Mor. México. p. 56.
- Boland, G.J. and R. Hall. (1986). Growthroom evaluation of soybean cultivars for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Science* 66:559-564.
- Boland, G.J. and G.D.Inglis. (1989). Antagonism of white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) of bean by fungi from bean and rapeseed flowers. *Canadian Journal of Botany* 67(6):1775-1781.

Brock, T.D. and M.T. Madigan. (1993). *Microbiología*. Prentice Hall Hispanoamericana, México. p.956.

Budge, S.P. and J.M. Whipps. (1991). Glasshouse trials of *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma* species for the biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* in celery and lettuce. *Plant Pathology* 40:59-66.

Bullock, S., P.B Adams, H.J. Willetts and W.A. Ayers. (1986). Production of haustoria by *Sporidesmium sclerotivorum* in sclerotia of *Sclerotinia minor*. *Phytopathology* 76(1):101-103.

Buzzell, R.I., T.W. Welacky and T.R. Anderson. (1993). Soybean cultivar reaction and row width effect on *Sclerotinia* stem rot. *Canadian Journal of Plant Science* 73:1169-1175.

Caesar, A.J. and R.C. Pearson. (1983). Environmental factors affecting survival of ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 73:1024-1030.

Casale, W.L. and L.P. Hart (1986). Influence of four herbicides on carpogenic germination and apothecium development of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 76(10):980-984.

Christensen, C.F. and L.C. López (1962). Daños que causan en México los hongos a los granos almacenados. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Folleto Técnico 44. p. 29.

Cook, G.E., J.R. Steadman and M.G. Boosalis. (1975). Survival of *Whetzelinia sclerotiorum* and initial infection of dry edible beans in Western Nebraska. *Phytopathology* 65:250-255.

Cooper, W.E. (1961). Strains of, resistance to, and antagonists of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 51(2):113-115.

Chun, D., L.B Kao, J.L. Lockwood and T.G. Isleib. (1987). Laboratory and field assessment of resistance in soybean to stem rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease* 71:811-815.

Dann, E.K., B.W. Diers and R. Hammerschmidt. (1999). Suppression of *Sclerotinia* stem rot of soybean by lactofen herbicide treatment. *Phytopathology* 89:598-602.

DeBach, P. (1979). Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. Ed. Continental, México. p.949.

De la Torre, A. R. (1991). Situación actual de la problemática fitopatológica y avances de la investigación en el INIFAP en el estado de Puebla. El Vector No. 3. Boletín Informativo de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. México. p. 32.

Dos Santos, A.F. and O. D. Dhingra. (1982). Pathogenicity of *Trichoderma* spp. on the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Botany* 60(4):472-475.

- Dunleavy, J. (1955). Control of Damping-off of sugar beet by *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 45:252-258.
- Elad, Y., I. Chet and J. Katan. (1980). *Trichoderma harzianum*: A biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70:119-121.
- Farr, D. F., G.F. Bills, G.P. Chamuris and A.Y. Rossman. (1989). *Fungi on plants and plant products in the United States*. APS Press. USA. p. 1252.
- Ferreira, S.A. and R.A. Boley. (2001). *Sclerotinia sclerotiorum*. (INTERNET: www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/s_screr.hun).
- Fucikovsky, L. (1987). *Whetzelinia sclerotiorum* y *Sclerotium rolfsii* en Sinaloa. VII Congreso Nacional de Fitopatología. Oaxtepec, Mor. México. p. 9
- Fucikovsky, L. (2002). Laboratorio de Fitobacterias. Instituto de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados, Montecillos Edo. de Méx. México. (Comunicación personal).
- Fucikovsky, L. I. Luna y C. López. (1989). Bacterial antagonists to *Pseudomonas solanacearum* in potatoes and some other plant pathogens. 7th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Budapest, Hungary. p.43.
- Graber, Ch. D. (1970). Rapid diagnostic methods in medical microbiology. Williams & Wilkins Company, USA. pp.104-105.
- Grau, C. R. and V.L. Radke. (1984). Effects of cultivars and cultural practices on *Sclerotinia* stem rot of soybean. *Plant Disease* 68:56-58.
- Guigon, L.C. (1992). Marchitez causada por *S. sclerotiorum* en papa. Memorias del Congreso Nacional de Fitopatología. Puebla de los Angeles, Pue. México. p. 143.
- Harwood, C. R. (1989). *Bacillus*. Plenum Press. New York. USA. p. 415.
- Huang, H.C. and J.A. Hoes. (1980). Importance of plant spacing and sclerotial position to development of *Sclerotinia* wilt of sunflower. *Plant Disease* 64:81-84.
- Huang, H.C. and E.G. Kokko. (1987). Ultrastructure of hiperparasitism of *Coniothyrium minitans* on sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Botany* 65:2483-2489.
- Huang, H.C. and G.C. Kozub. (1990). Cyclic occurrence of *Sclerotinia* wilt of sunflower in western Canada. *Plant Disease* 74(10):766-70.

- Jiménez-Delgadillo, R. (1996). Aislamiento, selección e identificación de rizobacterias antagonicas contra *Rhizoctonia solani* y cuantificación de su actividad antagonica. Tesis Profesional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N., México. p. 31.
- Kim, H.S. and B.W. Diers. (2000). Inheritance of partial resistance to *Sclerotinia* stem rot in soybean. *Crop Science* 40:55-61.
- Kiraly, Z. (1974). *Methods in plant pathology with special reference to breeding for disease resistance*. Publish House of the Hungarian Academy of Science. p. 151.
- Knudsen, G.R. and D.J.Eschen. (1991). Potential for biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* through colonization of sclerotia by *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease* 75(5):466-470.
- Kohn, L.M.(1979a). A monographic revision of the genus *Sclerotinia*. *Mycotaxon* 9(2):365-444.
- Kohn, L.M. (1979b). Delimitation of the economically important plant pathogenic *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 69(8):881-886.
- Koneman, E.W., S.D. Allen, V.R. Dowell and H.M. Sommers. (1985). *Diagnóstico microbiológico*. Editorial Médica Panamericana, México. p.533.
- López-Navarrete, J. y G. Virgen-Calleros. (1994). Antagonismo *in vitro* de *Bacillus subtilis* a *Fusarium oxysporum*, *Alternaria sp* y *Botrytis sp*. *Memorias XXI Congreso Nacional de Fitopatología*. Cuernavaca, Mor., México. p.43.
- Lumsden, R.D. and R.L. Dow. (1972). Histopathology of *Sclerotinia sclerotiorum* infection in bean. *Phytopathology* 63:708-715.
- Lumsden, R.D. (1979). Histology and physiology of pathogenesis in plant diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 69(8):890-895.
- Mac Faddin, J.F. (1984). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clinica*. Editorial Médica Panamericana, México. p.301.
- McKeen, C.D., C.C. Reilly and P.L. Pusey. (1986). Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 76:136-139.
- Mendoza, Z. C. (1993). *Diagnóstico de enfermedades fungosas*. Depto. de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. p. 168.
- Merriman, P.R. (1976). Survival of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 8:385-389.

- Merriman, P.R., M. Pywell, G. Harrison and J. Nancarrow. (1979). Survival of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* and effects of cultivation practices on disease. *Soil Biology and Biochemistry* 11:567-570.
- Michael, A.H. and P.E. Nelson. (1972). Antagonistic effect of soil bacteria on *Fusarium roseum* "Culmorum" from carnation. *Phytopathology* 62:1052-1056.
- Montoya-Angulo, S., F. Cebrenros-Sánchez y A. Carrillo-Facio. (1993). Evaluación de carbendazim, formulación flowable de carbendazim, para el control de enfermedades de frijol y fresa, bajo condiciones de campo. *Memorias XX Congreso Nacional de Fitopatología. Zacatecas, Zac. México.* p.21.
- Nelson, B.D., T.C. Helms and I. Kural. (1991). Effects of temperature and pathogen isolate on laboratory screening of soybean for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Science* 71: 347-352.
- Oedjijono, M.A. and C. Dragar. (1993). Isolation of bacteria antagonistic to a range of plant pathogenic fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 25(2):247-250.
- Olsen, C.M. and K.F. Baker. (1968). Selective heat treatment of soil, and its effect on the inhibition of *Rhizoctonia solani* by *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 58:79-87.
- Ortegón-Morales, A.S. (2002). Programa nacional de oleaginosas. Campo Experimental Río Bravo, INIFAP Tamaulipas, México. (INTERNET: www.inifap.conacyt.mx/progs_a/agricola/prog_oleaginosas.html).
- Ortiz-Pérez, R. (1985). Control biológico de la "pudrición blanca" del ajo (*Allium sativum* L.) causada por *Sclerotium cepivorum* Berk., por medio de *Sporidesmium sclerotivorum* Uecker, Ayers y Adams. Tesis Profesional. ENEP-Iztacala Universidad Nacional Autónoma de México. p. 41.
- Partyka, R.E. and W.F. Mai. (1962). Effects of environmental and some chemicals on *Sclerotinia sclerotiorum* in laboratory and potato field. *Phytopathology* 52(8):766-770.
- Pennypacker, B.W. and M.L. Risius. (1999). Environmental sensitivity of soybean cultivar response to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 89:618-622.
- Pereyra, V.R., F.J. Quiroz, A.R. Escande, M.V. Pedraza y C. Trogliá. (2002). Avances en el control integrado de la "Podredumbre Húmeda del Capitulo del Girasol" (*Sclerotinia sclerotiorum*). (INTERNET: www.inta.gov.ar/crbsass/balcarce/eventos/CGruesa2000/avancontinteg.htm).
- Prophyta. 2002. Contans WG prevents *Sclerotinia* disease.(INTERNET: www.prophyta.com/contans.htm1).

- Purdy, L.H. (1979). *Sclerotinia sclerotiorum*: History, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. *Phytopathology* 69(8):875-880.
- Radke, V.L. and C.R. Grau. (1986). Effects of herbicides on carpogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease* 70: 19-23.
- Reilly, C.G. and G.I. Lamoureux. (1981). The effects of the fungicide, iprodione on the mycelium of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 71(7):722-727.
- Riou, C., G. Freyssinet and M. Fevre. (1991). Production of cell wall-degrading enzymes by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Applied Environmental Microbiology* 57(5): 1478-1484.
- Romero, C.S. (1993). Hongos Fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo, 1ª. Reimpr., México. p.347.
- Schaad, N.W. (1988). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 2nd. Ed. APS Press. Minnesota, USA. pp.120-127.
- Schaad, N.W., J.B. Jones and W. Chun. (2001). Plant pathogenic bacteria. APS Press Third Ed., St. Paul Minnesota, USA. p.373.
- Seiler, G.J. (1992). Introduction The sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Field Crop Research* 30: 191-194.
- Tariq, V.N. and P. Jeffries. (1984). Appressorium formation by *Sclerotinia sclerotiorum* scanning electron microscopy. *Transactions of the British Mycological Society* 82(4):645-651.
- Teo, B.K., R.A.A. Morrall and P.R. Verma. (1989). Influence of soil moisture, seeding date, and canola cultivars (Tobin and Westar) on the germination and rotting of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal Plant Pathology* 11(4):393-399.
- Trutmann, P. and P.J. Keane. (1990). *Trichoderma koningii* as a biological control agent for *Sclerotinia sclerotiorum* in Southern Australia. *Soil Biology and Biochemistry* 22(1):43-50.
- Tu, J.C.(1980). *Gliocladium virens*, a destructive mycoparasite of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 70:670-674 .
- Ulloa, M. y R.T. Hanlin. (1978). Atlas de micología básica. Edit. Concepto, México. p.158.
- Utkhede, R.S. and J.E. Rahe. (1980). Biological control of onion white rot. *Soil Biology and Biochemistry* 12:101-104.
- Utkhede, R.S. and J.E. Rahe. (1983). Interactions of antagonist and pathogen in biological control of onion white rot. *Phytopathology* 73(6):890-893.

- Vega-Muñoz, R., J.A. Escalante, P. Sánchez, C. Ramírez y E. Cuenca. (2001). Asignación de biomasa y rendimiento de girasol con relación al nitrógeno y densidad de población. *Terra* 19(1):75-81.
- Velázquez-Cágal, M. (2002). Academia Cultivos Básicos. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. México. (Comunicación personal).
- Weiss, A., L.E. Hippias, B.L. Blas and J.R. Steadman. (1980). Comparison of within-canopy microclimate and white mold disease (*Sclerotinia sclerotiorum*) development in dry edible beans as influenced by canopy structure and irrigation. *Agricultural Meteorology* 22:11-21.
- Wells H.D., D.K. Bell and C.A. Jaworski. (1972). Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 62:442-447.
- Whipps, J.M., S.P. Budge and M.P. Mc. Quilken. (1992). Use of *Coniothyrium minitans* and *Pythium oligandrum* as disease biocontrol agents. *Phytoparasitica* 20:107-111.
- Wolf, J. and A.N. Barker. (1968). The genus *Bacillus*: Aids to the identification of its species, pp.93-109. In: Gibbs, B.M. and Shapton, D.A. (eds.), Identification methods for microbiologists, part B. Academic Press. New York, USA. pp. 93-109.
- Yarden, O., Y. Ben-Yephet, J. Katan and N. Aharonson. (1986). Fungicidal control of *Sclerotinia sclerotiorum* in soil with a combination of benomyl and thiram. *Plant Disease* 70:738-742.
- Zizzerini, A. and L. Tosi. (1985). Antagonistic activity of fungi isolated from sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology* 34:415-421.
- Zizzerini, A., L. Tosi and J. Rossi. (1987). Antagonistic effects of *Bacillus* spp. on *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia. *Phytopathology Medit.* 26:185-187.

APÉNDICE I

MEDIOS DE CULTIVO

Medios de cultivo sólidos:

Medio BK

Proteosa-peptona #3.....	20 g
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	1.5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.5 g
Agar.....	15 g
Glicerol.....	15 ml
Agua destilada.....	1000 ml

Medio CPG

Glucosa.....	10 g
Bacto-peptona.....	10 g
Casaaminoácido.....	1 g
Agar.....	18 g
Agua destilada.....	1000 ml

Medio EMA

Extracto de malta.....	20 g
Peptona.....	1 g
Dextrosa.....	20 g
Agar.....	20 g
Agua destilada.....	1000 ml

Medio NBY

Caldo nutritivo.....	8 g
Extracto de levadura.....	2 g
K_2HPO_4	2 g
KH_2PO_4	0.5 g
Glucosa.....	2.5 g
Agar.....	15 g
Agua destilada.....	1000 ml

Medio PDA

Trozos de papa pelada.....200 g
Dextrosa.....20 g
Agar.....15 g
Agua destilada.....1000 ml

Medio V-8A

Jugo V-8.....180 ml
CaCO₃.....2 g
Agar.....20 g
Agua destilada aforar a1000 ml

Medios de cultivo líquidos:**Medio PD**

Trozos de papa pelada.....200 g
Dextrosa.....20 g
Agua destilada.....1000 ml

APÉNDICE 2

Reactivos, soluciones y medios para la identificación de las cepas bacterianas

Medio Agar-almidón

Papas peladas.....	250 g
Almidón.....	10 g
Agar.....	20 g
Agua destilada.....	1000 ml

Crecimiento anaeróbico en caldo glucosado

Medio caldo-glucosado

Caldo nutritivo.....	95 ml
Glucosa 20%.....	5 ml

Crecimiento en NaCl 3% y NaCl 7%

Caldo nutritivo.....	0.8 g
NaCl.....	3 g
Agua destilada	100 ml

Caldo nutritivo.....	0.8 g
NaCl.....	7 g
Agua destilada.....	100 ml

Medio de Hugh y Leifson (OF)

Peptona.....	0.2 g
Glucosa.....	1 g
Azul de bromotimol.....	0.003 g
Agar.....	0.25 g
NaCl.....	0.5 g
Fosfato dipotásico.....	0.03 g
Agua destilada c.s.p.....	100 ml

La glucosa (1g) se disuelve en 20 ml de agua destilada y se agrega al resto del medio estéril (disuelto en 80 ml de agua) utilizando una jeringa y filtro milipore 25 mm en condiciones de esterilidad.

Leche tornasolada (Litmus):

Leche descremada (10%).....	100 g
Tornasol azul.....	0.75 g
Agua destilada.....	1000 ml

Púrpura de bromocresol sol. 0.2%.....	1 ml
Leche descremada 10%.....	100 ml

Esterilizar a 10 lb por 10 min

Para preparar sol 0.2% de púrpura de bromocresol.

Púrpura de bromocresol.....	0.2 g
H ₂ O.....	50 ml
Metanol.....	50 ml

Posición de la endospora

Verde de malaquita 5%.....	10 min
Safranina sol. acuosa 0.5%.....	15 seg

Producción de ácidos a partir de carbohidratos:**Caldo Rojo Fenol**

Base de caldo rojo fenol.....3 g
 Agua destilada.....200 ml

Vaciar en 5 matraces, 40 ml de caldo rojo fenol y esterilizar a 15 libras por 15 minutos. Por otra parte, preparar 10 ml de solución azucarada al 1% de cada carbohidrato por probar y pasar por filtro milipore. Vaciar las soluciones azucaradas en los respectivos matraces en condiciones de esterilidad.

Los 50 ml de la solución final (40 ml del caldo rojo fenol estéril más los 10 ml de cada solución azucarada) repartir en tubos de ensaye estériles con campanas de Durham.

Para cada azúcar, preparar 3 tubos (tubo testigo, con aceite y sin aceite mineral) con tres repeticiones cada uno.

Reducción de nitratos

Extracto de carne.....3 g
 Bactopeptona.....5 g
 KNO₃1 g
 Agua destilada.....1000 ml

Reactivo A

Alfa-naftilamina.....5 g
 Acido acético 5N 30%.....1000 ml

Reactivo B

Ácido sulfanílico.....8 g
 Acido acético 5N 30%.....1000 ml

Tinción de Gram**Diferenciar bacterias Gram + de Gram -****Soluciones:****Cristal violeta:****Solución A**

Cristal violeta.....2 g
 Alcohol etílico 95%.....20 ml

Solución B

Oxalato de amonio.....0.8 g
 Agua destilada.....80 ml

Mezclar las soluciones A y B. Almacenar por 24 horas antes de su uso. Filtrar y vaciar en frasco ámbar.

Lugol:

Yodo..... 1.0 g
 Ioduro de potasio.....2.0 g
 Agua destilada.....100 ml
 Alcohol-acetona:

Alcohol etílico 95%..... 100 ml
 Acetona.....100 ml

Colorante de contraste:**Solución stock**

Safranina O.....2.5 g
 Alcohol etílico 95%.....100 ml

Solución de trabajo

Solución stock..... 10 ml
 Agua destilada.....90 ml

Utilización del citrato**Medio de Citrato de Simmons**

Fosfato diácido de amonio.....	1 g
Fosfato dipotásico.....	1 g
NaCl.....	5 g
Citrato de sodio.....	2 g
Sulfato de magnesio.....	0.20 g
Agar.....	15 g
Azul de bromotimol.....	0.08 g
Agua destilada.....	1000 ml

Medio de Voges-Proskahuer

Polipeptona.....	7 g
Glucosa.....	5 g
Fosfato dipotásico.....	5 g
Agua destilada.....	1000 ml

Reactivo 1

Alfa naftol 5%.....	5 g
Alcohol etílico absoluto.....	100 ml

Reactivo 2

KOH (40%).....	40 g
Agua destilada.....	100 ml

APÉNDICE 3

Escala de Mac Farland para la preparación de suspensiones bacterianas.

TUBO	BaCl ₂ 1% (ml)	H ₂ SO ₄ 1% (ml)	Bacterias/ml
1	0.01	9.99	3.0×10^7
2	0.05	9.95	1.5×10^8
3	0.10	9.90	3.0×10^8
4	0.15	9.85	4.5×10^8
5	0.20	9.80	6.0×10^8
6	0.30	9.70	9.0×10^8
7	0.40	9.60	1.2×10^9

La turbidez de la solución formada por la mezcla de los reactivos en cada tubo, es comparable con la que presentan las bacterias en suspensión. La escala de Mac Farland es entonces, un sistema indirecto y semicuantitativo que permite determinar aproximadamente la concentración de bacterias en suspensión.

APÉNDICE 4

ANÁLISIS DE VARIANZA (ANDEVA) PARA LOS HALOS DE INHIBICIÓN.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	Valor F	Nivel de Significancia P
Efectos principales					
Cepa	1.6081333	2	0.8040667	48.699	<0.0001
Tiempo	2.3409333	2	1.1704667	70.890	<0.0001
Interacciones					
Cepa X Tiempo	0.6681333	4	0.1670333	10.116	0.0022
Residual	0.1486000	9	0.0165111		
Total (corregido)	4.7658000	17			

APÉNDICE 5

5a. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANDEVA) PARA LOS ESCLEROCIOS COMO INÓCULO.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	Valor F	Nivel de Significancia P
Efectos principales					
Tiempo	5.307	3	1.769	24.496	<0.001
Cepa	0.094	2	0.047	0.650	0.531
Interacciones					
Tiempo X Cepa	0.628	6	0.105	1.450	0.237
Error	1.733	24	0.072		

5b. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANDEVA) PARA EL MICELIO COMO INÓCULO.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	Valor F	Nivel de Significancia P
Efectos principales					
Tiempo	63.527	3	21.175	614.782	<0.0001
Cepa	0.410	2	0.205	5.960	0.0079
Interacciones					
Tiempo X Cepa	1.085	6	0.180	5.250	0.0014
Error	0.826	24	0.034		

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

APÉNDICE 6

ANÁLISIS DE VARIANZA (ANDEVA) PARA LOS ESCLEROCIOS Y MICELIO COMO INÓCULOS.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	Valor F	Nivel de Significancia P
Efectos principales					
Tratamiento	70.04167	1	70.041667	1751.042	<0.0001
Cepa	0.31000	2	0.155000	3.875	0.0224
Tiempo	153.39000	3	51.130000	1278.250	<0.0001
Interacciones					
Tratamiento X Cepa	1.203333	2	0.601667	15.042	<0.0001
Tratamiento X Tiempo	53.15000	3	17.705000	442.625	<0.0001
Cepa X Tiempo	1.590000	6	0.265000	6.625	<0.0001
TratamientoXCepaXTiempo	3.550000	6	0.591667	14.792	<0.0001
Residual	7.6800000	192	0.400000		
Total (corregido)	290.88000	215			

APÉNDICE 7

ANÁLISIS DE VARIANZA (ANDEVA) PARA LOS EXTRACTOS BACTERIANOS.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	Valor F	Nivel de Significancia P
Principales efectos					
Cepa	571.37444	3	190.45815	106.674	<0.0001
Concentración	52.70222	1	52.70222	29.518	<0.0001
Tiempo	167.68750	2	83.84375	46.960	<0.0001
Interacciones					
Cepa X Concentración	42.82778	3	14.275926	7.996	0.0002
Cepa X Tiempo	105.39139	6	17.565231	9.838	<0.0001
Concentración X Tiempo	10.34194	2	5.170972	2.896	0.0649
Cepa X Conc. X Tiempo	35.57472	6	5.929120	3.321	0.0081
Residual	85.700000	48	1.7854167		
Total (corregido)	1071.6000	71			

APÉNDICE 8

ANÁLISIS DE VARIANZA (ANDEVA) PARA LA GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE GIRASOL.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	Valor F	Nivel de Significancia P
Efectos principales					
Inóculo <i>Sclerotinia</i>	0.049	1	0.049	2.73	0.108
Cepa <i>Bacillus</i>	0.087	3	0.029	1.61	0.206
Interacciones					
Inóculo X Cepa	0.0216	3	0.007	0.397	0.756
Residual	0.5790	32	0.018		