

Bioeficacia de productos orgánicos, biológicos y químicos contra *Alternaria dauci* Kühn y su efecto en el cultivo de zanahoria

(Con 5 Tablas)

Biological efficiency of organic, biological and chemical products against Alternaria dauci Kühn and its effects on carrot crop

(With 5 Tables)

Hernández-Castillo¹ FD, Adalberto Aguirre-Aguirre¹, RH Lira-Saldivar²,
E Guerrero-Rodríguez¹, G Gallegos-Morales¹

Resumen. Mediante experimentos de laboratorio e invernadero se analizó la bioeficacia de cinco cepas de *Bacillus spp.*; de la mezcla de los bioproductos quitosan y extracto de *Larrea tridentata*, así como de cinco funguicidas sintéticos contra el hongo *Alternaria dauci* Kühn. Además, se determinó el efecto de estos compuestos en el crecimiento del cultivo de zanahoria. Los resultados obtenidos mostraron que las cepas de la bacteria *Bacillus* (B3, B9, B15 y la combinación de éstas), así como la mezcla quitosan-*Larrea* estimularon el desarrollo de la zanahoria, ya que ésta alcanzó mayor grosor, longitud y peso, con respecto al testigo y a los demás tratamientos. La cepa B3 resultó ser la que más promovió el crecimiento de zanahoria, ya que reportó valores superiores en diámetro, longitud y peso fresco de la raíz al momento de la cosecha. Sin embargo, se comportó estadísticamente similar a las otras cepas de *Bacillus*. Considerando los resultados alentadores obtenidos con los bioproductos estudiados, es conveniente analizar su potencial antifúngico *in vitro* e *in planta* contra otros hongos y en diversos cultivos agrícolas.

Palabras clave: *Bacillus subtilis*, biocontrol, quitosan, *Daucus carota*, *Larrea tridentata*

Abstract. The biological efficiency of five stocks of *Bacillus subtilis*, of the mixture of the bioproducts quitosan and *Larrea tridentata* extract, and five synthetic fungicides were evaluated against the fungus *Alternaria dauci* Kühn in laboratory and greenhouse experiments. The effect of these compounds on growth and yield of carrot was also determined. Stocks of the bacteria *Bacillus* (B3, B9, B15 and a combination of these) and the mixture quitosan-*Larrea* stimulated carrot development because it reached greater width, length and weight in comparison to the control and the other treatments. Stock B3 was the best in promoting carrot growth because it showed the greatest root diameter, length and fresh weight at harvesting time. However, it behaved statistically similar to the other stocks of *Bacillus*.

¹ Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Parasitología Agrícola, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, CP 25315.

² Centro de Investigación en Química Aplicada, Blvd. Enrique Reyna N° 140, Saltillo, Coahuila, México, CP 25. Correspondencia: rhlira@ciqua.mx

Recibido 21.I.2005; aceptado 10.III.2005

Considering the encouraging results obtained with the studied bioproducts, it is convenient to analyze its potential against other fungi *in vitro* and *in vivo* and on other plant crops.

Key words: *Bacillus subtilis*, biocontrol, chitosan, *Daucus carota*, *Larrea tridentata*

El cultivo de la zanahoria (*Daucus carota* L.) es el hospedero principal del hongo *Alternaria dauci* Kühn, el cual también puede infectar otras umbelíferas (Romanazzi et al., 2002). La enfermedad producida por este hongo conocida como “tizón de hoja” es la más común en todas las áreas productoras de zanahoria del mundo (Poissonnier et al., 1995). *Alternaria dauci* se encuentra sobre la superficie y en el mericarpio de la semilla en forma de conidia y como micelio invernante causando muerte prematura de plántulas. Los residuos de follaje son una fuente de infección, especialmente cuando están sobre la superficie del suelo (Strandberg, 1977). El uso de cultivares resistentes a *A. dauci* ha sido estudiado (Glick et al., 1999) pero aun no se ha logrado encontrar resistencia a esta enfermedad. Debido a esto, su prevención y control químico se practican extensivamente, pero con consecuencias adversas para el medio ambiente y los humanos. Entre los fungicidas sintéticos más utilizados en todo el mundo para controlar esta enfermedad se encuentran: iprodione, hexaconazole, dithianon, difenoconazole, captafol, chlorothalonil y mancozeb (Richardson, 1990; Reis et al., 1995).

El biocontrol mediante el uso de bacterias es considerado actualmente como una opción para reducir el ataque de hongos que afectan a numerosos cultivos en programas de agricultura orgánica y sustentable. Bacterias como *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus* sp. han mostrado un claro efecto antagonístico contra el alga *Phytophthora capsici*. Las bacterias antagonísticas saprófitas rizosféricas ejercen su actividad de control biológico mediante la competencia por nutrientes y espacio, así como por la producción de enzimas líticas, compuestos antibióticos, sideróforos, parasitismo y síntesis de sustancias promotoras de crecimiento que afectan la viabilidad del hongo (Kim et al., 1997). Las bacterias antagonistas también ayudan a promover otros efectos benéficos; diversos autores ha encontrado una mayor emergencia de plántulas de trigo y reducción de hongos fitopatógenos al utilizar *B. subtilis* (Jacyn et al., 1985; Korsten et al., 1997). También se ha consignado el efecto benéfico *in vitro* de *Bacillus* sp. sobre la germinación y el desarrollo de semillas de tomate (Jongebloed et al., 1993) infectadas con *Fusarium oxysporium* var. *cubensis* y de *Bacillus* aislado de trigo (Korsten et al., 1997). *B. subtilis* también mostró inhibir el crecimiento de hongos del suelo como *F. oxysporum*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *P. nicotianae*, *F. moniliforme* y *F. solani*, y permitió el control de *Alternaria* porri en plantas de cebolla (Chen et al., 2004), especialmente cuando se alternó con aplicaciones de los fungicidas zineb y oxiclورو de cobre.

A medida que la demanda de hortalizas producidas con menos aplicaciones de pesticidas sintéticos se van intensificando, es necesario desarrollar métodos de manejo integrado de los cultivos que permitan reducir el efecto de las enfermedades y las pérdidas económicas. Por esa razón, en este trabajo experimental se planteó como objetivo determinar el potencial antifúngico de cinco cepas de *Bacillus*; de la mezcla de los bioproductos quitosan-*Larrea*, y de cinco fungicidas sintéticos contra *A. dauci*. Además, se analizó el efecto de esos productos en el desarrollo y rendimiento del cultivo de zanahoria bajo condiciones de invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento del hongo *A. dauci*. Se colectaron plantas de zanahoria en huertas comerciales con síntomas de la enfermedad, las cuales se cortaron en trozos pequeños obtenidos del área con síntomas presentes. Las mismas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2% por 5 min, y se lavaron con agua destilada estéril. Posteriormente, se secaron sobre papel durante 20 min y se colocaron en cajas de Petri conteniendo medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA). Finalmente, se incubaron a 25°C durante dos días.

Esporulación de *A. dauci*. Con la finalidad de lograr la esporulación de los aislamientos obtenidos en PDA, fue necesario determinar las mejores condiciones de esporulación del hongo. Con este propósito se evaluaron tres medios de cultivo: jugo V8 agar, PDA, e infusión de hoja de zanahoria agar (IHZA), con diferentes niveles de pH (5,0; 5,5; 5,8; 6,0 y 6,5). Estos últimos se ajustaron con KOH y HCl antes de la esterilización. En las cajas de Petri con diferentes medios se colocó un explante del hongo de 5 mm de diámetro, y se incubaron a 25°C colocando cuatro repeticiones en presencia de luz constante y cuatro más a la sombra. Después de 8 días se realizó la observación y el conteo de conidias con el hemacitómetro.

Purificación e identificación de *A. dauci*. Una vez que el hongo cubrió un tercio de la caja de Petri y esporuló en el medio de cultivo IHZA, se purificó mediante la técnica de cultivo monospórico; se tomó un explante de 5 mm de diámetro y se depositó dentro de un tubo de ensayo con 9 mL de agua destilada estéril. El tubo se colocó en un agitador (Vortex-Genie) por un período de 3 min. para desprender las conidias; enseguida, se tomaron 0,5 mL de la suspensión conidial con una pipeta Pasteur y se depositó en una caja de Petri con medio IHZA, la cual fue incubada a 25°C. Cuando la cepa se tuvo purificada se realizaron montajes en portaobjetos con lactofenol, los cuales se observaron en el microscopio y se identificaron con las claves morfológicas (Poissonnier et al., 1995) descritas para esta especie.

Obtención de *Bacillus* spp. y preparación de las soluciones quitosan-*Larrea*. Las cepas de *Bacillus* caracterizadas como B1, B3, B9, B13 y B15, seleccionadas previamente por su actividad inhibitoria contra hongos fitopatógenos, fueron aisladas de la rizósfera de plantas de papa y chile, siendo posteriormente purificadas. El quitosan obtenido de caparzones de cangrejo fue adquirido comercialmente de Sigma-Aldrich. Este se diluyó en ácido acético glacial al 99,9% sometido a agitación constante durante 24 h, y se diluyó al 1%. La solución se esterilizó a 121°C durante 20 min, y se ajustó la solución a pH 5,6 con una solución acuosa de NaOH (Salih et al., 1989). La preparación del extracto hidrosoluble de resina de hojas de *Larrea tridentata* se realizó de acuerdo al procedimiento reportado anteriormente (Lira-Saldivar et al., 2003). La mezcla quitosan-*Larrea* (Q-L) se formó a partir de una solución de concentración conocida de quitosan a la que se le agregó el extracto hidrosoluble de *L. tridentata* a la concentración deseada. Una vez preparada la mezcla de los dos bioproductos se mantuvo en agitación constante hasta lograr tener una suspensión homogenizada.

Incremento de *Bacillus* spp. Se prepararon matraces de 250 mL con 50 mL de caldo nutritivo inoculados con cada uno de los aislados, y se transfirieron a un termo agitador programado a 150 rpm y a 28°C durante cuatro días. Después se extrajeron 5 mL del medio de cultivo con las bacterias y se colocaron en un frasco de vidrio rectangular de dos litros de capacidad con agar nutritivo (AN) solidificado en una posición horizontal. Después se incubaron a 28°C durante cuatro días; una vez transcurrido ese tiempo, se agregaron 15 mL de agua destilada estéril a cada frasco y se frotó suavemente con una varilla de vidrio. El concentrado bacteriano se depositó en un tubo con rosca conservándose a 3°C. Finalmente se realizó el conteo y cálculo de unidades formadoras de colonias (ufc) con el hemacitómetro.

Inhibición *in vitro* de *A. dauci* por aislados de *Bacillus* spp. y por la mezcla Quitosan-Larrea. Para la prueba de antagonismo contra *A. dauci* (Ad); se colocó un explante de 5 mm de diámetro del hongo en el centro de la caja de Petri conteniendo PDA. Cada aislado de *Bacillus* (B) se depositó con una micro pipeta estéril a una concentración de 1×10^8 ufc, colocando una gota (50 μ L) en los cuatro puntos cardinales de la caja de Petri. Las cajas se incubaron a 25°C con períodos de luz y sombra de 12:12 horas, respectivamente. Se prepararon siete tratamientos: (1) B1 vs. Ad, (2) B3 vs. Ad, (3) B9 vs. Ad, (4) B13 vs. Ad, (5) B15 vs. Ad, (6) mezcla de *Bacillus* vs. Ad y (7) el testigo; cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones. Para evaluar el efecto antifúngico de la mezcla Q-L, se utilizaron cinco dosis (0-0, 1000-1000, 1000-2000, 2000-1000 y 2000-2000 ppm, respectivamente), con cuatro repeticiones. Para evaluar el efecto *in vitro* de los bioproductos se preparó IHZA con 20 mL de Q-L en 60 mL de infusión de hoja de zanahoria más 1,2 g de agar, ajustando el pH a 5,8 antes de la esterilización; después de solidificar el medio de cultivo se colocó un explante de 5 mm en el centro de las cajas y se incubaron a 25°C con luz continua durante 24 h. Los parámetros analizados fueron: porcentaje de inhibición del crecimiento micelial y esporulación del hongo. Las lecturas se realizaron a los siete días, cuando el tratamiento testigo llenó por completo la superficie de la caja de Petri. La información obtenida se analizó mediante un diseño completamente al azar con el programa estadístico SAS y se hizo la comparación de medias de Tukey al 5% de significancia.

Concentración inhibitoria *in vitro* de cinco funguicidas sintéticos sobre *A. dauci*. Los cinco productos estudiados fueron: (1) clorotalonil en ocho dosis: (0, 100, 250, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 ppm); (2) fluazinam en diez dosis: (0, 1, 2,5, 5, 10, 50, 100, 200, 400 y 500 ppm); (3) propiconazol en ocho dosis: (0, 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 y 250 ppm); (4) tiabendazol en ocho dosis: (0, 10, 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 ppm) y (5) iprodiona en diez dosis: (0; 1; 2,5; 5; 10; 50; 100; 200; 400 y 500 ppm). Cada tratamiento fue repetido cuatro veces. Las cajas de Petri se incubaron a 25°C con luz fluorescente continua durante siete días. Se determinó la concentración inhibitoria (CI_{50} y CI_{90}) de los funguicidas y su efecto sobre la esporulación del hongo. Los datos obtenidos se transformaron en porcentaje de inhibición y se procesaron bajo el análisis estadístico PC Probit.

Efecto de *Bacillus* spp., Quitosan-Larrea, y funguicidas sintéticos sobre el crecimiento de zanahoria y en la incidencia y severidad de *A. dauci*. Estos trabajos se realizaron en invernadero y cámara bioclimática. Antes de la siembra en invernadero se desin-

fectaron las semillas de zanahoria con hipoclorito de sodio al 2% durante 5 min. Después se lavaron con agua destilada estéril y se dejaron secar sobre papel; posteriormente se sumergieron durante 5 min. en la suspensión de *Bacillus* a 1×10^8 ufc/mL del tratamiento correspondiente. La mezcla de los funguicidas sintéticos (clorotalonil, tiabendazol, iprodiona, propiconazol y fluazinam), se realizó cada uno a la dosis comercial mínima recomendada, en la que se sumergieron las semillas por cinco minutos. Lo mismo se hizo para el tratamiento con la mezcla de los bioproductos Q-L. La siembra se realizó en el invernadero sobre camas de 4m de largo por 1,2 m de ancho, en suelo previamente esterilizado con bromuro de metilo. Se colocaron 36 semillas por surco y tres surcos por unidad experimental. Se evaluaron cinco cepas de *Bacillus* (B), una mezcla de las cinco cepas, la combinación de dos bioproductos, una mezcla de los funguicidas comerciales y el testigo. Se tuvieron así nueve tratamientos con cuatro repeticiones: (1) B1, (2) B3, (3) B9, (4) B13, (5) B15; (6) mezcla de los aislados; (7) mezcla Q-L a 2000-2000 ppm; (8) mezcla de los funguicidas sintéticos, y (9) el testigo absoluto sin aplicación de funguicida. Las variables evaluadas durante el ciclo del cultivo fueron: peso fresco de planta y raíz, altura de planta, longitud y diámetro de raíz. A los cuarenta días después de la siembra (dds) se realizó el primer muestreo, extrayendo las plantas de cada unidad experimental; la cosecha se realizó a los 95 dds. Los datos se analizaron con un diseño en bloques al azar.

Para realizar el experimento *in vivo* se transplantaron a una cámara bioclimática plántulas de zanahoria cv. Nantes de 35 días de edad en macetas de 0,5 L. Se inocularon por aspersión al follaje con 2,5 mL de una suspensión de esporas de *A. dauci* a la concentración de 5×10^5 conidias/mL y se incubaron a 25°C en 100% de humedad relativa por 72 h, con períodos de luz y sombra de 12:12 h, respectivamente (Szczech y Shoda, 2004). Al término de este tiempo se aplicaron por aspersión los tratamientos antes descritos con cuatro repeticiones por tratamiento. Las variables evaluadas fueron incidencia y severidad de la enfermedad a los 30 días después de la inoculación. La severidad se calculó determinando el porcentaje de área foliar dañada por *A. dauci*. Los datos se analizaron mediante el programa estadístico SAS utilizando un diseño completamente al azar y la prueba de comparación de medias de Tukey al 5% de significancia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inhibición micelial *in vitro* de *A. dauci* por cepas de *Bacillus* y las mezclas quitosan-Larrea. Los datos analizados revelaron que las cepas de *Bacillus* presentaron un efecto inhibitorio significativo ($P = 0,05$) en el crecimiento micelial de *A. dauci*, excepto B15 y la mezcla de cepas. El mayor efecto inhibidor (53.44%) fue detectado con la cepa B1, la cual resultó estadísticamente superior que las demás (Tabla 1). Con excepción de la cepa B15 todas mostraron una clara actividad antifúngica, superior al de las mezclas Q-L. Una actividad inhibidora similar contra las algas *Pythium aphanidermatum* y *P. capsici* ha sido informada con otras cepas de *Bacillus*, las cuales se han reportado como agentes de control biológico debido a que lograron inhibir a esos fitopatógenos en plantas de tomate (Jongebloed et al., 1993; Landa et al., 2004). La falta de actividad antifúngica observada con la cepa B15 y la mezcla de las cepas, posiblemente se debió a un efecto antagónico entre los aislamientos de *B. subtilis*; a que algunos

Tabla 1. Inhibición del crecimiento micelial *in vitro* de *Alternaria dauci* por cepas de *Bacillus* spp. y suspensiones de quitosan-Larrea.

Tratamientos evaluados	Inhibición micelial (%)
Cepa B1*	53.44 a
Cepa B3	48.44 b
Cepa B9	40.31 c
Cepa B13	46.25 b
Cepa B15	0.0 f
Mezcla de B1,B3,B9,B13,B15	0.0 f
Q-L 2000-2000 ppm	14.06 d
Q-L 2000-1000	4.06 e
Q-L 1000-2000	1.88 ef
Q-L 1000-1000	0.00 f
Testigo	0.00 f

*cepas de la bacteria *Bacillus subtilis*. Valores en la columna seguidos por letras distintas son significativos a $p < 0,05$

Tabla 2. Concentraciones inhibitorias CI_{50} y CI_{90} de cinco fungicidas sintéticos contra el hongo *Alternaria dauci* en condiciones *in vitro*

Fungicidas evaluados	CI_{50}	Límites fiduciales (95%)		CI_{90}
		Inferior	Superior	
Clorotalonil	75.65	32.24	127.12	3193.25
Fluazinam	0.000366	0.000	0.02797	65.94
Propiconazol	0.7493	0.459666	1.0763	18.10
Tiabendazol	1728.86	1016.07	4172.36	256379.78
Iprodiona	0.003938	0.000018	0.045970	102.45

microorganismos presentan antibiosis *in vitro*, pero no necesariamente muestran esa respuesta cuando se evalúan *in vivo* o viceversa (Dashti et al., 1997). El efecto de los bioproductos Q-L a la dosis 2000-2000 ppm fue menor al advertido con las bacterias antagonicas, ya que esta mezcla solo inhibió en 14,06 %. A dosis menores el efecto fue menor, habiéndose comportado de manera similar al testigo. Sin embargo, es importante señalar que no se detectó esporulación de *A. dauci* en los tratamientos donde se aplicaron esos bioproductos. Trabajos previamente realizados también reportan que cuando el quitosan fue mezclado con extractos de hojas y semillas de papaya se observó una menor esporulación del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Neergaard, 1945; Castellanos et al., 1995).

Concentraciones inhibitorias *in vitro* de los fungicidas sintéticos sobre el crecimiento micelial y esporulación de *A. dauci*. La inhibición del crecimiento micelial del hongo varió notablemente con los diferentes fungicidas evaluados (Tabla 2). La concentración

inhibitoria 50 (CI₅₀) fluctuó con cada uno de los fungicidas desde 0,00036 y 0,00393 ppm con fluazinam e iprodiona, respectivamente, hasta 1728,8 ppm con tiabendazol. La concentración inhibitoria 90 (CI₉₀) mostró un amplio rango, ya que con propiconazol fue de 18,10 ppm, mientras que con clorotalonil este valor se incrementó notablemente (3193,25 ppm), indicando esto una mayor efectividad del propiconazol. Otros trabajos realizados reportan que la mezcla de iprodione + triticonazole manifestaron ser eficientes para controlar los hongos *Drechslera teres* y *Bipolaris sorokiniana* bajo condiciones *in vitro* e *in vivo* (Richardson, 1990; Reis et al., 1997). También se ha consignado que la mezcla de los fungicidas difenoconazol + propiconazol tuvieron un buen control de enfermedades fungosas en el cultivo de soja (Zuber et al., 1993).

Tabla 3. Efecto *in vitro* de la concentración de cinco fungicidas sintéticos sobre la esporulación del hongo *Alternaria dauci* expresada como número de conidias

Clorotalonil (ppm)		Fluazinam (ppm)		Propiconazol (ppm)		Tiabendazol (ppm)		Iprodiona (ppm)	
2500	0	500	0	250	0	1000	0	500	0
2000	0	400	0	50	0	800	0	400	0
1500	5X10 ⁶	200	0	25	0	600	0	200	0
1000	3X10 ⁶	100	0	10	0	400	0	100	0
500	7.5X10 ⁵	50	0	5	2.5X10 ⁵	200	5X10 ⁵	50	0
250	7.5X10 ⁵	10	0	1	2.5X10 ⁵	100	1X10 ⁶	10	0
100	5X10 ⁵	5	0	0.5	5X10 ⁵	10	5X10 ⁵	5	2.75X10 ⁶
0	5X10 ⁵	2.5	2.25X10 ⁶	0	5X10 ⁵	0	5X10 ⁵	2.5	6
		1	7					1	5X10 ⁵
		0	2.5X10 ⁵					0	1.5X10 ⁶
			5X10 ⁵						5X10 ⁵

La esporulación de este hongo también se modificó considerablemente con cada uno de los fungicidas estudiados, especialmente con clorotalonil y tiabendazol (Tabla 3), los cuales permitieron la formación de conidias a altas concentraciones (1500 y 2000 ppm) en comparación con los otros tres fungicidas, los que a concentraciones bajas (5 y 10 ppm) inhibieron por completo la formación de conidias. Además, estos productos promovieron deformaciones morfológicas como alargamiento de la conidia en hasta 25 segmentos para el caso del producto iprodiona, y engrosamiento de la conidia en los tratamientos donde se aplicó propiconazol.

Incidenia y severidad de *A. dauci* por efecto de cepas de *Bacillus* y fungicidas sintéticos. Las plantas que recibieron aplicaciones de las cepas de *Bacillus* presentaron el menor porcentaje de incidencia y severidad de *A. dauci*. En ambos casos, sobresalió la cepa B3, ya que con este aislamiento se inhibió por completo el daño del hongo (Tabla 4). Con las otras cuatro cepas y la mezcla Q-L también se corroboró el efecto inhibitor en la incidencia y severidad de la enfermedad, el cual fue marcadamente superior que el observado con la mezcla

Tabla 4. Efecto de productos biológicos y químicos en la incidencia y severidad de *Alternaria dauci* en plantas de zanahoria en invernadero.

Tratamientos aplicados	Incidencia (%)	Severidad
Cepa B1	25d	0.5 de
Cepa B3	0 e	0 e
Cepa B9	25 d	0.5 de
Cepa B13	25 d	0.5 de
Cepa B15	50 c	1 d
Mezcla de B1,B3,B9,B13,B15	50 c	1 d
Quitosan-Larrea 2000-2000 ppm	50 c	3 c
Mezcla de funguicidas sintéticos*	75 b	4.25 b
Testigo absoluto	100 a	6.75 a

*(Clorotalonil, iprodiona, propiconazol, tiabendazol y fluzinam)
Valores en la columna seguidos por letras distintas son significativos a $p < 0,05$

de funguicidas sintéticos y en el testigo. Se ha reportado que esta acción inhibitoria se debe a que la actividad antagonica contra bacterias y hongos fitopatogenos por cepas del genero *Bacillus* está relacionada con la producción de antibióticos (Lagunas-Lagunas et al., 2001; Luna et al., 2001; Utimada et al., 1999) como subtilina, bacilopeptina, bacilomicina, bacilisina, botricidina, fengicina, micosubtilina y rhizocitina.

Altura de planta, diámetro y longitud de raíz de zanahorias tratadas con cepas de *Bacillus*, mezclas de quitosan-Larrea y funguicidas sintéticos. La comparación de medias mostró que a los 95 dds el mayor porte de plantas fue 33,53 cm obtenido con la cepa B9, seguida por la mezcla de las cinco cepas (33,03 cm), y la mezcla de los bioproductos Q-L (32,7 cm); sin embargo, no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre las cepas de *Bacillus* y los funguicidas sintéticos (Tabla 5), aunque se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($P = 0.05$) en comparación con la altura del testigo (28,77 cm). La promoción del crecimiento de plantas, así como el incremento en proteína y peso de materia seca de soja por bacterias rizosféricas también ha sido reportado previamente (Dedej et al., 2004). Los efectos estimuladores de algunas cepas bacterianas sugieren que posiblemente existe un sinergismo entre el hospedante y los simbiontes, lo que permite una mejor absorción de elementos esenciales como N y P, los cuales al interactuar con las fitohormonas que excretan las raíces tienen una acción potenciadora sobre el desarrollo aéreo del cultivo (Arshad y Frankenberger, 1991). El efecto de los tratamientos en el diámetro y longitud de la raíz de zanahoria a los 95 dds revela que los valores diametrales máximos fueron 11,13 y 10,83 cm. Estos valores correspondieron a las cepas B3 y B9, respectivamente. Sin embargo, estos datos no resultaron ser estadísticamente superiores a los obtenidos con el resto de las cepas. Al mínimo diámetro reportado por el testigo (6,63 cm), le siguió el obtenido con la mezcla de los funguicidas sintéticos. Probablemente esto se debió a un efecto fitotóxico en la planta causado por los productos, ya que también se observaron

Tabla 5. Efecto de <i>Bacillus</i> spp. en altura, diámetro y longitud de zanahoria cv. Nantes a los 95 días después de la siembra en invernadero.			
Tratamientos evaluados	Altura de Planta (cm)	Diámetro de raíz (cm)	Longitud de raíz (cm)
Cepa B1	31.35 ab	10.75 ab	16.40 a
Cepa B3	31.40 ab	11.13 a	16.83 a
Cepa B9	33.53 a	10.83 ab	16.53 a
Cepa B13	31.40 ab	10.70 ab	16.45 a
Cepa B15	31.43 ab	10.33 abc	16.40 a
Mezcla de B1,B3,B9,B13,B15	33.03 ab	10.27 bc	15.83 ab
Quitosan-Larrea 2000-2000 ppm	32.70 ab	9.87 c	15.00 ab
Mezcla fungicidas sintéticos*	31.73 ab	8.70 d	14.23 ab
Testigo	28.77 b	6.63 e	11.53 c

*[Clorotalonil, iprodiona, propiconazol, tiabendazol y fluazinam]
Valores en la columna seguidos por letras distintas son significativos a p<0,05

hojas dañadas en las plántulas después de la emergencia, lo cual implicó un retraso en el desarrollo del crecimiento y por consecuencia en el diámetro de la raíz. Se ha señalado que las bacterias promotoras de crecimiento en las plantas pueden ejercer su efecto estimulante mediante la producción de sideróforos extracelulares que secuestran óxidos férricos para convertirlos en formas disponibles para las raíces, los que además incrementan el volumen radical (Dudgale et al., 1993). También se menciona que las bacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* son las más destacadas en la conversión de compuestos inorgánicos insolubles de fósforo [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] que no están totalmente disponibles en el suelo para las plantas, en fosfatos di y monobásicos, siendo éstas las formas asimilables por las raíces (Bautista-Baños et al., 2003; Strandberg, 1992).

En relación con la longitud de la raíz de zanahoria, a los 95 dds los tratamientos con las cinco cepas de *Bacillus* resultaron ser estadísticamente iguales entre si, pero significativamente diferentes al testigo. El extracto Q-L, la mezcla de las cinco cepas, y la mezcla de fungicidas resultaron ser estadísticamente iguales, pero también superiores al testigo, el cual reportó una longitud media de 11,53 cm. En cambio el mayor crecimiento (16,8 cm) fue generado por la cepa B3. Resultados que muestran un efecto estimulador por cepas de *Bacillus* también han sido reportados en los cultivos de frijol y garbanzo (Liu y Yao, 2004; Jayaraj et al., 2005). En estos trabajos se menciona el notable biocontrol obtenido por las cepas de *Bacillus* utilizadas contra hongos del suelo, las cuales además mejoraron la emergencia de las plántulas y el rendimiento de estos cultivos en condiciones de campo.

REFERENCIAS

- Arshad M, WT Frankenberger. Microbial production of plant hormones. *Plant Soil* 133 (1991) 435.
- Asea PEA, RMN Kucey, JWB Stewart. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture. *Soil Biol Biochem* 20 (1988) 459.
- Bautista-Baños S, E García-Domínguez, L Barrera-Necha, T Reyes-Chilpa, CL Wilson. Seasonal evaluation of the postharvest fungicidal activity of powders and extracts of huamuchil (*Pithecellobium dulce*) on *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* and *Rhizopus stolonifer* of strawberry fruit. *Post Biol Technol* 29 (2003) 81.
- Castellanos JJ, P Oliva, E Izquierdo, N Morales. Evaluación de *Bacillus subtilis* como biocontrol del patógeno *Alternaria porri* (Ell). Cif en cebolla. In *Bioplag 95*. Habana, Cuba. INIFAT (1995) 21.
- Chen CY, YH Wang, CJ Huang. Enhancement of the antifungal activity of *Bacillus subtilis* F29-3 by the chitinase encoded by *Bacillus circulans* chiA gene. *Canadian J of Microbiology* 50 (2004) 451.
- Dashti N, F Zhang, R Hynes, DL Smith. Application of plant growth-promoting rhizobacteria to soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) increases protein and dry matter yield under short-season conditions. *Plant Soil* 188 (1997) 33.
- Dedej S, KS Delaphane, H Scherm. Effectiveness of honey bees in delivering the biocontrol agent *Bacillus subtilis* to blueberry flowers to suppress mummy berry disease. *Biological Control* 31 (2004) 422.
- Dugdale LJ, HA Collin, S Isaac, JJB Gill. Leaf blight resistance in carrot somaclones. *Acta Horticulturae* 336 (1993) 399.
- Glick BR, CL Patten, O Holguin, DM Penrose. Biocontrol mechanisms. Chapter 7. In: *Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria*. Ontario Canada. Imperial Collage Press (1999) 215.
- Jacyn BJ, JR Stavely, N Mock. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. *Plant Disease* 69 (1985) 770.
- Jayaraj J, NV Radhakrishnan, R Kannan, K Sakthivel, D Suganya, S Venkatesan, R Velazhahan. Development of new formulations of *Bacillus subtilis* for management of tomato damping-off caused by *Pythium aphanidermatum*. *Biocontrol Science and Technology* 15 (2005) 55.
- Jongebloed PH, J Kessel, GJT Molhoek. Biological control of *Phytophthora infestans* with compost extracts and selected bacterial antagonists. *Bulletin OILB SROP* 16 (1993) 16.
- Kim DS, DM Weller, RJ Cook. Population dynamics of *Bacillus* sp. L324-92Riz and *Pseudomonas fluorescens* 2-79 RN10 in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology* 87 (1997) 559.
- Korsten L, EE De Villiers, RC Wehner, JM Kotzet. Field spray of *Bacillus subtilis* and fungicides for control of preharvest fruit disease of avocado in South Africa. *Plant Disease* 81 (1997) 455.
- Lagunas-Lagunas J, E Zavaleta-Mejía, S Osada-Kawasoe, S Aranda-Ocampo, I Luna-Romero, H Vaquera-Huerta. *Bacillus firmus* como agente de control biológico de *Phytophthora capsici* Leo. en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Rev Mex de Fitopatol* 19 (2001) 57.
- Landa BB, JA Navas-Cortes, RM Jiménez-Dfáz. Integrated management of *Fusarium* wilt of chickpea with sowing date, host resistance, and biological control. *Phytopathology* 94 (2004) 46.
- Lira-Saldivar RH, MR Sánchez, R Gamboa, D Jasso, R Rodríguez. Fungitoxic effect of *Larrea tridentata* resin extract from the Chihuahuan and Sonoran Mexican deserts on *Alternaria solani*. *Agrochimica* 47 (2003) 54.
- Liu J, JM Yao. Study on mutagenic breeding of *Bacillus subtilis* and properties of its antifungal substances. *Plasma Science & Technology* 6 (2004) 2433.
- Luna D, LM Bustamante, G González, SJ Domínguez, BS Bautista, K Shirai, ME Bosques. Treatments on the quality of papaya fruit during storage. *Proceedings of the Eighth International Congress on Engineering Food*. Technomic Publishing Co Inc Lancaster, PA (2001) 1042.
- Neergaard P. Danish Species of *Alternaria* and *Stemphylium*. London, UK: Oxford University Press (1945) 75.
- Poissonnier J, P Reulet, B Guery, P Tison. L' *Alternaria* de la carotte. *Infos-Paris*, 112 (1995) 42.
- Reis EM, R Casa Trezzi, MS Silva. Efeito do tratamento de sementes de cevada no controle e no desenvolvimento da mancha em rede, causada por *Drechslera teres*. *Fitopatol Brasil* 20 (1995) 561.
- Reis EM, R Casa Trezzi, MA Carmona, DE Barreto. Sensibilidade de *Drechslera teres* ao fungicida triadimenol usado em tratamento de sementes de cevada. *Fitopatol Brasil* 22 (1997) 539.
- Richardson MJ, An Annotated List of Seed-borne Diseases. 4th ed. Zurich, Switzerland: International Seed Testing Association (1990) 25.
- Romanazzi G, F Nigro, A Hipolito, D Di Venere, M Salerno. Effect of pre and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. *J of Food Science* 67 (2002) 1862.
- Salih HM, AI Yonka, AM Abdul-Rahem, BH Munam. Availability of phosphorous in calcareous soil treated with rock phosphate or superphosphate as affected by phosphate dissolving fungi. *Plant Soil* 120 (1989) 181.

- Strandberg JO, Alternaria species that attack vegetable crops: Biology and options for disease management. In: Alternaria-Biology, Plant Disease and Metabolites, Topics in Secondary Metabolism, Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers, 3 (1992) 175.
- Strandberg JO, Spore production and dispersal of *Alternaria dauci*. Phytopathology 67 (1977) 1262.
- Szczeczek M, M Shoda. Biocontrol of Rhizoctonia damping-off of tomato by *Bacillus subtilis* combined with *Burkholderia cepacia*. J of Phytopathol 52 (2004) 549.
- Utiamada CM, LN Sato, JB Vida, JT Vorinori. Eficiencia de fungicidas no controle de oídio da soja. Brasília, suplemento. Fitopatol Brasil 24 (1999) 339.
- Zuber P, MM Nakano, MA Marahieo. Peptide antibiotics. In: *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria, biochemistry, physiology and molecular genetics. AL Sonenshein (ed.) Washington, D. C. American Society for Microbiology (1993) 897.