

ESTUDIOS RELACIONADOS CON EL USO DEL *BACILLUS SUBTILIS* EN EL CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS.

Juan José Castellanos Linares, Leanne Ortiz Guilián, Pedro Oliva, J. Miguel Dueñas, José Fresneda Buides, Sahily Fraga Ruíz y Odalys Meléndez Ferrer.

Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT)
Calle 2 esq. 1 Santiago de las Vegas, Ciudad de La Habana, Cuba, CP 17200.
Email: juanc@inifat.co.cu

RESUMEN

Las propiedades antagónicas del Género *Bacillus* han sido utilizadas como vía para el control de enfermedades, disminuyendo los riesgos de contaminación del medio ambiente ocasionado por el uso indiscriminado de productos químicos. El *Bacillus subtilis* considerada entre las bacterias esporuladas más importante en lo que se refiere a la producción de sustancias antibióticas y dada su difusión en la naturaleza, proporciona un interés creciente en cuanto a su estudio y utilización. Se realizaron investigaciones durante varios años con una cepa *Bacillus subtilis* aislada en el INIFAT, obteniéndose la formulación de un medio de cultivo alternativo de mayor factibilidad económica para el desarrollo de una tecnología de producción artesanal. Se muestra la capacidad de inhibición del crecimiento micelial producida por la solución bacteriana a más de 20 especies de hongos de importancia económica, pertenecientes a 17 géneros, lo que evidencia su amplio rango de acción, así como, su utilización en el control de *Alternaria porri* en cebolla permitiendo la sustitución de las aplicaciones químicas por las del biocontrol.

Palabras claves: control biológico, *Bacillus subtilis*, agricultura orgánica, hongos fitopatógenos.

STUDIES RELATED TO *BACILLUS SUBTILIS* USE FOR CONTROL OF PHYTOPATHOGENIC FUNGY.

ABSTRACT

Bacillus genus antagonistic properties have been largely used as a mean for diseases control, diminishing environmental contamination risks caused by indiscriminated employment of chemicals. *Bacillus subtilis* is esteemed the most important between sporulated bacteria, provided its antibiotics productions and because of the ample diffusion it has in the nature there is a growing interest as for its study and use. During several years studies have been carried out with a strain of *Bacillus subtilis* isolated un INIFAT areas, being obtained a formulation of an alternative media with better economic feasibility for the development an artisan production. It is shown mycelial growth inhibition capacity that have been reached by the bacterial solution against more than 20 fungus species of economic importance, belonging to 17 genera, what brings evidences of the wide range of action, as soon as its use for *Alternaria porri* control in onion culture, making possible the replacement of chemical applications by the biocontrol.

Key words: biological control, *Bacillus subtilis*, organic agriculture, phytopathogenic fungus.

INTRODUCCION

Las enfermedades de las plantas, constituyen desde hace muchos años, una preocupación para el hombre en su búsqueda por adquirir mayores rendimientos por área, y hoy la situación mundial se torna más difícil ya que por una parte, la población aumenta, los rendimientos mundiales no siguen a ese ritmo de crecimiento y cada día se hace más nocivo al ecosistema la utilización de los productos químicos, por lo que cobra gran interés el uso de los controles biológicos dentro del programa de lucha integrada con vistas a contrarrestar en todo lo posible, la influencia negativa de las enfermedades.

En ese sentido numerosos investigadores han dedicado sus esfuerzos a la búsqueda de controles biológicos y el género **Bacillus** constituye una de las vías en ese objetivo.

Vidaurre y Campòs (2003) elaboraron un medio de cultivo para la producción de **B. subtilis** al cual utilizaron como antagonista de los hongos fitopatógenos **Sclerotinia, Colletotrichum, Botrytis, Fusarium moniliforme y Penicillium**; Dunleavy (1955) trabajó sobre el control del Damping-off en remolacha azucarera por el **B. subtilis**, Hajrston **et al.** (1975) aplicaron tratamiento a la semilla de maíz para contrarrestar la infección en la raíz de ese cereal, Baker **et al.** (1983) se refirió al efecto inhibitorio de **B. subtilis** sobre **Uromyces phaseoli** y sobre el desarrollo de las pústulas de la roya en las hojas de frijol; 2 años antes había determinado un patovar de **B. subtilis** denominado APPL-1 cuyo extracto purificado fue establecido como un control eficaz para inhibir a la roya sobre la planta de frijol. Pusey **et al.** (1988) elaboraron una guía para comercializar la producción de **B. subtilis** en el control post cosecha de la pudrición parda (**Monilia fructicola**) del melocotón y Harvas **et al.** (1998) demostraron la efectividad de **B. subtilis** en la inhibición de la enfermedad causada por **Fusarium oxysporum** f.sp. **ciceris** en garbanzo y Solis y Ramos (2003) realizaron estudios para el control de **Fusarium oxysporum** en arveja china.

Muchas otras informaciones existen en cuanto a la utilización del **B. subtilis** para el control de enfermedades fungosas y bacterianas entre las que se pueden citar a Sendín **et al.** (1990) en el control de la pústula bacteriana de la roya, Oliva **et al.** (1985) sobre el antagonismo del **B. subtilis** frente a diferentes patógenos de la semilla, Castellanos **et al.** (1995) se refirieron a la inhibición presentada por el **B. subtilis** a patógenos de los géneros: **Alternaria, Phytophthora, Fusarium, Colletotrichum, Cercospora y Curvularia**.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la posibilidad de obtener un medio de cultivo factible para el desarrollo del biocontrol **B. subtilis** y demostrar sus potencialidades frente a diferentes hongos fitopatógenos bajo condiciones "in vitro" y "en vivo" contra la **Alternaria porri** en el cultivo de la cebolla.

MATERIALES Y METODOS

1. Almacenamiento y efectividad de **Bacillus subtilis**.

En el trabajo se realizaron 5 medios de cultivo para producir y comparar la efectividad de la solución bacteriana del **B. subtilis** (B_s) frente a 6 patógenos,

dichos medios fueron: Extracto del Malta (EM), Caldo de Malta, primer mosto (CM₁), Caldo para Malta, residuales (CM₂), Medio (B) y Medio (Bg), en estado líquido.

Todos los medios incluidos en cada prueba, fueron inoculados con 1 ml. del preinóculo de **B. subtilis** y expuestos según correspondió a períodos de 5, 15, 20, 25 y 30 días, excepto un recipiente que se mantuvo durante 2 años, 3 meses y 20 días en el medio CM₁, bajo condiciones de temperatura ambiente en el laboratorio y fermentación estática.

Posteriormente se mezcló por separado, 4 ml de cada una de las soluciones bacterianas del **B. subtilis** obtenidas en los diferentes medios con 16 ml de Czapek y vertido en placas de petri grandes (140 mm de diámetro) a las que se le marcaron 4 circunferencia (55 mm de diámetro) que constituyeron las réplicas y en el centro de cada circunferencia, se depositó un disco de 7 mm de diámetro de cada uno de los patógenos en estudio; el testigo se montó con igual técnica, sobre medio de Czapek, las mediciones se realizaron a los 4 y 7 días de la siembra.

Los patógenos fueron: **Alternaria porri**, **Pyrenochaeta terrestris**, **Fusarium sp.**, **Fusarium moniliforme**, aislados de cebolla y **Alternaria solani**, **Stemphylium solani**, **Dydimella lycopersici** y **Phytophthora infestans**, aislados de tomate.

2. Posibilidades de uso de **B. subtilis**, control biológico de hongos.

Se obtuvieron aislados de hongos de diferentes cultivos hortícolas y del Cepario y Archivo Sintomatológico del INIFAT (Tabla 1), se sembraron por separado en placas madres con medio Czapek, a partir de ahí se tomaron discos de micelio de cada hongo y se sembraron a razón de 5 placas que contenían medio Czapek (testigo) y la mezcla de medio Czapek más el 20% del biocontrol del **B. subtilis**, el cual fue obtenido inoculando la bacteria en medio líquido B. El crecimiento micelial de los hongos se desarrolló a temperatura ambiente y se midió el mismo a los 7 días de la siembra. El porcentaje de inhibición producido por **B. subtilis** se calculó por regla de tres y diferencia del total. La escala de grados utilizada para evaluar la inhibición fue la siguiente: del 1-25%, baja, del 26-50%, regular, del 51-80%, buena, del 81-90%, muy buena y del 91-100%, excelente.

3. Control de **B. subtilis** frente a la raíz rosada producida por **Pyrenochaeta terrestris**.

Se obtuvieron las soluciones bacterianas del **B. subtilis** en medio líquido B y Caldo de malta industrial, primer mosto, bajo condiciones ambientales del laboratorio y fermentación estática. Luego se mezclaron por separado con medio Czapek y se vertieron en placas Petri siguiendo la técnica descrita anteriormente y una vez solidificados, se depositaron discos de micelio del patógeno **Pyrenochaeta terrestris**. La solución bacteriana obtenida en el medio líquido de caldo de malta, primer mosto (CM₁) tenía más de 2 años y las de medio B, 2 meses (B-2) y 5 días (B-3), respectivamente. El crecimiento micelial se midió cada 24 horas y por regla de tres se determinó el porcentaje de crecimiento y por diferencias obtuvimos el porcentaje de control ejercido.

Para la prueba de campo, se dividió un cantero en 3 parcelas de 10 m de largo y en cada una de ellas se hicieron 4 repeticiones. Todas las plantas, excepto en la parcela testigo, fueron aplicadas con una de las 2 soluciones del **Bacillus subtilis**, BS-2 (**B. subtilis** al 20%) y BS-4 (**B. subtilis** al 40%). Se evaluaron 50 plantas por réplica comparándose los resultados con el de la parcela testigo.

4. Sustitución de un fungicida sistémico por *B. subtilis* en el control de *Alternaria porri* en cebolla.

En áreas del INIFAT se montaron los experimentos de campo durante 3 campañas, utilizándose un diseño de bloques al azar con 4 repeticiones y 7 tratamientos. La variedad de cebolla utilizada fue la White Mageli. Se efectuaron 9 aplicaciones con una frecuencia de 7 días entre ellas y se hicieron 4 evaluaciones.

Los tratamientos utilizados (Tabla 2) se basaron en los fungicidas: Zineb PH 80% (Zn), Oxiclورو de cobre PH 50% (OCu) a raíz de 1.5 kg i.a/ha y Score 250 EC (Sc) a 0.5 l/ha. y el biofungicida bacteriano obtenido al inocular la bacteria en medio líquido de caldo de malta o en medio B al igual que en los anteriores trabajos.

Tabla 2. Comportamiento de los tratamientos empleados.

Tratamiento	Aplicaciones cada 7 días								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	OCu	Zn	OCu	Sc	OCu	Zn	OCu	Sc	OCu
2	Sc	OCu	Zn	Sc	OCu	Zn	Sc	OCu	Zn
3	OCu	Zn	OCu	Bs	OCu	Zn	OCu	Bs	OCu
4	Bs	OCu	Zn	Bs	OCu	Zn	Bs	OCu	Zn
5	Bs	Bs	Bs	Bs	Bs	Bs	Bs	Bs	Bs
6	OCu	Zn	OCu	Zn	OCu	Zn	OCu	Zn	OCu
7	testigo								

Se utilizó una escala de 5 grados para la evaluación del desarrollo de la enfermedad., los índices de infección se determinaron a través de la fórmula de Townsend y Heuberger (1943). Los resultados finales fueron analizados de acuerdo a la prueba de Newman Keuls al 5% de significación.

RESULTADOS Y DISCUSION.

1. Almacenamiento y efectividad de *Bacillus subtilis*.

Al analizar los resultados de la prueba efectuada a los 5 días de fermentación estática (Tabla 3), apreciamos que la solución bacteriana procedente de los medios líquidos de Extracto de Malta (EM) y (B) efectuaron un control de bueno – muy bueno sobre *A. solani* (78.83–88.08 % y 73.53–83.38%) a los 4 y 7 días respectivamente, muy bueno en el caso de la *A. porri* (84.86–87.69% y 88.74–89.31%) respectivamente; de muy bueno a excelente contra la *P. terrestris* (81.97–91.95% y 88.24–94.38%) respectivamente y excelente contra *D. Lycopersici* (95.70-100% y 99.24-100%) y *P. infestans* (97-94% y 100-97%) respectivamente, notándose una ligera tendencia a un mayor control, cuando la solución bacteriana proviene del medio líquido B, lo que unido a la mayor factibilidad de obtener esa materia prima, más su bajo costo y a la posibilidad de ahorrar divisas, al no tener que comprar el Extracto de Malta, nos inclina a preferir dicho medio de B, así como

reconocer que a los 5 días de inoculado el medio, la solución bacteriana, está en condiciones de ejercer un positivo efecto sobre los patógenos evaluados.

Tabla 3. Efectividad del *Bacillus subtilis* a los 5 días de inoculados los medios.

Patógeno y medición	czapek		medio em			medio b		
	x control (%)	crec.mic (%)	x	crec.mic (%)	control (%)	x	crec.mic (%)	control (%)
A. Porri 4 ^{to} día 7 ^{mo} día	25.75	100	3.9	15.44	84.86	2.9	11.26	88.74
	-	-	(MB)	-	-	(MB)	-	-
	46.75	100	58	72.40	87.69	5.0	10.69	89.31
	-	-	(MB)	-	-	(MB)	-	-
P. terrestris 4 ^{to} día 7 ^{mo} día	12.75	100	2.3	18.03	81.97	1.5	11.76	88.24
	-	-	(MB)	-	-	(MB)	-	-
	32.0	100	2.8	8.75	91.95	1.8	5.60	94.38
	-	-	(E)	-	-	(E)	-	-
A. solani 4 ^{to} día 7 ^{mo} día	17	100	3.6	21.17	78.83	4.5	20.47	73.53
	-	-	(B)	-	-	(B)	-	-
	38.5	100	6.9	17.92	88.08	6.4	16.62	83.38
	-	-	(MB)	-	-	(MB)	-	-
D. lycopersici 4 ^{to} día 7 ^{mo} día	10.75	100	0	0	100 (E)	0	0	100 (E)
	-	-	1.4	4.3	95.70	0.25	0.76	99.24
	32.5	100	(E)	-	-	(E)	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	
P. infestans 4 ^{to} día 7 ^{mo} día	3.75	100	0.1	2.66	97.34	0	0	100
	-	-	(E)	-	-	(E)	-	-
	9	100	0.5	5.55	94.45	0.2	2.72	97.78
	-	-	(E)	-	-	(E)	-	-

La tabla 4, en la que se registran los datos sobre el crecimiento micelial de *A. porri* y los porcentajes de control sobre ella en los diferentes medios en los que se desarrolló el *B. subtilis*, bajo condiciones ambientales de almacenamiento y fermentación estática, permite señalar que en sentido general la solución bacteriana fue más efectiva en la medida que permaneció mayor tiempo de exposición en el medio, excepto en el caso del medio Bg, a los 25 días en el que se detectó un ligero crecimiento micelial a los 7 días de la siembra.

Tabla 4. Actividad inhibitoria de la solución bacteriana del **B. subtilis** frente a **Alternaria porri** en diferentes tiempos de almacenamiento.

Tiempo de almacenamiento y mediciones	MEDIO EM		MEDIO B		MEDIO Bg		MEDIO CM ₂	
	X Crec Control %	%	X Crec Control %	%	X Crec Control %	%	X Crec Control %	%
30 días								
4to día	0	0	-	-	0	0	-	-
7mo día	100(E)		-	-	100(E)		-	-
	0	0			0	0		
	100(E)				100(E)			
25 días								
4to día	0	0	0	0	0	0	0	0
7mo día	100(E)		100(E)		100(E)		100(E)	
	0	0	0	0	0.25	0.5	0	0
	100(E)		100(E)		99.4(E)		100(E)	
20 días								
4to día	0	0	0	0	0	0	0	0
7mo día	100(E)		100(E)		100(E)		100(E)	
	0	0	0	0	0	0	0	0
	100(E)		100(E)		100(E)		100(E)	
15 días								
4to día	0	0	0.25	0.7	0	0	1	2.81
7mo día	100(E)		99.3(E)		100(E)		97.1(E)	
	0	0	0.25	0.5	0	0	2.12	4.77
	100(E)		99.4(E)		100(E)		95.2(E)	

El control ejercido por las soluciones en los medios EM, B, Bg, y CM₂, fue excelente hasta el séptimo día de la evaluación realizada, lo que manifiesta la posibilidad del uso de ellas, como variante para el desarrollo de **B. subtilis**, con el objetivo de sustituir el uso del Extracto de Malta (área dólar) por otro medio, cuyos resultados no disten mucho de éste, y en ese caso por los resultados alcanzados, la posibilidad de contar con la materia prima y fácil elaboración a bajo o ningún costo seleccionamos al medio de B.

La efectividad y potencialidad de la solución bacteriana del **B. subtilis** sometido a un mayor tiempo de almacenamiento se puede ver en la tabla 5, en la que se refleja buen control frente a **Fusarium. sp** a los 7 días (78.1%); muy buen control contra **F. moniliforme** (88.61%) y **S. solani** (87.52%) y excelente frente a **A. porri** (91.54%) y **D. lycopersici** (100%) que fueron las más afectadas en su crecimiento micelial. Lo antes planteado permite indicar, que la solución bacteriana, se mantuvo en buen estado al cabo de más de 2 años de almacenamiento bajo condiciones de laboratorio, ejerciendo un control evaluado como de bueno a excelente, frente a patógenos de importancia económica.

2. Posibilidades de uso de **B. subtilis**, control biológico de hongos.

Como puede apreciarse en la tabla 6, acorde con la escala propuesta, la inhibición frente a los hongos: **C. lunata**, **C. dematium**, **T. roseum**, **D. lycopersici**, **P.**

infestans, **Fusarium sp** (arroz), **P. terrestres** y **Fusarium sp** (soya), fue excelente, ya que su porcentaje estuvo entre 91 y 100%; inclusive frente a hongos de importancia económica.

De muy buena (81-90%) se observó la actividad frente a **A. porri**, **F. moniliforme**, **S. solani**, **C sp.** y **A. solani**, grupo en que también figuran hongos de importancia por su afectación en diferentes cultivos.

El crecimiento micelial de **F. sp.**, **T. padwick**, **B. theobromae**, **C. sp.**, **D. oryzae** y **P. sojiae**, se vio también limitado por una buena inhibición (51-80%) del **B. subtilis**, quien fue menos efectivo por debajo del 50% frente a **G. sp.**

3. Control de **B. subtilis** frente a la raíz rosada producida por **Pyrenochaeta terrestris**.

Como puede apreciarse en la tabla 7, en todos los casos se limitó el crecimiento micelial del hongo de forma considerable, al utilizar las soluciones del **B. subtilis** independientemente del tiempo de fermentación de la misma, lo que se corresponde con los menores porcentajes de crecimiento al compararlos con el testigo en las primeras 24 horas posteriores a la siembra el crecimiento fue cero, comenzando de manera limitada a partir de las 48 horas. Los porcentajes de crecimiento y control que se establecieron desde el principio, los cuales estuvieron entre el 79.6, terminando a las 144 horas con un porcentaje de control entre el 89 y 97%. Ese resultado se corrobora al observar que todas las soluciones, independientemente del tiempo de fermentación estática que se sometieron, controlaron el crecimiento micelial de la **Pyrenochaeta terrestris**, patógeno de consideración en los cultivos del ajo y la cebolla en Cuba y otros países de América Latina.

En la tabla 8 se observa que con el tratamiento BS-2 se encontraron 124 plantas enfermas y 76 sanas, lo que representa al 62 y 38% respectivamente, mientras que el tratamiento BS-4, resultó más eficiente al registrar menos plantas enfermas (74) y muchas más plantas sanas (126), es decir, el 37 y 63% respectivamente, lo que plantea que ambos tratamientos ejercieron control al compararlo con el testigo donde se muestra un 98,5% de plantas enfermas y 1,5% de plantas sanas, siendo el tratamiento BS-4 el que ejerció mayor control frente a esta enfermedad de gran importancia en los cultivos de ajo y cebolla.

4. Sustitución de un fungicida sistémico por **B. subtilis** en el control de **Alternaria porri** en cebolla.

El análisis de la efectividad de los tratamientos (tabla 9), nos indica que invariablemente el tercer y cuarto, cuya formación básica está dada por las aplicaciones alternas de Oxiclورو de cobre (OCu) y el Zineb (Zn) con la solución bacteriana de **B. subtilis** (Bs) fueron las que alcanzaron los valores medios de infección más bajos, es decir, los que permitieron el menor desarrollo de la enfermedad, difiriendo significativamente del resto de los tratamientos, lo que indica que la acción inhibitoria del **B. subtilis** combinado con el Oxiclورو de cobre y el Zineb, fue más eficiente, incluso que los tratamientos 1 y 2, en los que se alterna con el producto sistémico llamado Score (Sc), recomendado para su uso contra el patógeno en estudio.

En la tabla 10 se muestra el resultado del tercer año de evaluación, en el cual se utilizó la solución bacteriana obtenida en medio líquido boniato en lugar del caldo de malta, pudiéndose corroborar los resultados antes analizados, que los tratamientos 3 y 4 difieren significativamente del resto, lo que permite indicar que el uso del medio de B es más barato y factible, ampliando su posibilidad de empleo de este biocontrol en la lucha contra *Alternaria porri*, sustituyendo las aplicaciones del fungicida sistémico Score producto de alto precio en el mercado internacional, por las del *B. subtilis*, lo que permitirá un ahorro de divisas, un buen control de la enfermedad y menor riesgo de contaminación ambiental.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

- Se pudo apreciar que desde los 5 días y hasta los 2 años y 3 meses de almacenamiento, la solución bacteriana correspondiente que se obtuvo en los diferentes medios probados, fue efectiva en la inhibición del crecimiento micelial de los patógenos: *Alternaria porri*, *Pyrenochaeta terrestris*, *Fusarium sp.*, *Fusarium moniliforme*, *Stemphyllium solani*, *Alternaria solani*, *Dydimella lycopersici* y *P. infestans*, todos de importancia económica.
- La utilización del medio B para la obtención de la solución bacteriana de *Bacillus subtilis* resultó adecuada, más barata y factible, ampliándose las posibilidades del uso de este biocontrol.
- *Bacillus subtilis* evidenció tener un alto potencial y espectro de acción “*in vitro*” como biocontrol de patógenos que afectan tanto a la parte del cultivo bajo tierra como al área, en semilleros y/o plantación: *Alternaria porri* (84-100%), *Pyrenochaeta terrestris* (81-94%), *Fusarium sp.* (85-88%), *Fusarium moniliforme* (71-78%), *Alternaria solani* (73-93%), *Stemphyllium solani* (80-89%), *Dydimella lycopersici* (94-100%) y *P. infestans* (90-100%).
- La solución del *Bacillus subtilis* limitó considerablemente el crecimiento micelial del patógeno *Pyrenochaeta terrestris*.
- Todas las soluciones del *Bacillus subtilis*, independientemente del tiempo de fermentación estática ejercieron control entre el 97 y 89 %, lo que demuestra su potencialidad como control biológico del patógeno *Pyrenochaeta terrestris*.
- Los tratamientos donde se alternaba la aplicación de Oxiclورو de cobre y Zineb con el *Bacillus subtilis* fueron los más efectivos para el control del patógeno *Alternaria porri* (Ell) Cif., los cuales difirieron significativamente de los otros.
- Es posible sustituir las aplicaciones de Score por las de *Bacillus subtilis* con el consiguiente ahorro de divisas, buen control de la enfermedad y menor riesgo de contaminación ambiental.

Se recomienda continuar explotando la potencialidad de este biocontrol, para su posterior utilización como alternativa del control integrado de las enfermedades, así como llevar a la práctica agrícola la fermentación estática bajo condiciones de

temperatura e iluminación ambiental, con el medio líquido de B por lo efectivo y económico que es, al menos a nivel local.

Debe probarse la efectividad de la combinación *B. subtilis* alterno con Oxiclورو de cobre y Zineb, en áreas de producción de cebolla de mayor extensión.

REFERENCIAS

- Baker, C. J.; Staveli, J. R.; Thomas, C. A.; Saser, M. Y Machall, J. S. (1983).** Inhibitory effects of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules of bean leaves. *Phytopathology*, vol 73 (8): 1148-1152.
- Castellanos Linares, J. J.; Oliva Rodríguez, P.; Izquierdo González, E.; Morales González, M. (1995).** Control de diferentes hongos por medio de *Bacillus subtilis*. Resultados de Investigación Científica INIFAT.
- Dunleavy, J.; (1985).** Control of damping-off of sugar but by *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 45: 252-258.
- Hairston William, G., Arthur Kaven, S. y Rosa Fred, C. (1975).** Biocontrol of corn root infection in the field by seed treatment antagonist. *Phytopathology* 65 (3): 296-300.
- Harvas, A.; Landa, B.; Datroff, L. E.; Jimenez Díaz, R. M. (1998).** Effects of comercial and indigenosus microorganisms on *Fusarium* wilt development in chickpea. *Biological control:Theory and applications in pest management (USA)*. Nov. 13 (3): 166-176.
- Oliva, P.; Fresneda, J.; Marrero, A.; Camacho, J. L.; Morales, N. (1985).** Antagonismo de *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn frente a algunos patógenos de semilla. Resumen Jornada Científica 20 años de Colaboración Cuba- RDA, INIFAT; ciudad de la Habana, Cuba, Pag. 10.
- Peréz Sendin, M. A.; Marrero terán, A., Martínez Viera; R.; González Moralez, N. (1988).** Control de la pústula bacteriana de la soya con un extracto bacteriano. *Cien. Agri.* 40: 31-35.
- Pusey, P. L.; Hotchkiss, M. W.; Dulmage, H. T.; Baumgardner, R. A.; Reilly, C. C.; Wilson, C. L. (1988).** Pilot tests for comercial production and application of *Bacillus subtilis* (B-3) for postharvest control pf peach brown rot. *Plant Disease* 72 (7): 622-626.
- Solis, S. F. Y Ramos, C. (2003).** Efecto de aplicaciones al suelo de *Bacillus subtilis* en el control de *Fusarium oxysporum* en arveja china en: www.Ag.vt.edu/ipmcrsp/meetings/guatemala-research/guatemalasearch1/guatresIndice.html (Marzo-2003).
- Towsend, G. R. y J. M. Heubergerd. (1943).** Method for estimating losses caused by diseases in fungicides experiments. *Plant Disease Rep.*, 27(17): 340-342.
- Vidaurre, T. C. y Campos, E. (2003).** Otimizacao de meio de cultura para roducto fungicida bacteriano a partir de *Bacillus subtilis* en: Geocities.yahoo.com.br/tvidaurre/OTIMlmeioBS1.html (Febrero-2003).

ANEXOS

Tabla 1. Relación de los hongos y su procedencia.

Hongos	Procedencia
<i>Curvularia lunata</i>	Semilla de arroz
<i>Colletotricchun dematium</i>	Semilla de soya
<i>Trichotecium roseum</i>	Semilla de soya
<i>Dydimella lycopersici</i>	Tallo de tomaste
<i>Phytophthora infestens</i>	Fruto de tomate
<i>Fusarium sp</i>	Semilla de arroz
<i>Pyrenochaeta terrestris</i>	Raíces de cebolla
<i>Fusarium sp</i>	Semilla de soya
<i>Macrophomina phaseolina</i>	Semilla de soya
<i>Alternaria porri</i>	Hoja de ajo
<i>Fusarium moniliforme</i>	Raíces de cebolla
<i>Stemphylium solani</i>	Hoja de tomate
<i>Cercospora sp</i>	Hoja de apio
<i>Alternaria solani</i>	Cepario y Archivo Sintomatológico (INIFAT)
<i>Fusarium sp</i>	Hoja de apio
<i>Diplodia natalensis</i>	Semilla de soya
<i>Trichoconiella padwickii</i>	Semilla de arroz
<i>Botryodiplodia theobromae</i>	Semilla de arroz
<i>Curvularia sp</i>	Hoja de apio
<i>Dreschlera oryzae</i>	Semilla de arroz
<i>Phomopsis sojaj</i>	Semilla de soya
<i>Glomerella sp</i>	Hoja de apio

Tabla 5. Control ejercido por *Bacillus subtilis* con más de 2 años de almacenamiento.

Patógenos	Medios de cultivos					
	Medio Czapek (testigo)			Caldo de malta (mosto 1)		
	X(mm)	Crec Mic (%)	Control (%)	X(mm)	Crec. Mic (%)	Control (%)
<i>Alternaria porri</i>	47.25	100	-	4.00	8.46	91.54 (E)
Fusarium moniliforme	56.87	100	-	6.48	11.39	88.61 (MB)
Fusarium sp.	57.62	100	-	12.62	21.90	78.10(B)
Stemphylium solani	39.0	100	-	4.87	12.48	87.52 (MB)
Dydimella lycopersisci	30.75	100	-	0	0	100 (E)

Tabla 6. Inhibición producida por *Bacillus subtilis* frente a diferentes hongos.

HONGOS	Crecim. Micelial Czapek (testigo) X(mm)	Crecim. Micelial (Czapek + Bs) X (mm)	Crecim.mic elial (Czapek + Bs) X (mm)	Inhibición (%)
<i>Curvularia lunata</i>	14.3	0	0	100
<i>Colletotrichum dematium</i>	26.0	0	0	100
<i>Trichotecium roseum</i>	20.0	0	0	100
<i>Dydimella lycopersici</i>	32.5	0.2	0.7	99.2
<i>Phytophthora infestans</i>	9.0	0.2	2.7	97.7
<i>Fusarium sp (arroz)</i>	44.0	1.0	2.7	97.2
<i>Pyrenochaeta terrestris</i>	32.0	1.8	5.6	94.3
<i>Fusarium sp (soya)</i>	33.6	2.3	6.8	93.1
<i>Macrophomina phaseolina</i>	53.0	5.6	10.5	89.4
<i>Alternaria porri</i>	46.7	5.0	10.6	89.3
<i>Fusarium moniliforme</i>	58.7	6.4	11.3	88.6
<i>Stemphylium solani</i>	39.0	4.8	12.4	87.5
<i>Cercospora sp</i>	28.46	4.2	14.9	85.0
<i>Alternaria solani</i>	38.5	6.4	16.6	83.3
<i>Fusarium sp (apio)</i>	57.6	12.6	21.9	78.1
<i>Diplodia natalensis</i>	86.2	19.5	22.6	77.3
<i>Trichoconiella padkii</i>	32.5	8.6	26.4	73.5
<i>Botryodiplodia theobromae</i>	60.0	19.6	32.6	67.3
<i>Curvularia sp</i>	22.1	7.62	34.4	65.5
<i>Dreslera oryzae</i>	9.0	3.6	40.0	60.0
<i>Phomopsis sojae</i>	10.6	4.3	40.5	59.4
<i>Glomerella sp</i>	13.2	9.7	73.6	26.3

Tabla 7. Control ejercido por *B. subtilis* frente a patógeno *Pyrenochaeta terrestris*.

Soluciones de <i>B. subtilis</i>	Porcentaje de crecimiento y control							
	24 horas		48 horas		72 horas		144 horas	
	Crec.	Control	Crec.	Control	Crec.	Control	Crec.	Control
Testigo	100%	0%	100%	0%	100%	0%	100%	0%
CM ₁ (2 años)	0%	100%	13.63	86.37	4.73	95.27	2.8	97.2
B-2 (2 meses)	0%	100%	20.36	79.64	14.20	85.8	10.92	89.08
B-3 (5 días)	0%	100%	18	82	4.73	95.27	3.12	96.88

Tabla 8. Control de la solución del *B. subtilis* frente al patógeno *Pyrenochaeta terrestris* bajo condiciones de campo.

Trat.	Rép. 1		Rép 2		Rép 3		Rép4		total		%	
	Enf.	San.	Enf.	San.	Enf.	San.	Enf.	San.	Enf.	San.	Enf.	San.
Testigo	49	1	50	0	48	2	50	0	197	3	98.5	1.5
BS-2	31	19	32	18	31	19	30	20	124	76	62	38
BS-4	18	32	20	30	19	31	17	33	74	126	37	63

Tabla 9. Composición de los tratamientos empleados y comparación múltiple de las medias de la infección en los tratamientos frente a *ALternaria porri* (Ell) Cif.

Trata m	X	Signifi. 5%
7	14.00	a
5	11.70	b
6	11.60	b
2	9.90	c
1	9.32	c
3	5.83	d
4	5.72	d

Tabla 10. Comparación múltiple de las medias de la infección en los tratamientos frente *ALternaria porri* (Ell) Cif en el tercer año.

Trata m	X	Signifi. 5%
7	11.02	a
6	9.10	b
5	8.75	b
2	7.51	c
1	7.19	c
3	4.70	d
4	4.52	d