

Trabajo completo

Inhibición del crecimiento de *Cercospora kikuchii* por especies de *Bacillus* y efecto sobre la acumulación de cercosporina

RECIBIDO: 14/06/10
ACEPTADO: 20/08/10

Soldano, A. • Vera Garate, V. • Vaccari, M. C. •
Latorre Rapela, G. • Lurá, M. C. • González, A. M.

Cátedra de Microbiología General, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral, Ciudad Universitaria, Paraje El Pozo, 3000 Santa Fe, Argentina.
Correspondencia: Ana María González. Catamarca 3580. (3000) Santa Fe, Argentina. Tel.: 54-342-4534372.
Email: amgpodio@fbc.unl.edu.ar

RESUMEN: *Cercospora kikuchii* es un patógeno que ataca la soja y ocasiona pérdidas en su rendimiento; para infectarla produce una toxina denominada cercosporina. A fin de proteger la cosecha y reemplazar a los fungicidas, se busca desarrollar técnicas alternativas como el control biológico. En este trabajo se evaluó el efecto antagónico de varias especies de *Bacillus* frente a *C. kikuchii*, por enfrentamiento en cultivos duales, mediante la determinación del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial, la velocidad de crecimiento y el tiempo de latencia. También se estudió la capacidad del mejor antagonista de reducir la cantidad de cercosporina producida por los hongos. Los resultados revelaron que la mayoría de las cepas de *Bacillus* inhibieron el crecimiento *in vitro* de *C. kikuchii*. *B. subtilis* 94 presentó la mejor actividad antagónica y redujo la cantidad de cercosporina acumulada, lo que

sugiere que podría ser un potencial agente biocontrolador de *C. kikuchii*.

PALABRAS CLAVES: control biológico; *Cercospora kikuchii*; *Bacillus*.

SUMMARY: *Effect of Bacillus species on Cercospora kikuchii growth inhibition and cercosporin accumulation*
Cercospora kikuchii is a fungal pathogen that infects soybean, thus resulting in yield losses, and whose pathogenicity is mostly attributable to cercosporin toxin. The need for alternative methods to protect crops and replace fungicides has encouraged research on biological control. In this study, several species of *Bacillus* were screened for antagonism against *C. kikuchii* by dual culture assay, considering inhibition of mycelial growth, growth rate and lag phase. The ability of the best antagonist to reduce cercosporin production was also analyzed. Results indicate that most strains of *Bacillus* caused inhibition of *in*

in vitro *C. kikuchii* growth. *B. subtilis* 94 showed the best antagonistic effect and reduced cercosporin accumulation, suggesting that this strain might be a potent biological

control agent against *C. kikuchii*.

KEYWORDS: *biological control*; *Cercospora kikuchii*; *Bacillus*.

Introducción

La soja (*Glycine max* (L.) Merrill) es el principal producto de la agricultura en Argentina y el mayor generador de divisas (1). Las denominadas enfermedades de fin de ciclo (EFC) son una limitante del cultivo. Entre ellas, el "tizón de la hoja y mancha púrpura de la semilla" provoca mermas de hasta el 50 al 80% y es la enfermedad foliar de mayor crecimiento en los últimos años (2). El agente causal es *Cercospora kikuchii* (Matsumoto & Tomoyasu) M. W. Gardner (3), uno de los hongos prevalentes en la soja cultivada en la Provincia de Santa Fe (4). Este fitopatógeno produce una toxina, denominada cercosporina, que desempeña un papel muy importante en su habilidad para infectar a la planta y es un factor de virulencia que interviene en la severidad de la enfermedad (5, 6).

El principal método de control de *C. kikuchii* consiste en el empleo de diversos fungicidas sintéticos (bencimidazoles, imidazoles, triazoles, estrobirulinas) (7). Sin embargo, hoy en día se busca reducir su utilización ya que se pretende que el tratamiento aplicado impacte lo menos posible sobre la salud del hombre y el medio ambiente (8). Esto ha promovido el uso de otro tipo de estrategias como el control biológico, para limitar la iniciación y propagación de enfermedades causadas por patógenos vegetales (9). Entre los microorganismos de control más estudiados se encuentran las bacterias del género *Bacillus* (10, 11), excelentes agentes para el desarrollo de bioproductos aplicables en el

campo (12), debido a su capacidad de colonizar la superficie de la raíz, incrementar el crecimiento de la planta y producir lisis del micelio fúngico (13) mediante la producción de algunos metabolitos tales como péptidos antibióticos, enzimas líticas y compuestos antifúngicos volátiles (14). Además, son capaces de tolerar condiciones extremas de pH, temperatura y presión osmótica (13), lo que facilita su almacenamiento a largo plazo y comercialización (15). Sin embargo, a pesar de todas estas ventajas, no se han reportado estudios que empleen esta técnica para controlar *C. kikuchii* en nuestra región.

Los objetivos del presente trabajo fueron: a) evaluar la capacidad de inhibición del crecimiento de *Cercospora kikuchii* por distintos aislamientos de *Bacillus* y seleccionar aquél con mayor potencial antagónico; b) determinar si la bacteria seleccionada es capaz de reducir la acumulación de la cercosporina producida por *C. kikuchii*.

Materiales y Métodos

Microorganismos. Se analizaron siete aislamientos de *Bacillus* provenientes de la rizosfera de plantas de soja sanas cultivadas en la provincia de Santa Fe durante la campaña 2006-2007 (*B. cereus* 82, *B. cereus* 88, *B. licheniformis* 85, *B. licheniformis* 51, *B. licheniformis* 52, *B. megaterium* 73, *B. thuringiensis* 31) y uno obtenido a partir del ambiente, aislado del aire, (*B. subtilis* 94). Se ensayaron dos aislamientos de *C. kikuchii* (CK31 y CK43) obtenidos a partir de plantas de soja que exhibían síntomas

de la enfermedad causada por dicho patógeno, provenientes de la provincia de Santa Fe (CK31 de la campaña 2005-2006 y CK43 de la campaña 2007-2008), y una cepa perteneciente a la colección NITE Biological Resource Center (Japón): *C. kikuchii* NBRC 6711 (CK6711). Las bacterias analizadas y los aislamientos fúngicos regionales pertenecen al cepario de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL, Argentina.

Prueba de antagonismo. Para evaluar la habilidad de los diferentes aislamientos bacterianos de inhibir el crecimiento fúngico se utilizó el método de enfrentamiento de cultivos duales (16): se extrajo un cilindro de 10 mm de diámetro del centro de una colonia fúngica, se colocó en el centro de una placa de petri conteniendo Agar Papa Dextrosa (APD) (17) y se incubó durante 24 h. Posteriormente, a partir de los cultivos bacterianos de 24 h de crecimiento en medio agar nutritivo a 37°C, se prepararon suspensiones conteniendo 10⁸ UFC/ml. Se sembró la suspensión bacteriana a 2 cm de la colonia fúngica, mediante 8 toques equidistantes (5 µl en cada toque). Como control se utilizaron placas de APD con el hongo, sin las bacterias. Los ensayos se realizaron por triplicado. A los 4, 8, 12 y 15 días de incubación a 26 ± 0,5°C se midió el diámetro del desarrollo fúngico. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial luego de 15 días de incubación empleando la siguiente fórmula (18):

% inhibición = $[1 - (\text{diámetro de la colonia tratada} / \text{diámetro de la colonia control})] \times 100$.

Para hallar la velocidad de crecimiento y el tiempo de la fase de latencia de cada una de las *C. kikuchii* estudiadas, se utilizó la siguiente expresión matemática (19):

$$r = \mu (t - \lambda)$$

Donde r es el crecimiento micelial (cm), μ es la velocidad de crecimiento (cm h⁻¹), t el tiempo de cultivo (h) y λ representa el tiempo correspondiente a la fase de latencia (h). La velocidad de crecimiento, se calculó mediante regresión lineal de la fase de crecimiento del cultivo. Para determinar el tiempo correspondiente a la fase de latencia, se extrapoló la gráfica a un crecimiento nulo (20). En el análisis estadístico de los resultados se aplicó el test-T y el test LSD Fisher (21, 22).

A fin de seleccionar el mejor aislamiento con potencial antagonico se consideró la inhibición del crecimiento micelial, la reducción de la velocidad de crecimiento y el retardo de la fase de latencia (20). Las placas correspondientes al aislamiento seleccionado fueron utilizadas en el ensayo siguiente.

Determinación de la concentración de cercosporina, en el cultivo dual. Se analizó si la bacteria seleccionada era capaz de reducir la cantidad de cercosporina acumulada en el medio de cultivo (cultivo dual y control). Para extraer y cuantificar la toxina se tuvo en cuenta la metodología propuesta por Jenns y col. (23). Se extrajeron 3 cilindros (10 mm de diámetro) del borde del desarrollo fúngico sin incluir el micelio, se colocaron en 6 ml de KOH 5N y se conservaron durante 3 h en oscuridad. Se centrifugó a 2.500 rpm durante 20 min, se separaron los sobrenadantes y se les realizó un barrido entre 400 y 700 nm con un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 20 UV/VIS (960 nm/min cada 1 nm) frente a blanco. La producción de cercosporina se confirmó por la presencia de tres picos característicos a 480, 595 y 640 nm. La concentración se determinó a 480 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar de 23300 (24). Se trabajó por duplicado y los resultados se expresaron en nmol/cilindro. Se aplicó un test-T para deter-

minar si las diferencias en la concentración de cercosporina entre el control y el cultivo dual eran significativas (21).

Resultados y Discusión

El método de enfrentamiento de cultivos duales es una técnica comúnmente utilizada para evaluar el efecto antagónico de bacterias contra hongos fitopatógenos (11, 12, 25-31). En este trabajo se utilizó para realizar un "screening" de posibles agentes biocontroladores de *C. kikuchii*.

Se observó que todos los aislamientos bacterianos presentaron un efecto inhibitorio significativo ($p \leq 0,05$) sobre el crecimiento micelial de CK43 (Fig. 1) y CK6711 (Fig. 2), y redujeron significativamente ($p \leq 0,05$) la velocidad de crecimiento del cultivo dual respecto al control (Tabla 1). Sin embargo, *B. cereus* 88 y *B. licheniformis* 51 no causaron dichos efectos sobre CK31 (Fig. 3, Tabla 1).

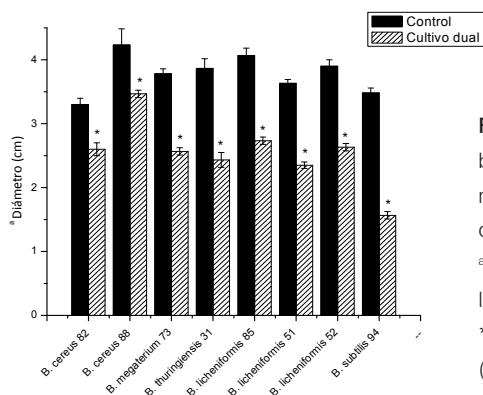


Figura 1: Efecto inhibitorio de las cepas bacterianas ensayadas sobre el crecimiento micelial del hongo *Cercospora kikuchii* 43 luego de 15 días de incubación en cultivos duales.
^a Diámetro promedio de las colonias obtenido en los ensayos por triplicado.
 * Diferencia significativa respecto al control ($p \leq 0,05$), según test-T.

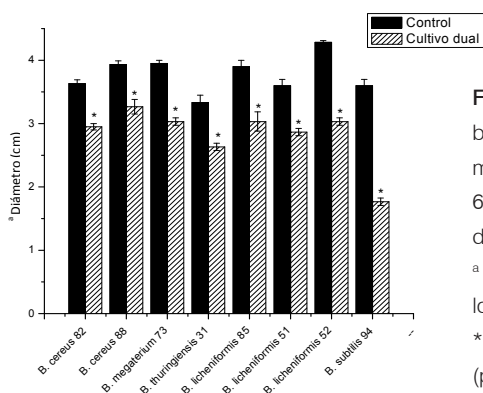


Figura 2: Efecto inhibitorio de las cepas bacterianas ensayadas sobre el crecimiento micelial del hongo *Cercospora kikuchii* NBRC 6711 luego de 15 días de incubación en cultivos duales.
^a Diámetro promedio de las colonias obtenido en los ensayos por triplicado.
 * Diferencia significativa respecto al control ($p \leq 0,05$), según test-T.

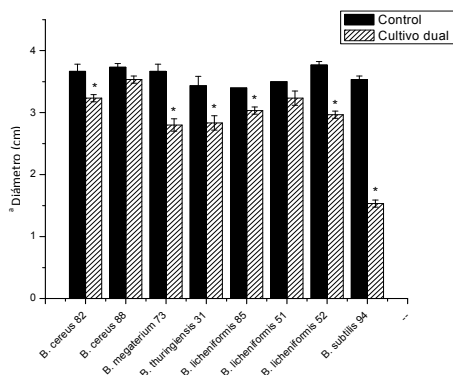


Figura 3: Efecto inhibitorio de las cepas bacterianas ensayadas sobre el crecimiento micelial del hongo *Cercospora kikuchii* 31 luego de 15 días de incubación en cultivos duales.

^a Diámetro promedio de las colonias obtenido en los ensayos por triplicado.

* Diferencia significativa respecto al control ($p \leq 0,05$), según test-T.

Tabla 1: Efecto de algunas especies de *Bacillus* sobre la velocidad de crecimiento de *Cercospora kikuchii*.

Aislamiento bacteriano	Velocidad de crecimiento (mm/h) ¹					
	CK31		CK43		CK6711	
	Control	Cultivo dual	Control	Cultivo dual	Control	Cultivo dual
<i>B. subtilis</i> 94	0,073 ± 0,002	0,014* ± 0,001 a	0,072 ± 0,002	0,015* ± 0,000 a	0,072 ± 0,001	0,020* ± 0,002 a
<i>B. thuringiensis</i> 31	0,068 ± 0,005	0,052* ± 0,003 bc	0,080 ± 0,004	0,039* ± 0,003 b	0,065 ± 0,003	0,046* ± 0,002 b
<i>B. megaterium</i> 73	0,075 ± 0,002	0,050* ± 0,004 b	0,076 ± 0,003	0,043* ± 0,002 c	0,081 ± 0,001	0,056* ± 0,002 cd
<i>B. licheniformis</i> 51	0,068 ± 0,000	0,061 ± 0,003 d	0,071 ± 0,001	0,037* ± 0,002 b	0,072 ± 0,003	0,052* ± 0,002 c
<i>B. licheniformis</i> 85	0,065 ± 0,001	0,055* ± 0,003 c	0,080 ± 0,002	0,046* ± 0,001 c	0,074 ± 0,003	0,054* ± 0,004 cd
<i>B. licheniformis</i> 52	0,077 ± 0,002	0,054* ± 0,002 c	0,081 ± 0,002	0,046* ± 0,002 c	0,092 ± 0,001	0,057* ± 0,001 d
<i>B. cereus</i> 82	0,072 ± 0,003	0,060* ± 0,001 d	0,061 ± 0,002	0,043* ± 0,002 c	0,070 ± 0,001	0,052* ± 0,002 c
<i>B. cereus</i> 88	0,076 ± 0,002	0,070 ± 0,002 e	0,091 ± 0,008	0,069* ± 0,002 d	0,081 ± 0,001	0,062* ± 0,003 e

¹ Los valores son el promedio ± SD de tres determinaciones. * Diferencia significativa respecto al control ($p \leq 0,05$), según test-T. Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$), según el test LSD Fisher, entre los distintos tratamientos para un mismo hongo. CK31 y CK43: aislamientos regionales de *Cercospora kikuchii*. CK6711: *Cercospora kikuchii* NBRC 6711.

B. subtilis 94 fue la única bacteria capaz de incrementar significativamente ($p \leq 0,05$) el tiempo de la fase de latencia de los tres hongos estudiados, durante el cultivo dual (Tabla 2).

En la Tabla 3 se observan los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial. Frente al aislamiento regional CK31, el menor porcentaje de inhibición fue de 7,32% y el mayor de 78,95%. Para el hongo CK43 los

Tabla 2: Efecto de algunas especies de *Bacillus* sobre el tiempo de latencia de *Cercospora kikuchii*.

Aislamiento bacteriano	Tiempo de latencia (h) ¹					
	CK31		CK43		CK6711	
	Control	Cultivo dual	Control	Cultivo dual	Control	Cultivo dual
<i>B. subtilis</i> 94	4,2 ± 5,5	67,0* ± 3,2 a	5,7 ± 2,2	79,9* ± 9,6 a	5,6 ± 3,3	69,5* ± 10,9 a
<i>B. thuringiensis</i> 31	5,3 ± 1,3	4,0 ± 2,2 d	3,9 ± 4,4	7,4 ± 1,7 d	3,9 ± 4,1	15,2 ± 5,0 b
<i>B. megaterium</i> 73	5,6 ± 5,2	9,2 ± 10,0 cd	5,0 ± 1,6	5,8 ± 7,5 d	1,5 ± 1,4	0,7 ± 0,1 d
<i>B. licheniformis</i> 51	22,8 ± 5,4	24,6 ± 2,6 b	51,7 ± 7,8	61,7 ± 7,7 b	17,8 ± 4,5	24,5 ± 7,7 b
<i>B. licheniformis</i> 85	10,9 ± 3,7	14,4 ± 6,8 c	23,1 ± 3,1	29,3 ± 7,2 c	15,3 ± 3,5	16,2 ± 5,5 b
<i>B. licheniformis</i> 52	3,0 ± 0,1	6,3 ± 4,4 cd	16,1 ± 4,6	16,0 ± 4,4 d	2,9 ± 1,7	13,7 ± 4,6 bd
<i>B. cereus</i> 82	5,3 ± 0,4	8,69 ± 3,0 cd	20,5 ± 6,3	16,7 ± 9,4 cd	10,0 ± 2,0	18,2 ± 7,7 b
<i>B. cereus</i> 88	11,5 ± 5,9	2,7 ± 3,0 d	4,3 ± 1,5	10,7 ± 9,2 d	2,2 ± 2,0	3,3 ± 3,1 cd

¹ Los valores son el promedio ± SD de tres determinaciones. * Diferencia significativa respecto al control ($p \leq 0,05$), según test-T. Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$), según el test LSD Fisher, entre los distintos tratamientos para un mismo hongo. CK31 y CK43: aislamientos regionales de *Cercospora kikuchii*. CK6711: *Cercospora kikuchii* NBRC 6711.

porcentajes de inhibición del crecimiento micelial variaron entre 23,71% y 77,18%; y para la cepa patrón CK6711 entre 22,73% y 70,51%. De acuerdo al test LSD Fisher,

se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos aplicados a cada hongo con las diferentes bacterias.

Tabla 3: Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Cercospora kikuchii* por algunas especies de *Bacillus* luego de 15 días de incubación en cultivos duales.

Aislamiento bacteriano	% inhibición de <i>Cercospora kikuchii</i>		
	CK31	CK43	CK6711
<i>B. subtilis</i> 94	78,95 a	77,18 a	70,51 a
<i>B. thuringiensis</i> 31	24,66 c	50,00 b	30,00 cd
<i>B. megaterium</i> 73	32,50 b	43,71 c	31,07 c
<i>B. licheniformis</i> 51	10,67 ef	48,73 b	28,21 cd
<i>B. licheniformis</i> 85	15,28 de	43,48 c	29,89 cd
<i>B. licheniformis</i> 52	28,92 bc	43,68 c	38,07 b
<i>B. cereus</i> 82	16,25 d	30,43 d	25,95 d
<i>B. cereus</i> 88	7,32 f	23,71 e	22,73 d

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$), según el test LSD Fisher, entre los distintos tratamientos para un mismo hongo. CK31 y CK43: aislamientos regionales de *Cercospora kikuchii*. CK6711: *Cercospora kikuchii* NBRC 6711.

De todas las bacterias ensayadas, *B. subtilis* 94 fue la que presentó la mejor actividad antagonista. Dicho aislamiento produjo el mayor porcentaje de inhibición frente a los tres hongos estudiados (78,95%, 77,18% y 70,51% frente a CK31, CK43 y CK6711, respectivamente) (Tabla 3, Fig. 4); fue capaz de disminuir en mayor medida la velocidad de crecimiento (Tabla

1) e incrementó significativamente el tiempo de latencia durante el cultivo dual (Tabla 2). Numerosos estudios sugieren la utilización de *B. subtilis* para controlar biológicamente diversos hongos fitopatógenos, tales como *Cercospora beticola* Sacc. (15), *Rhizoctonia solani* (25), *Botrytis cinerea* (32), *Colletotrichum gloeosporioides* (33) y *Penicillium digitatum* (11).

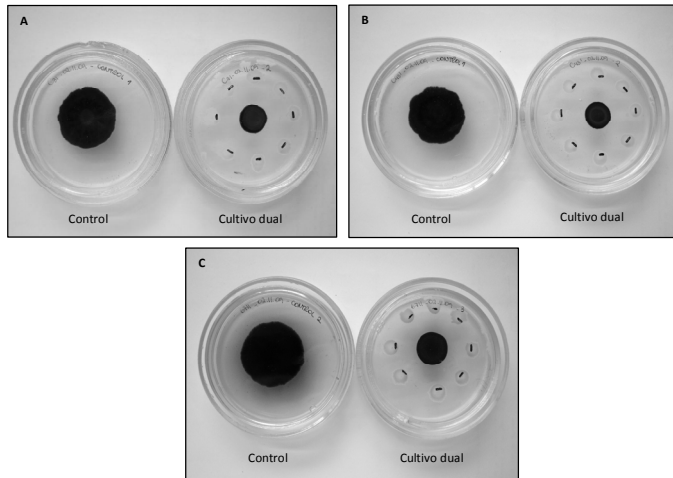
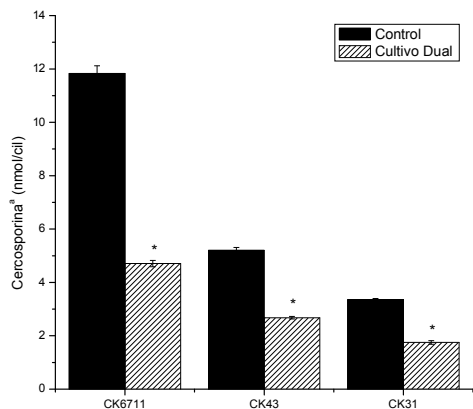


Figura 4: Antagonismo de *Bacillus subtilis* 94 frente a *Cercospora kikuchii*. A: Frente a *Cercospora kikuchii* 31. B: Frente a *Cercospora kikuchii* 43. C: Frente a *Cercospora kikuchii* NBRC 6711. Observación personal.

Al cuantificar la cercosporina, se observó que la presencia de *B. subtilis* 94 redujo significativamente ($p \leq 0,05$) la acumulación de dicha toxina en el medio de cultivo de *C. kikuchii* (Fig. 5). La concentración de cercosporina disminuyó un 60%, 49% y 48% para CK6711, CK43 y CK31, respectivamente. Esta reducción podría deberse a una degradación de la toxina por parte de la bacteria analizada. Al respecto, Mitchell y col. (34) identificaron ciertas cepas bacterianas capaces de detoxificar y degradar la cercosporina y, entre ellas, hallaron un aislamiento de *B. subtilis* que demostró disminuir la cantidad de toxina en un 82%. Este hallazgo podría ser muy importante a la hora de prevenir la infección de *C. kikuchii*, ya que la produc-

ción de cercosporina es fundamental para generar la infección en la planta hospedante y determinar el daño (5, 6). Otros autores también reportaron una disminución en la acumulación de toxinas producidas por hongos cuando los mismos son enfrentados a ciertas cepas bacterianas. Carvaglieri y col. (35) demostraron que *Arthrobacter globiformis* RC5 y *Azotobacter armeniacus* RC2 fueron capaces de suprimir la acumulación *in vitro* de fumonisina B1 producida por *Fusarium verticillioides*. Nesci y col. (30) reportaron que distintas cepas de *B. subtilis* (RCB 6, RCB 55, RCB 90) y *Pseudomonas solanacearum* (RCB 110) inhibieron la acumulación *in vitro* de aflatoxina B1 producida por *Aspergillus section Flavi*.



Los resultados hallados sugieren que *B. subtilis* 94 podría ser un microorganismo con gran potencial para controlar biológicamente a *C. kikuchii*. Sin embargo, no se deberían descartar las otras bacterias analizadas, las que mostraron cierta capacidad antagonista, hasta realizar posteriores estudios en soja. Se debe tener en cuenta que el antagonismo de un microorganismo hacia un determinado patógeno en un medio de cultivo no puede ser considerado como evidencia de que dicho microorganismo tendrá el mismo efecto en el control del patógeno en el campo (36). Es por esto que resulta de fundamental importancia continuar los estudios para determinar la verdadera utilidad de las bacterias ensayadas, en el control biológico de *C. kikuchii*. También resulta necesario investigar el impacto ecológico que podría causar el antagonista sobre la superficie de la soja antes de recomendarlo para el biocontrol.

Conclusiones

La mayoría de las bacterias estudiadas presentaron efecto inhibitorio *in vitro* frente a *C. kikuchii*. *B. subtilis* 94 fue el aislamiento

Figura 5: Efecto de la presencia de *Bacillus subtilis* 94 sobre la acumulación de cercosporina en el medio de cultivo de *Cercospora kikuchii*.

^a Concentración de cercosporina determinada por espectrometría a 480 nm, promedio de dos determinaciones.

* Diferencia significativa respecto al control ($p \leq 0,05$), según test-T.

CK31 y CK43: aislamientos regionales de *Cercospora kikuchii*. CK6711: *Cercospora kikuchii* NBRC 6711.

que exhibió la mejor actividad antagonista y redujo significativamente la acumulación de la cercosporina.

Agradecimientos

A la UNL que financia el proyecto CAID 2009 "*Cercospora kikuchii*: influencia de su variabilidad genética y de factores de patogenicidad en el comportamiento frente a compuestos fungicidas. Detección precoz de la infección", dentro del cual se realizó el presente trabajo.

Nota

Resultados parciales del trabajo fueron presentados en el XIII Encuentro de Jóvenes Investigadores de la UNL y IV Encuentro de Jóvenes Investigadores de Universidades de Santa Fe.

Referencias bibliográficas

1. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimento, 2009. Estimaciones Agrícolas. <http://www.minagri.gob.ar/site/index.php>
2. Pautasso, J. M. y Formento, N., 2006. Control químico de las enfermedades en soja.

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. INTA Paraná. http://www.inta.gov.ar/PARANA/info/documentos/produccion_vegetal/soja/enfermedades/20320_060915_contr.htm

3. Cai, G. y Schneider, R. W., 2005. Vegetative compatibility groups in *Cercospora kikuchii*, the causal agent of cercospora leaf blight and purple seed stain in soybean. *Phytopathol.* **95**, 3: 257-261.

4. Vallone, S.; Gadban, L.; Masiero, B. y Pochettino, A., 2003. Diagnóstico y manejo de enfermedades de fin de ciclo en soja en lotes de productores de Marcos Juárez y su zona de influencia. INTA Marco Juárez. <http://www.inta.gov.ar/mjuarez/info/documentos/soja/enfncic03res.htm>

5. Daub, M. E. y Ehrenshaft, M., 2000. The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin: Contributions to plant disease and fundamental biology. *Ann. Rev. Phytopathol.* **38**: 461 - 490.

6. Upchurch, R. G.; Walker, D. C.; Rollins, J. A.; Ehrenshaft, M. y Daub, M. E., 1991. Mutants of *Cercospora kikuchii* altered in cercosporin synthesis and pathogenicity. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 10: 2940 - 2945.

7. Distéfano, S. G. y Gadbán, L. C., 2007. Panorama fitopatológico del cultivo de soja en la campaña 2006-2007. Soja Actualización 2007. Informe de Actualización Técnica. INTA, Estación Experimental Agropecuaria Marcos Juárez. **7**: 15-19.

8. Zavaleta-Mejía, E., 2000. Alternativas del manejo de las enfermedades de las plantas. *Terra.* **17**: 202 - 217.

9. Reinoso Pozo, Y.; Vaillant Flores, D.; Casadesús Romero, L.; García Pérez, E. y Pazos Álvarez-Rivera, V., 2007. Selección de cepas de *Bacillus* y otros géneros relacionados para el control biológico de hongos fitopatógenos. *Fitosanidad.* **11**, 1: 35 - 40.

10. Whipps, J. M., 2001. Microbial interaction and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* **52**: 487 - 511.

11. Leelasuphakul, W.; Hemmanee, P. y Chuenchitt, S., 2008. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biol. Technol.* **48**, 1: 113 - 121.

12. Cubeta, M. A.; Hartman, G. L. y Sinclair, J. B., 1985. Interaction between *Bacillus subtilis* and fungi associated with soybean seeds. *Plant Dis.* **69**, 6: 506 - 509.

13. Basha, S. y Ulaganathan, K., 2002. Antagonism of *Bacillus* species (strain BC121) towards *Curvularia lunata*. *Curr. Sci.* **82**, 12: 1457 - 1463.

14. Leifert, C.; Chidburee, S.; Hampson, S.; Wrkman, S.; Sigee, D.; Epton, H. A. S. y Harbour, A., 1995. Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* CL 45. *J. Appl. Bacteriol.* **78**, 2: 97 - 108.

15. Collins, D. P. y Jacobsen, B. J., 2003. Optimizing a *Bacillus subtilis* isolate for biological control of sugar beet *Cercospora* leaf spot. *Biol. Control.* **26**, 2: 153 - 161.

16. Fokkema, N. J., 1978. Fungal antagonism in the phyllosphere. *Ann. Appl. Biol.* **89**: 115 - 117.

17. Pitt, J. I. y Hocking, A. D., 1999. "Fungi and food spoilage". Aspen Publishers, Inc. (Maryland), **1**: 509 - 513.

18. Shashishara, S.; Lokesh, S.; Lingaraju, S. y Palakshappa, M. G., 2008. *In vitro* evaluation of microbial antagonists, botanicals and fungicides against *Phytophthora capsici* Leon the causal agent of foot rot of black pepper. *Karnataka J. Agric. Sci.* **21**, **4**: 527 - 531.

19. Dantigny, P.; Bensoussan, M.; Vasseur, V.; Lebrhi, A.; Buchet, C.; Ismaili-Alaoui, M.; Devlieghere, F. y Roussos, S., 2006. Standardisation of methods for assessing mould germination: A workshop report. *Int. J. Food Microbiol.* **108**, 2: 286 - 291.

20. Etcheverry, M.; Scandolaro, A.; Nesci, A.; Vilas Boas Ribeiro, M. S.; Pereira, P. y Battilani, P., 2009. Biological interactions to select biocontrol agents against toxigenic strains of *Aspergillus*

- flavus* and *Fusarium verticillioides* from maize. *Mycopathologia*. **167**, 5: 287 - 295.
21. Altman, D. G., 1991. "Practical statistics for medical research". Chapman and Hall. (London). 140 - 141.
22. Steel, R. y Torrie, J., 1993. "Comparaciones múltiples. Bioestadística. Principios y Procedimientos". McGraw-Hill. Ed. Segunda Edición. (México). 622.
23. Jenns, A. E.; Daub, M. E. y Upchurch, R. G., 1989. Regulation of cercosporin accumulation in culture by medium and temperature manipulation. *Phytopathol.* **79**, 2: 213 - 219.
24. Chung, K. R., 2003. Involvement of calcium/calmodulin signaling in cercosporin toxin biosynthesis by *Cercospora nicotianae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2: 1187 - 1196.
25. Montealegre, J. R.; Reyes, R.; Pérez, L.M.; Herrera, R.; Silva, P. y Besoain, X., 2003. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. *Elect. J. Biotechnol.* **6**: 116 - 127.
26. Leelasuphakul, W.; Sivanunsakul, P. y Phongpaichit, S., 2006. Purification, characterization and synergistic activity of β -1,3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. *Enzyme Micro. Techn.* **38**, 7: 990 - 997.
27. Rodas-Junco, B. A.; Magana-Sevilla, H. F.; Tun-Suarez, J. M. y Reyes-Ramirez, A., 2009. Antifungal activity of native *Bacillus* sp. stains against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Res. J. Biol. Sci.* **4**, 9: 985 - 989.
28. Trotel-Aziz, P.; Couderchet, M.; Biagiatti, S. y Aziz, A., 2008. Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. *Environ. Exp. Bot.* **64**, 1: 21 - 32.
29. Kildea, S.; Ransbotyn, V.; Khan, M. R.; Fagan, B.; Leonard, G.; Mullins, E. y Doohan, F. M., 2008. *Bacillus megaterium* shows potential for the biocontrol of septoria tritici blotch of wheat. *Biol. Control.* **47**, 1: 37 - 45.
30. Nesci, A. V.; Bluma, R. V. y Etcheverry, M. G., 2005. *In vitro* selection of maize rhizobacteria to study potential biological control of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxin production. *Eur. J. Plant Pathol.* **113**, 2: 159 - 171.
31. Sadfi, N.; Chérif, M.; Hajlaoui, M. R.; Boudabbous, A. y Bélanger, R., 2002. Isolation and partial purification of antifungal metabolites produced by *Bacillus cereus*. *Ann. Microbiol.* **52**: 323 - 337.
32. Hang, N. T. T.; Oh, S. O.; Kim, G. H.; Hur, J. S. y Koh Y. J., 2005. *Bacillus subtilis* S1-0210 as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* in strawberry. *J. Plant Pathol.* **21**, 1: 59 - 63.
33. Senghor, A. L.; Liang, W. J. y Ho, W. C., 2007. Integrated control of *Colletotrichum gloeosporioides* on mango fruit in Taiwan by the combination of *Bacillus subtilis* and fruit bagging. *Biocontrol Sci. Technol.* **17**, 8: 865 - 870.
34. Mitchell, T. D.; Chilton, W. S. y Daub, M. E., 2002. Biodegradation of the polyketide toxin cercosporin. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 9: 4173 - 4181.
35. Cavaglieri, L. R.; Andrés, L.; Ibáñez, M. y Etcheverry, M. G., 2005. Rhizobacteria and their potential to control *Fusarium verticillioides*: effect of maize bacterisation and inoculum density. *A. Van. Leeuw. J. Microb.* **87**, 3: 179 - 187.
36. Reddy, M. S. y Hynes, R. K., 1994. Relationship between *in vitro* growth inhibition of pathogens and suppression of pre-emergence damping-off and post-emergence root rot of white beans seedlings in the greenhouse by bacteria. *Can. J. Microbiol.* **40**: 113 - 119.