

# **AISLAMIENTOS DE BACTERIAS DE SUELO CON EFECTO ANTAGONISTA *IN VITRO* FRENTE A HONGOS FITOPATOGENOS DEL CULTIVO DEL TABACO**

Yussuan K. Silva<sup>1</sup>, Yuliet Franco<sup>2</sup>, Daymaris Romero<sup>2</sup>, Marleny González<sup>2</sup>, Yamilka Pérez<sup>2</sup>, Anabel Díaz<sup>1</sup>.

1. *Instituto de Investigaciones del Tabaco. Cuba.* [yussuan@iitabaco.co.cu](mailto:yussuan@iitabaco.co.cu)

2. *Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Cuba*

## **Introducción:**

El uso de agro-químicos en el control de enfermedades que afectan el tabaco es la estrategia fitosanitaria mas extendida entre los productores de la solanácea por ello ha sido notable el deterioro del recurso suelo y la contaminación del mismo (Favel 2005). Entre las alternativas que se han desarrollado para contrarrestar el anterior efecto se encuentra el uso del control biológico, fundamentalmente en tabaco se ha aplicado con buenos resultados el microorganismo antagonista *Trichoderma* spp. el cual ha mostrado actividad anti-oomycetes contra *Phytophthora nicotianae* y anti-fúngica contra *Rhizoctonia solani*. Sin embargo existe un gran potencial en el uso de otros antagonistas particularmente con los géneros bacterianos *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp., los cuales son abundantes en el suelo y la rizosfera de las plantas y podrían se usados como principio activo (Lugtenberg y Kamilova., 2009) en la elaboración de bio-productos con aplicabilidad en el cultivo del tabaco. El presente trabajo tuvo como objetivo aislar bacterias a partir de muestras de suelo de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* y evaluar su capacidad antagónica *in vitro* frente a cinco hongos fitopatógenos del tabaco representados por aislamientos de *Phytophthora nicotianae*, *Fusarium* spp. *Rhizoctonia solani*, *Cerathoriza* y *Sclerotium rolfsii*.

## **Materiales y métodos**

Los fitopatógenos utilizados fueron cinco especies de hongos que afectan tabaco: *Rhizoctonia solani* (RSA), *Sclerotium rolfsii* (Sr), *Cerathoriza*, (TA) *Fusarium oxysporum* (F35.2) y *Phytophthora nicotianae* (P32.6).

## **Procesamiento de las muestras de suelo y rizosfera:**

Se colectaron 14 muestras (4 de suelo y 10 de rizosfera) de diferentes localidades y cultivos y se procesaron según procedimiento descrito por Fernández-Larrea (1999).

**Tabla 1. Muestras colectadas para el aislamiento de bacterias de los géneros *Bacillus***

# de muestra	Tipo de muestra	Cultivo	Localidad
1	<b>Suelo de rizosfera</b>	Escoba amarga	Instituto de Investigaciones de Tabaco, San Antonio de los Baños
2	<b>Suelo de rizosfera</b>	Frijol	Instituto de Investigaciones de Tabaco, San Antonio de los Baños
3	<b>Suelo de rizosfera</b>	Frijol	Instituto de Investigaciones de Tabaco, San Antonio de los Baños
4	<b>Suelo de rizosfera</b>	Maíz	Instituto de Investigaciones de Tabaco, San Antonio de los Baños
5	<b>Suelo de rizosfera</b>	Tabaco var Burley	Instituto de Investigaciones de Tabaco, San Antonio de los Baños
6	<b>Suelo de rizosfera</b>	Tabaco var Habana 2000	Instituto de Investigaciones de Tabaco, San Antonio de los Baños
7	<b>Suelo de</b>	Yuca	Instituto de Investigaciones de

	<b>rizosfera</b>		Tabaco, San Antonio de los Baños
8	<b>Suelo de rizosfera</b>	Frutabomba	Instituto de Investigaciones de Tabaco, San Antonio de los Baños
9	<b>Suelo</b>	Papa var Red La Soda	CCS Frank País, Güira de Melena
10	<b>Suelo de rizosfera</b>	Papa var Red La Soda	CCS Frank País, Güira de Melena
11	<b>Suelo de rizosfera</b>	Papa var Red La Soda	CCS Frank País, Güira de Melena
12	<b>Suelo</b>	Papa var Carl White	Finca La Morenita, Güira de Melena
13	<b>Suelo</b>	Papa var Carl White	CCS Alvaro Reynoso, Alquizar
14	<b>Suelo</b>	Papa var Carl White	CCS Alvaro Reynoso, Alquizar

#### **Aislamiento de bacterias del género *Bacillus* spp y *Pseudomonas*.**

Para el aislamiento de bacterias se utilizó el protocolo descrito por (Reinoso y cols., 2007; De la Fuente y cols., 2004).

#### **Evaluación de la capacidad antagónica**

La actividad biológica de los aislados bacterianos frente a los hongos se evaluó *in vitro* mediante el método de enfrentamiento dual (Landa y col., 1997; Soyly y col., 2005).

A los cinco días se midió el crecimiento de los fitopatógenos excepto para *Fusarium* sp y *P. nicotianae* que se midió a los cinco y 10 días respectivamente. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio con relación al testigo:

**% inhibición = [(DCC – DCT)/DCC] x 100;**

**DCC: diámetro de la colonia control; DCT: diámetro de la colonia tratada.**

#### **Pruebas bioquímicas en la identificación preliminar de las bacterias escogidas.**

***Bacillus*** Presencia de esporas, KOH 3%, Catalasa *Manual de Bergey* (Claus y Berkeley, 1986).

***Pseudomonas*** Formación de pigmento fluorescente en King B, KOH 3%, O/F *Manual de Bergey* (Holt y col., 1994).

#### **Amplificación de la región 16S rRNA de los aislados de *Bacillus* y *Pseudomonas* mediante PCR (reacción de cadena de la polimerasa).**

El ADN de los aislados bacterianos fue procesado por el Kit de extracción de ADN genómico de la firma Promega. Se utilizaron los oligonucleótidos universales para la amplificación del gen bacteriano 16S rRNA, Weisburg y cols., 1991. El PCR fue realizado en un termo-ciclador PTC-200 MJ Research con el siguiente programa de tres pasos fundamentales repetidos 35 veces 1) Desnaturalización a 94°C por 1 minuto, 2) Hibridación al ADN a 55°C por 1 minuto y 3) Extensión a 72°C por 1 minuto. En el caso de los aislados de *Bacillus* se utilizaron además los oligonucleótidos BacR y BacF, Garbeva y cols., 2003 que son específicos para las especies de este género. Los genes amplificados fueron observados y fotografiados en gel de agarosa al 1.2 % teñido con Bromuro de Etidio.

#### **Resultados y Discusión**

De las 14 muestras de suelo se procesaron 80 colonias con características morfológicas similares al género *Bacillus* y 22 a las del género *Pseudomonas*. A pesar de que 80 colonias fueron gram-positivas y se observó la presencia de endosporas solo 15 de estos aislados mostraron actividad antagónica frente al menos dos de los

fitopatógenos en el enfrentamiento dual. Sin embargo a pesar de que las bacterias con similares a *Pseudomonas* mostraron pigmento fluorescente es presencia del medio King B solo el aislado Py61 mostró antagonismo frente a *Ceratorhiza* y *P. nicotianae*.

#### Evaluación de la capacidad antagonica en *Bacillus*.

Los 15 aislados bacilares mostraron efecto antagonico contra al menos dos de los hongos fitopatógenos empleados (tabla 2). Frente a Sr 14 aislados produjeron inhibición del crecimiento entre 48,2 y 85,2 %. Para RSA los 15 aislados inhibieron el crecimiento entre 42,2 y 88,2 %. En el caso de TA 12 bacilos fueron capaces de inhibir entre 28,2 y 63,3 %. El crecimiento de *Fusarium* (F35.2) fue inhibido entre 30,3 y 49,2 % por nueve 9 bacilos. El aislado de *P.nicotianae* (P32.6) fue inhibido por 6 bacilos que mostraron porcentajes entre 36,3 y 88,9 %. Los aislamientos By-6 y By11-6 fueron capaces de inhibir el crecimiento de todos los fitopatógenos.

El efecto inhibitorio se evidenció a través del cambio morfológico provocado en la colonia del hongo al no crecer en la vecindad de la bacteria, figuras 1 y 2. En el enfrentamiento con RSA se observó además un micelio ralo y oscurecido en la zona más cercana al antagonista. En esta misma zona para TA se produjo un engrosamiento del micelio. En el caso de Sr se observó la delimitación física en el enfrentamiento dual por los microorganismos. En P32.6 se produjo un empobrecimiento del micelio que puede ser apreciado en la figura 1.

Las muestras presentaron escasos aislados de *Pseudomonas* de los cuales Py61 inhibió el crecimiento de TA y P32.6 en 68,8 y 46,6 % respectivamente tabla 3.

Tabla 2 Resultados del enfrentamiento *in vitro* de aislados de *Bacillus* frente a cinco hongos fitopatógenos del tabaco..

<b>Bacillus</b>	<b>% Inhibición RSA</b>	<b>% Inhibición Sr</b>	<b>% Inhibición TA</b>	<b>% Inhibición F35.2</b>	<b>% Inhibición P32.6</b>
By33	51,8	57	38,5	30,3	0,0
By36	44,4	56,3	40,0	33,3	0,0
By6	66,7	75,6	63,3	40,0	36,3
By11	59,3	0,0	0,0	0,0	69,6
By11-3	54,8	65,2	48,9	34,8	0,0
By11-4	54,8	57	45,2	41,5	0,0
By11-6	74,8	59,3	45,2	49,2	77,8
By12-32	65,9	69,6	0,0	0,0	0,0
By12-4	55,6	51,9	43	33,3	0,0
By12-6	51,9	55,6	43	33,3	0,0
By12-7	70,4	65,2	60	0,0	88,9
By12-8	42,2	48,2	28,9	0,0	77
By13-5	51,1	50,4	42	33,3	0,0
By13-82	88,2	85,2	48,2	0,0	80,0
By14-27	60	61,5	0,0	0,0	83,7
control	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabla 3 Resultados del enfrentamiento *in vitro* de aislados de *Pseudomonas* frente a cinco hongos fitopatógenos del tabaco

<b>Aislados de <i>Pseudomonas</i></b>	<b><i>S. rolfii</i> (Sr)</b>	<b><i>R. solani</i> (RSA)</b>	<b><i>Ceratorhiza</i> sp. (TA)</b>	<b><i>Fusarium</i> sp.(F35.2)</b>	<b><i>P. nicotianae</i> (P36.2)</b>
	<b>% inh</b>	<b>% inh</b>	<b>% inh</b>	<b>% inh</b>	<b>% inh</b>
Py61	0	0	68,8	0	46,6
Testigo	0	0	0	0	0

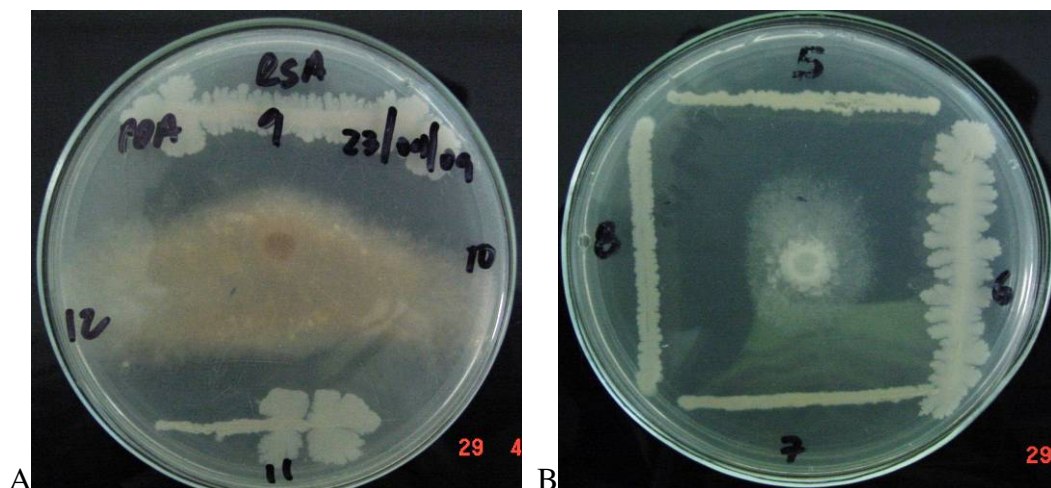


Figura 1. Enfrentamiento dual de cepas de *Bacillus* spp. contra el aislado de *Rhizoctonia solani* (RSA) A y *Phytophthora nicotianae*, P32.6, B.

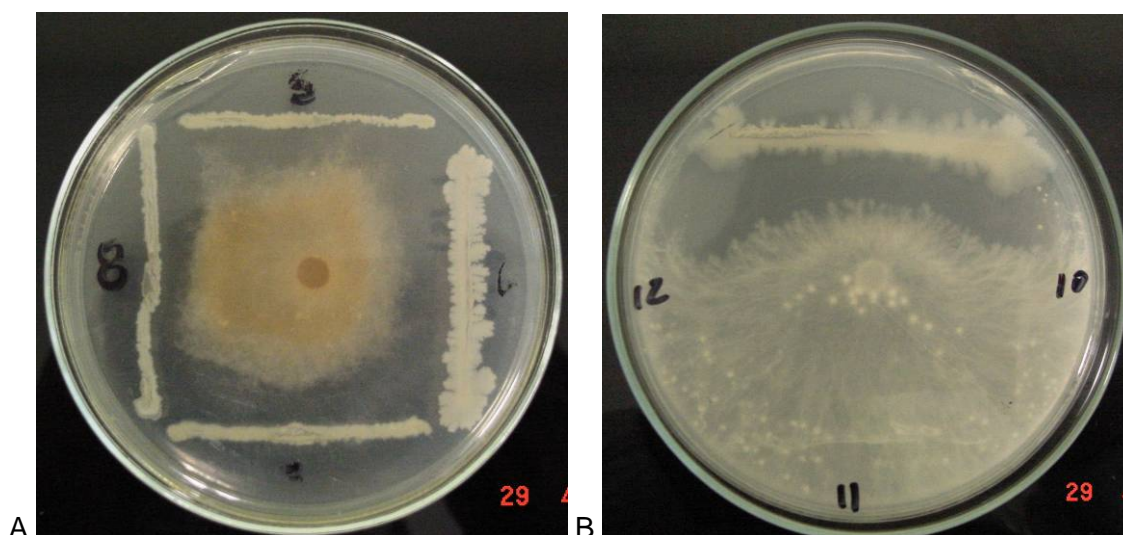


Figura 2. Enfrentamiento dual de cepas de *Bacillus* spp. contra el aislado de *Ceratorhiza* spp A y *Sclerotium rolfii* B.

### Pruebas bioquímicas

Tabla 4. Aislados de *Bacillus* escogidos del enfrentamiento dual.

Aislado	arabinosa	manitol	Citrato	NaCl 7 %	Hidrólisis gelatina	Hidrólisis Almidón
By 6	+	+	++	+	+	+
By11-6	++	+	++	+	+	+
By13.82	++	+	++	+	+	+
By12-7	++	+	++	+	+	+
<i>Bacillus</i> spp.	+	+		v	+	+

Tabla 5. Aislado de *Pseudomonas* spp. escogido del enfrentamiento dual.

Aislado	Levan	oxidasa	catalasa	HR tabaco	Pudrición papa	Reducción Nitratos
Py61	+	+	+	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	+	+	-	-	-

Las pruebas bioquímicas indican la de forma preliminar la presencia de especies pertenecientes al género bacillus (tabla 4) y de *Pseudomonas* (tabla 5). No obstante para una correcta identificación a nivel de especie de los aislados bacterianos es necesario realizar un análisis fenotípico que incluya un mayor número de pruebas bioquímicas como las referidas en el sistema API Biomeriux (API 50CH complementado con API 20E), descrito por Logan y Berkeley (1984).

#### Amplificación de la región 16S rRNA y BacR –BacF en *Bacillus* y *Pseudomonas*

Los aislados bacterianos escogidos por su actividad antagónica para la amplificación del gen 16S rRNA fueron de *Pseudomonas* Py 61 y los *Bacillus* By 6, By 11.6, By 12.7 y By13-82. Sin excepción mostraron una banda de 1300 pb, además que en los bacillus se observó una banda de ADN de 500 pb con los cebadores específicos, figura 3.

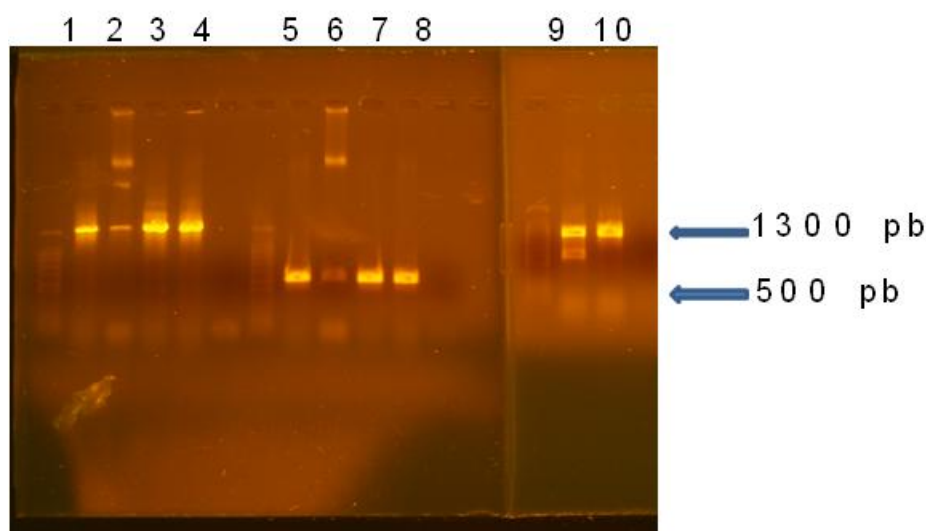


Figura 3. Carriles 1-4 *Bacillus* By 6, By 12.7, By 11.6 y 14.2, los carriles 5-8 muestran la región específica BacR-BacF. Los carriles 9 y 10 muestran el 16S rRNA de Py61 y de *Escherichia coli* respectivamente.

#### Discusión

En la evaluación del efecto antagónico contra *R.solani* (RSA) todos los *Bacillus* (15) inhibieron el crecimiento del micelio en más de un 50 % excepto By36 y By12.8 que exhibieron porcentajes de inhibición de 44.4 % y 42,2 % respectivamente. By 13-82 mostró la mayor capacidad antagónica, 88,1 % contra RSA. Existen diferentes reportes sobre el efecto antagónico de especies de *Bacillus* contra aislados del patógeno *Rhizoctonia solani*. Reinoso y cols., 2007 informan la inhibición *in vitro* mediante *Bacillus licheniformis* y luego comprueban el efecto antimicrobiano de sus metabolitos sobre *Alternaria solani* y *R. solani*. Faltin y cols., 2004, compararon la eficacia de diferentes antagonistas contra *R. solani* y demostraron que los tratamientos con *Bacillus* spp fueron los mas efectivos en el control del hongo. Especies como *B.*

*subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis* y otros han sido formuladas adecuadamente y utilizados en el tratamiento de semilleros, en el sistema radicular, y directamente como bio-fungicida foliar, mediante aerosoles, en cultivos de importancia económica como frijol, tomate, mango, fresa, arroz y flores ornamentales (Lumsden y cols., 1995; El-Mougy 2001; Boff y cols., 2002; Schisler y cols., 2004; Govender 2004; Lee y cols., 2006; Elzein y cols., 2006); donde los principales agentes causales de enfermedades de plantas han sido *R. solani*, *Fusarium*, *Pythium* y *Phytophthora*.

Un total de 14 *Bacillus* inhibieron el crecimiento de *S. rolfii* en valores que superan el 50 % excepto By 12.8 que mostró valores de 48,2 % y By 11 que no presentó antagonismo. El resultado es positivo contra este hongo ya que son las cepas del hongo *Tricoderma* y no las de *Bacillus* spp. las más utilizadas en el control de *S. rolfii*, debido a que *Tricoderma* desarrollan un parasitismo por las hifas del patógeno, inhibiendo totalmente el desarrollo del micelio (Benhamou y Chet). 1996; (Howell 2003). Algunos trabajos de investigación describen la actividad antagónica de géneros bacterianos contra *Sclerotium* spp. patógeno de la cebolla, entre ellos están *Pantoea*, *Bacillus* y *Paenibacillus* (Paris y cols 2002). La actividad in vitro de los bacillus contra *S. rolfii* resulta promisorio para la continuidad de futuras investigaciones con los metabolitos de estas bacterias, en particular By 13-82 que mostró valores de inhibición de hasta un 85,2 %.

En cambio los bacilos, 12 en total, presentaron porcentajes de inhibición del crecimiento del micelio frente al aislado de *Ceratomyxa* (TA). Los aislados By 6 y By 12.7 presentaron los mayores valores entre 60% y 63.3% respectivamente, el resto de los bacilos exhibieron porcentajes menores del 50 % que oscilan entre 48,8 % y 28,9 %, finalmente tres aislados de By 11, By 12.32 y By 14.27 no tuvieron efecto antagónico frente a TA; tabla 2. La inhibición del crecimiento del micelio resultó más notable en RSA que en TA ya que los porcentajes en este último resultaron más bajos y solo 12 de los bacilos de un total de 15 mostraron antagonismo. Este resultado constituye el primer informe en Cuba de antagonismo entre *Bacillus* spp y *Ceratomyxa* sp desde que se reconociera su presencia por ITS-PCR en aislados patogénicos en semilleros de tabaco, provocando *damping off* y asociados con especies del complejo *Rhizoctonia* (Gonzalez y cols., 2009).

*Fusarium* spp. es un hongo patógeno de tabaco, donde especies de *F. oxysporum* f. sp *nicotianae* provocan la marchitez de la planta y la necrosis del tallo (Shew y Lucas., 1991). Un total de 9 bacilos presentaron actividad antagónica contra el aislado de *Fusarium* spp (F35.2). El máximo porcentaje de inhibición obtenido se comprobó en By 11-6 con 49,2 %. El resto de los *Bacillus* (9) presentaron antagonismo con valores de inhibición del crecimiento del micelio superior al 30,1 % y 6 de estos no mostraron actividad antagónica. Los resultados obtenidos en *Fusarium* spp no fueron óptimos en comparación con las numerosas investigaciones que informan del control biológico positivo del género *Bacillus* spp frente a las *formae specialis* de *Fusarium oxysporum* (Jacobsen y cols., 2004). Aislados de la especie *Bacillus polymyxa* inhibieron el crecimiento de las hifas en *F. oxysporum* por la presencia de un péptido llamado Fusaricidina A según Kajimura y Kaneda., 1996. Otra especie utilizada en el control de *F. oxysporum* fitopatogénico es *B. subtilis*. Esta especie sintetiza compuestos antibióticos tales como Bacilisina, Iturina y Mersacidina con una amplia actividad antifúngica contra las formas especiales en este género (Chung y cols., 2007). El crecimiento del aislado patogénico de tabaco *Phytophthora nicotianae* (P32.6) fue inhibido por 7 bacilos. A pesar de que resultó el patógeno menos afectado en cuanto a cantidad de bacilos con actividad antagónica, los resultados en el porcentaje de antagonismo fueron promisorios. Un total de 5 aislados presentaron un porcentaje de inhibición superior al 75 %; son los casos de By 12- 8 (77 %), By 11-6 (77,8 %), By 13-82 (80 %), By 14-27 (83,7%) y By 12-7 con el máximo valor de 88,9 %. El control químico en el caso de los oomicetes como *P. nicotianae* se realiza con efectividad mediante los fungicidas sistémicos metalaxyl, fosetyl A1 y otros ( Davis., 1982; Schwinn y Staub., 1995; Parra y Ristaino 2001; Xiao y cols., 2002) sin embargo los

inconvenientes de residualidad de fungicidas debido a la sobre-aplicación del mismo, el impacto ecológico en el agro-ecosistema y la aparición de resistencia en las poblaciones del patógeno ha contribuido al desarrollo del bio-control para estos microorganismos. La aplicación de bacterias de los géneros *Streptomyces* spp. y *Serratia* spp. han sido exitosas en plantaciones de diversos cultivos de importancia económica como cítricos, y solanáceas (Amorin y Melo., 2002; Queiroz y Melo., 2006). La aplicación de cepas de *Tricoderma harzianum* (A-34) en plantaciones de tabaco en Cuba es una práctica agro-ecológica efectiva en el control del oomicete, (Muiño y cols., 2001) sin embargo recientes investigaciones revelan la existencia de cepas de *Bacillus* con actividad anti-oomicetes *in vitro* las cuales podrían constituir el principio activo en la fabricación de un bio-producto (Ros y cols., 2008).

En las 14 muestras de suelo y rizosfera se escogieron un total de 22 aislados del género *Pseudomonas* crecidas en medio KB y con pigmento fluorescente. Si embargo solo el aislado Py61 mostró actividad frente a dos de los fitopatógenos; *Ceratorhiza* y *P. nicotianae*. Este género bacteriano es uno de los mas utilizados en el control biológico, incluso existen bio-productos comerciales que utilizan como principio activo cepas del antagonista en el control de numerosos fitopatógenos (Butt y cols., 1999). Las *Pseudomonas* fluorescentes son un grupo de bacterias predominantes en la rizosfera y el suelo, lo cual contrasta con la poca contribución de estas bacterias en las muestras procesadas. Las *Pseudomonas* fluorescentes contribuyen a la bio-remediación, promoviendo el crecimiento de la planta e interviniendo en la reducción de fitopatógenos (Li y cols., 2000). Los mecanismos de biocontrol en este género involucran la producción de sideróforos, antibióticos y enzimas extracelulares con actividad biológica inhibitoria (Ellis y cols., 2000).

Los aislados de *Bacillus* mas promisorios para la continuidad de las investigaciones con metabolitos y experimentos *in vivo* son aquellos que inhibieron todos los fitopatógenos en el ensayo de enfrentamiento dual *in vitro*, por ello fueron escogidos para la posterior identificación con pruebas bioquímicas API y secuenciación de la región 16S-23S RNA los siguientes aislados: By-6, By 11-6, By12-7 y By 13-82, aunque los dos últimos no inhiben a *Fusarium* spp presentan un elevado porcentaje de inhibición contra *P. nicotianae*; lo cual es muy importante por ser este oomicete un patógeno de alta incidencia en un cultivo intensivo como tabaco.

#### **Amplificación de la región 16S rRNA y BacR –BacF en *Bacillus* y *Pseudomonas*.**

El PCR realizado con los cebadores universales mostró una banda de 1300 pares de bases en las muestras de *Bacillus* y el aislado de *Pseudomonas*. El tamaño de la banda coincide con lo informado en la literatura por Bossis y cols., 2000. Las regiones del 16S r RNA en el genoma de bacterias son utilizados en la taxonomía molecular como herramienta para los investigadores cuando se requiere un diagnóstico rápido y preciso; esta región del genoma es muy conservada dentro de los géneros bacterianos pero variable en determinadas zonas inter-génicas como el caso de la región interna que se transcribe entre los genes 16S y 23S, Oger y cols 1998. La amplificación del 16S r RNA mas el análisis con enzimas de restricción podría ser una vía de diagnóstico para determinar que especie de *Bacillus* y de *Pseudomonas* constituyen los aislados escogidos en la investigación. Además existe la opción de secuenciar la región amplificada y luego comparar con las bases de datos para las especies relacionadas. En el caso de los bacilos utilizamos además los cebadores específicos que son capaces de detectar las especies presentes en diferentes ecosistemas y que fueron empleados anteriormente por Garbeva y cols., 2003. La amplificación con estos cebadores corrobora la presencia de *Bacillus* en los aislados mencionados anteriormente como lo más efectivos del estudio. Entre las especies de *Bacillus* mas comunes en los agro-ecosistemas y que además son bio-controladores se han informado *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. firmus* y *B. pumilus* y *B. amiloliquifaciens* entre otros, Garbeva y cols. 2003.

## Conclusiones

Se aislaron bacterias con características morfológicas similares a las descritas para los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*.

Dieciséis aislados de *Bacillus* (15) y *Pseudomonas* (1) mostraron actividad antagónica *in vitro* contra al menos dos de los hongos fitopatógenos

Los aislados By6, By11-6, By12-7, By13-82 de *Bacillus* spp. y Py 61 de *Pseudomonas* fueron seleccionados para los experimentos de antagonismo *in vivo*.

Fueron amplificados por PCR los genes 16S rRNA de *Bacillus* y *Pseudomonas*.

## Recomendaciones.

Obtener un mayor número de aislamientos del género *Pseudomonas*.

Realizar pruebas bioquímicas para ambos géneros

Realizar experimentos de antagonismo con metabolitos en ambos géneros

Complementar o identificar los aislados mas promisorios mediante secuenciación del gen 16S rRNA en ambos géneros.

Realizar experimentos *in vivo* en condiciones controladas para los aislados de mayor actividad antagónica previamente identificados.

## Bibliografía.

R.J. Ellis, T.M. Timms-Wilson, M.J. Bailey. 2000. Identification of conserved traits in fluorescent pseudomonads with antifungal activity, *Environ. Microbiol.* 274–284.

Amorin, E.P.R.; Melo, I.S. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citrus. *Rev. Bras. de Fruticult.*, 24: 565-568, 2002.

Benhamou, N.; I. Chet: «Parasitism of Sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: Ultrastructural and Cytochemical Aspects of the Interaction», *Phytopathology*, 86:405-416, 1996.

Boff, B., J. Köhl, M. Jansen, P. J. F. M. Horsten, C.Lombaers-van der Plas, and M. Gerlagh. 2002. Biological control of gray mold with *Ulocladium atrum* in annual strawberry crops. *Plant Dis.* 86: 220-224.

Chung S., Kong H., Buyer J., Lakshman K., Lydon J., Kim S-D., Roberts D. 2007. Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for suppression of soilborne pathogens of cucumber and pepper.

Davis, R.M. Control of *Phytophthora* root and foot rot citrus with systemic fungicides metalaxyl and phosethyl aluminium. *Plant Dis.*66: 218-220, 1982.

Howell, C. R.: «Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: the History and Evolution of Current Concepts», *Plant Disease*, 87:4-10, 2003.

Lee, J. P., S-W. Lee, C. S. Kim, J. H. Son, J. H. Song, K. Y.Lee, H. J. Kim, S. J. Jung, and B. J. Moon. 2006. Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biol. Control* 37: 329-337.

Muiño, B.; M. Sáenz; M. Stefanova; A. Porras; I. Díaz: ompatibilidad de *Trichoderma* spp. con plaguicidas y fertilizantes en el cultivo del tabaco», *Fitosanidad* 5 (2):3-9, Cuba, 2001.

Ros. C., Gonzales N., Arévalo R., Puertas A. 2008. Utilización de cepas bacterianas para el control *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan en el cultivo del tabaco

(*Nicotiana tabacum* L.). Revista Electrónica Granma Ciencia. Vol.12, No.3. ISSN 1027-975X

Butt.T. M.; J. G. Raíz and K. A. Powel. 1999: Microbial biopesticides: The European scene. In: Biopesticides. Use and delivery. Eds. F.R. Hill & J.J. Menn. Humana Press, NJ., pp.23-24.

G. Li, W. Huang, D.N. Lerner, X. Zhang. (2000). Enrichment of degrading microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil. *Water Res.* 34. 3845–3853.

Bossis, E., P. Lemanceau, X. Latour, and L. Gardan. 2000. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* 20:51–63.

Oger, P., Y. Dessaux, A. Petit, L. Gardan, C. Manceau, C. Chomel, and X. Nesme. 1998. Validity, sensitivity and resolution limit of the PCR-restriction fragment length polymorphism assay analysis of the *rrs* (16S rRNA gene) as a tool to identify soil-borne and plant-associated bacterial populations. *Genet. Sel. Evol.* S1:S311–321.

Weissburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ: 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 1991. 173:697-703.

Reinoso, Y., Casadesús, L., García, A., Gutiérrez, J. y Pazos, V. 2006. Aislamiento, selección e identificación de bacterias del género *Bacillus* antagonistas de *Pectobacterium carotovorum* Fitosanidad vol. 10, no. 3: 187-191.

Logan, N., Berkeley R. 1984. Identification of bacillus strain using the API system. *J. Gen. Microbiol.* 130: 1871-1882.

Porwal S, Lal S, Cheema S, Kalia VC: Phylogeny in aid of the present and novel microbial lineages: diversity in *Bacillus*. *PLoS One* 2009, 4: 4438.

Lugtenberg J., Kamilova F: Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual review of microbiology* 2009, 63:541-556. Favel D: Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual review of phytopathology* 2005, 43:A337-359.

Elzein A, Kroschel J, Leth V (2006) Seed treatment technology: an attractive delivery system for controlling root parasitic weed *Striga* with mycoherbicide. *Biocontrol Science and Technology* 16, 3--26. doi: 10.1080/09583150500187926.

Faltin, F; Lottmann,J; Groch, R y Berg, G (2004) .Strategy to select and asses antagonistic bacteria for the biological control of *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Canada Journal of Microbiology*, 50: 811-820.

Jacobsen B., Zidack N., Larson BJ (2004) The role of *Bacillus*-based biological control agents in integrated pest management systems: plant diseases. *Phytopathology* 94:1272–1275.

.Xiao, K., Kinkel, L.L. and Samac, D.A. (2002) Biological control of *Phytophthora* root rots on alfalfa and soybean with *Streptomyces*. *Biol Control* 23, 285–295.

El-Mougy NS (2001) Field application of certain biological and chemical approaches on controlling Bean wilt disease. *Egyptian Journal of Phytopathology* 29, 69--78.

Parra, G. y Ristaino, J.B. (2001) Resistance to mefenoxam and metalaxyl among field isolates of *Phytophthora capsici* causing *Phytophthora* blight of bell pepper. *Plant Dis* 85, 1069–1075.

Kajimura, Y. and Kaneda, M. (1996) Fusaricidin A, a new depsipeptide antibiotic produced by *Bacillus polymyxa* KT-8 taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activity. *Journal of Antibiotics* 49, 129–135.

Lumsden RD, Lewis JA, Fravel DR (1995) Formulation and delivery of biocontrol agents for use against soilborne plant pathogens. In 'Biorational pest control agents—Formulation and delivery'. (Eds FR Hall and JW Barry) pp.166–182. (American Chemical Society:Washington DC).

Schwinn, F. y Staub, T. (1995) Oomycete fungicides. In Modern Selective Fungicides, Properties, Applications, Mechanisms of Action ed. Lyr, H. pp. 323–346. New York: Gustav Fischer Verlag.

Shew. D., Lucas G (eds). 1991. Compendium of the Tobacco Diseases. American Phytopathological Society (APS). St Paul.Minnesota. 68 p.

Paris M. A., Cotes A. M., Elad Y., Kolh J., Shtienberg D. 2002. Evaluation of microbial isolates for control of *Sclerotium cepivorum* in onion. In: Proceedings of 7th working group meeting. IOBC-WPRS Working Group "Biological control of fungal and bacterial plant pathogens". Kusadasi, Turkey. 25(10): 311-314.

Govender, V., 2004. Evaluation of biological control systems for control of mango post-harvest diseases. MSc Thesis. University of Pretoria, Pretoria, South Africa.

González M., Ramos E., Chacón O., Fernández A y R. Ochoa. 2009. Determinación de grupos de Anastomosis de *Rhizoctonia* spp. por comparación de secuencias de la región ITS del ADNr nuclear. Fitosanidad vol. 13, no. 1, marzo 2009.

Schisler, D. A., P. J. Slininger, R. W. Behle, and M. A. Jackson. 2004. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. *Phytopathology* 94: 1267-1271.

Villar de Queiroz B.; Soares de Melo I. Antagonism of *Serratia marcescens* towards *Phytophthora parasitica* y its effects in promoting the growth of citrus. Brazilian Journal of Microbiology (2006) 37:448-450.

Fernández-Larrea, O.1999. Aislamiento, selección y estudio de cepas de *Bacillus thuringiensis* para el control fitosanitario», Informe final, PNCT, Biotecnología Avícola, INISAV, Cuba.

De La Fuente, L., Bajsa, N., Bagnasco, P., Quagliotto, L., Thomashow, L. and Arias, A. 2004. Antibiotic production by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* isolated from forage legume rhizosphere. <http://www.ag.auburn.edu/argentina/pdfmanuscripts/delafuente.pdf>

Claus, D.; R. C. W. Berkeley: «Genus *Bacillus*. Bergey's», Manual of Systematic Bacteriology, 9th ed., vol. 2, Williams & Wilkins, pp. 1105-1139, 1986.

Landa, B., Hervás, A., Bettiol, W and Jiménez-Díaz, R. antagonistic activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Phytoparasitica*, 25: 305-318. 1997.

Soylu, S., Soylu, M., Kurt, Sekici, O. Antagonistic Potential of rhizosphere associated bacterial isolates against soil borne diseases of tomato and Pepper caused by *Sclerotinia sclerotiorum* y *Rhizoctonia solani*. 2005.