



■ Aplicación de *Bacillus subtilis* en el control de hongos presentes en semilla de cebolla. Evaluación de su efecto en plántulas de vivero y en cultivo.



ULL | Universidad de La Laguna

Víctor M. Luis Gorrín
Felipe Siverio de la Rosa
Santiago Perera Gozález
Catalina Tascón Rodríguez
Domingo Ríos Mesa



Marzo 2015



Esta publicación es gratuita.

Se autoriza su reproducción mencionando a sus autores:

Víctor M. Luis Gorrín

(Alumno de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria)

Felipe Siverio de la Rosa

(Dpto. de Protección Vegetal del ICIA - Gobierno de Canarias)

Santiago Perera Gozález

Catalina Tascón Rodríguez

Domingo Ríos Mesa

*(Servicio Técnico de Agricultura y Desarrollo Rural
Cabildo Insular de Tenerife)*

APLICACIÓN DE *BACILLUS SUBTILIS* EN EL CONTROL DE HONGOS PRESENTES EN SEMILLA DE CEBOLLA. EVALUACIÓN DE SU EFECTO EN PLÁNTULAS DE VIVERO Y EN CULTIVO.

Luis Gorrín, V., Siverio de la Rosa, F., Perera González, S., Tascón Rodríguez, C., Ríos Mesa, D.



1. RESUMEN

Aplicación de *Bacillus subtilis* en el control de hongos presentes en semilla de cebolla. Evaluación de su efecto en plántulas de vivero y en cultivo.

Autores: Luis-Gorrín, V.M., Siverio, F., Perera, S., Tascón C. y Ríos-Mesa, D.

Palabras claves: desinfección de semillas, control biológico, variedades locales, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., germinación, antagonismo. Serenade® Max.

Las semillas de variedades locales de cebolla distribuidas desde el Centro de Conservación de la Biodiversidad Agrícola de Tenerife (CCBAT) a los agricultores no se someten a ningún método de desinfección para el control fitosanitario. Con el fin de conocer la eficacia de un agente biológico como procedimiento de control se realizó este trabajo que se dividió en tres partes: Primera, evaluación de la cepa B1 de *B. subtilis* y de Serenade® Max (producto fitosanitario a base de *B. subtilis*) en el control de hongos presentes en semillas de siete lotes de seis variedades locales y su efecto en la germinación de las mismas. Segunda, efecto de la aplicación de Serenade® Max a las semillas sobre el desarrollo de las plántulas en vivero. Y por último, evaluación del efecto de la aplicación de Serenade® Max a las semillas y/o a las plántulas antes del trasplante sobre algunos parámetros productivos. Como resultado de este trabajo se obtuvo un protocolo de aplicación de Serenade® Max a las semillas que presentó una alta capacidad antagonista *in vitro* frente a *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp., principales hongos presentes en las semillas de las variedades locales testadas. Asimismo, la aplicación de Serenade® Max y de la cepa B1 a las semillas no influyó en el porcentaje de germinación y las plántulas obtenidas de semillas tratadas con Serenade® Max no se diferenciaron de las plántulas de semillas sin tratar. En campo, tanto las plantas cuyas semillas fueron tratadas con Serenade® Max como las plántulas tratadas con este mismo producto antes del trasplante tuvieron un comportamiento productivo similar al de las no tratadas.

2. INTRODUCCIÓN

En Canarias, la cebolla ocupa una superficie de cultivo de 402,1 ha con una producción de 8.761 t que se dedican al mercado interior (Gobierno de Canarias, 2011). El Centro de Conservación de la Biodiversidad Agrícola de Tenerife (CCBAT) lleva varios años caracterizando y seleccionando variedades locales de cebolla que distribuye a los agricultores. Este Centro busca métodos preventivos que puedan ser aplicados para el control de patógenos a las semillas que distribuye. Algunos hongos que producen enfermedades importantes del cultivo pueden ser transmitidos por semillas (Diekmann, 1997; El-Nagerabi y Abdalla, 2004; García, 2003). En ensayos de postcosecha con variedades locales de cebolla realizados por el CCBAT se identificaron hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Tascón, 2012) como responsables de las enfermedades más frecuentes en bulbos.

En estudios anteriores, los tratamientos con hipoclorito sódico o tirad, o los tratamientos térmicos no dieron resultados satisfactorios para la eliminación de microorganismos o afectaron a la germinación de las semillas. También se obtuvieron aislados de *Bacillus subtilis* de semilla de cebolla que inhibían el crecimiento fúngico *in vitro* y que podían resultar de interés para el tratamiento contra hongos de la semilla. ([Hernández et al.](#)

2012). Utkhede y Rahe (1983) describieron el efecto de *B. subtilis* sobre la pudrición blanca de la cebolla y cómo esta bacteria podía ser usada como agente de control biológico para el tratamiento de semillas. Estos autores comprobaron que su efecto beneficioso no se debía exclusivamente al antagonismo sobre los patógenos, sino que también influía positivamente en la germinación, desarrollo y rendimiento del cultivo.

Con estos antecedentes se establecieron para este estudio los siguientes objetivos:

3. OBJETIVOS

1.-Estudiar *in vitro* la eficacia de la aplicación de suspensiones o preparados a base de *B. subtilis* en el control de hongos de la semilla de cebolla y su influencia sobre la viabilidad de la misma.

2.-Obtener un procedimiento basado en la bacteria *B. subtilis* para mejorar las características fitosanitarias de las semillas suministradas por el Centro de Conservación de la Biodiversidad Agrícola de Tenerife (CCBAT) a los agricultores.

3.-Evaluar *in vivo* el comportamiento de plántulas desarrolladas a partir de semillas tratadas con *B. subtilis* en vivero.

4.-Evaluar en campo si el tratamiento con *B. subtilis* de las semillas y/o las plántulas antes del trasplante afecta a algunos parámetros productivos del cultivo.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1.- Preparación de los tratamientos con *B. subtilis*

La preparación de los tratamientos con *B. subtilis* que se utilizaron en los diferentes estudios de este trabajo se realizó de la siguiente forma:

- La cepa B1 de *B. subtilis* obtenida de semillas de cebolla (Hernández *et al.*, 2012), se sembró en placas de PDA que se incubaron 24 h a 25°C y se prepararon suspensiones de la bacteria en agua destilada estéril (ABS: 0,75).
- Serenade® Max se utilizó a una concentración de 5 g/l de producto en agua destilada estéril.

4.2.-Estudio *in vitro* de la eficacia de la aplicación de suspensiones o preparados a base de *B. subtilis* en el control de hongos de la semilla de cebolla

Se realizaron tres tratamientos: control, cepa B1 de *B. subtilis* y Serenade® Max. Las semillas de las variedades de cebolla (Tabla 1) se sumergieron en el tratamiento correspondiente durante 20 minutos y posteriormente se secaron. Una vez secas se distribuyeron en placas de PDA, que se incubaron 14 días a 25°C. Se realizaron cuatro repeticiones de cada tratamiento y variedad de 50 semillas por repetición. Tras 3, 7 y 14 días de incubación se evaluó el crecimiento de hongos y de bacterias. Los aislados fúngicos se caracterizaron e identificaron siguiendo criterios morfológicos.

Tabla 1. Lotes de semilla de cebolla de variedades locales estudiadas

Origen	Código del lote	Variedad	Lugar de recolección	Fecha de recolección
CCBAT	CBT02511	Guayonje	Tacoronte	2010*
CCBAT	CBT0511	Guayonje	Tacoronte	2013
CCBAT	CBT00118	Carrizal Alto	Buenavista del Norte	2003*
CCBAT	CBT02512	Carrizal Bajo	Buenavista del Norte	2010*
CCBAT	CBT02513	Masca	Buenavista del Norte	2010*
CCBAT	CBT00288	Ramblera Amarilla	San Juan de la Rambla	2004*
ICIA	-	Lanzarote	Lanzarote	2013

* En el CCBAT, las semillas de cebolla se almacenan a -4°C para mantener su viabilidad a largo plazo.



Foto 1. Tubos con semillas sumergidas en los diferentes tratamientos



Foto 2. Separación de las semillas del tratamiento

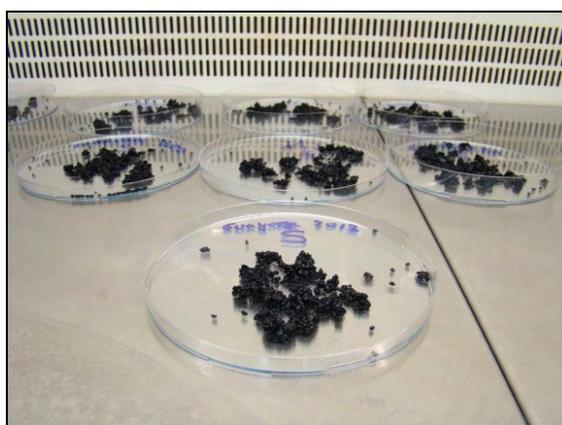


Foto 3. Colocación de las semillas en la cabina de flujo laminar para su secado.

4.3.- Ensayo de germinación *in vitro*

Las semillas se sembraron en papel de filtro sobre una lámina circular de algodón en placa de Petri de 15 cm, humedecido con 25 ml de agua destilada. Las placas se incubaron a 25 °C, 90% HR y 5000 lx. Se evaluó la germinación a los 6 y 12 días de incubación.

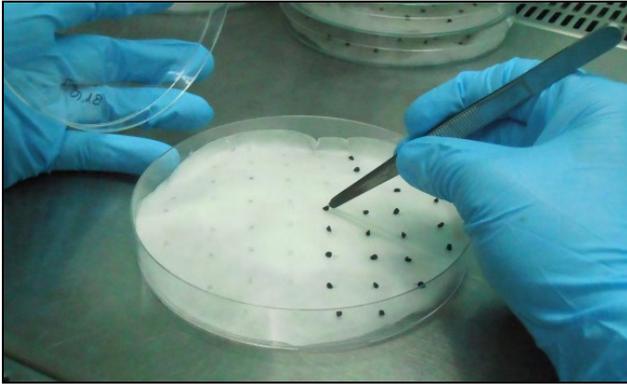


Foto 4. Colocación de las semillas tratadas en la placa de germinación



Foto 5. Placas de germinación colocadas en el fitotrón

4.4.- Persistencia del efecto de *B. subtilis* (cepa B1 y Serenade® Max) en la semilla tras dos meses de conservación

Las semillas tratadas se conservaron durante dos meses en un recipiente hermético a 4°C y tras este periodo se evaluó de nuevo el efecto de los tratamientos en el control de hongos de la semilla de cebolla y sobre la germinación, según se detalla en los apartados 4.2 y 4.3.

4.5.- Efectos de la aplicación de Serenade® Max a las semillas de cebolla sobre el desarrollo de las plántulas en vivero

Se realizó este estudio con el producto Serenade® Max y la variedad Carrizal Alto. Para ello se realizaron tres ensayos; uno en las instalaciones del ICIA y los otros dos en un vivero comercial. Las semillas se sembraron en bandejas de poliestireno expandido de 247 alveolos. En los tres ensayos se realizaron dos tratamientos: Serenade® Max y el control no tratado, con cuatro repeticiones de cada uno de ellos. Las semillas que se trataron con Serenade® Max se mantuvieron sumergidas durante 20 minutos en una solución de 5 g/l de producto, se secaron y se conservaron a 4°C hasta que se realizó la siembra pocos días después.



Foto 6.- Hidratación de la turba en el ensayo 1



Foto 7.- Bandejas sembradas en vivero en el ensayo 1

En la siguiente tabla se detallan las fechas de siembra y evaluación de los tres ensayos en vivero.

Tabla 2.- Fechas de siembra y evaluación de los tres ensayos de la fase de vivero

	Fecha de siembra	Fecha de evaluación
Ensayo 1 (ICIA)	04/12/2013	25/03/2014
Ensayo 2 (Vivero comercial)	11/04/2014	23/06/2014
Ensayo 3 (Vivero comercial)	31/07/2014	29/09/2014

Tras la fase de vivero se extrajeron aleatoriamente 20 plántulas de cada una de las bandejas de cada tratamiento para registrar el peso de raíces y parte aérea (balanza Mettler Toledo, modelo PB3002-S), previa eliminación de la turba del cepellón. También se determinó el porcentaje de materia seca de las mismas, para lo cual se introdujeron las muestras de raíces y parte aérea de las plántulas en una estufa (Heraeus, modelo UT6760) a 65°C hasta obtener un peso constante.

4.6.- Aislamiento de la bacteria de plántulas obtenidas de semillas tratadas con Serenade® Max

Para determinar la supervivencia de la bacteria en la rizosfera de las plántulas de vivero antes del trasplante se utilizó una modificación del método descrito por Reddy y Rahe (1989), y Schaad *et al.* (1990). Se seleccionaron aleatoriamente diez plántulas de cebolla de cada bandeja (tratamiento) y se sacudieron vigorosamente con la mano para eliminar el exceso de tierra. El sistema radicular entero y el suelo que quedó adherido se consideraron como rizosfera de la planta. Se separaron las raíces del bulbo con un escalpelo estéril, se pesaron, se colocaron en un matraz Erlenmeyer de un litro y se les añadieron 100 ml de PBS estéril (NaCl, 8 g/l; Na₂HPO₄·12H₂O, 27 g/l; NaH₂PO₄·2H₂O, 4 g/l; H₂O, 1l) con 0,05% de Tween 20. Se agitó durante 30 min a 100 rpm con un agitador (P-Selecta, modelo Rotaterm) a 25°C y se preparó una serie de cinco diluciones 1/10 en tubos de ensayo con PBS. Las diluciones se sembraron en placas de PDA, tres placas por dilución, y se incubaron durante siete días a 25°C. Pasado ese tiempo se estimó la concentración de bacterias por gramo de raíz más suelo adherido.

4.7.- Evaluación del comportamiento productivo en campo de plantas cuyas semillas y/o plántulas fueron tratadas con Serenade® Max

4.7.1.- Características de la finca

El ensayo se ubicó en una parcela perteneciente al ICIA situada en Valle de Guerra en el municipio de La Laguna y a una altitud de 314 msnm en zona de producción de hortalizas. La plantación se realizó en una parcela al aire libre con riego localizado y emisores de caudal nominal de 4 l/h. Se plantó en líneas separadas 15 cm con una distancia entre plantas de 15 cm, siendo la densidad de plantación de 44 plantas/m². Cada parcela experimental incluía 154 plantas en una superficie de 3,15 m². El trasplante se realizó el 25/03/2014.



Foto 8.- Parcela preparada para el trasplante



Foto 9.- Vista general de la parcela

Se utilizaron plántulas de la variedad Carrizal Alto del ensayo 1 (ver Tabla 2). El manejo del cultivo (riego, fertilización, labores culturales y tratamientos fitosanitarios) se realizó de acuerdo con las prácticas habituales de los agricultores de la zona. La cosecha se realizó el 28/07/2014.



Foto 10.- Vista general de un bloque de tratamientos



Foto 11.- Detalle de las cebollas de uno de los tratamientos

4.7.2.- Descripción de los tratamientos

El ensayo incluyó cuatro tratamientos con cuatro repeticiones y un diseño de bloques al azar. Los tratamientos fueron los que se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 3.- Tratamientos evaluados sobre plántulas en vivero

Tratamientos	Serenade® Max a la semilla	Serenade® Max a las plántulas
1	SÍ	NO
2	NO	SÍ
3	SÍ	SÍ
4	NO	NO

La aplicación del Serenade® Max a las semillas se describe en el apartado 4.5 y el tratamiento de las plántulas se realizó aplicando un litro de producto a una dosis de 5 g/l por bandeja de semillero antes del trasplante.

4.7.3.- Parámetros productivos evaluados

Al cosechar se registró el número de cebollas y el peso de la producción de cada parcela experimental para calcular el peso medio de los bulbos y el rendimiento productivo en kg/m².



Foto 12.- Plantas de cebolla tras la cosecha



Foto 13.- Cosecha de cebollas por tratamiento y repetición

4.8.- Diseño experimental, tratamiento estadístico de resultados y software utilizado.

El efecto de la aplicación de las cepas de *B. subtilis*, los porcentajes de germinación y los parámetros productivos obtenidos en la fase de campo se analizaron estadísticamente efectuando un análisis de varianza (ANOVA) con un diseño completamente al azar y separación de medias según la prueba de rango múltiple de Tukey ($p \leq 0,05$).

El efecto de la aplicación de Serenade® Max a las semillas de cebolla sobre el desarrollo de las plántulas en vivero se analizó estadísticamente con una comparación de dos medias mediante el test "t" para muestras independientes.

Puesto que los datos de porcentajes presentaron una distribución binomial caracterizada por varianzas pequeñas y mayores en los extremos, se realizó la transformación $\arcsen \sqrt{x}$ de los datos para aproximarlos a una distribución normal.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statistix 10.0.

5. RESULTADOS

5.1.- Estudio *in vitro* de la eficacia de la aplicación de suspensiones o preparados a base de *B. subtilis* en el control de hongos de la semilla de cebolla en el momento después de la aplicación de los tratamientos y a los dos meses de conservación

En la tabla 4 se muestra el resultado estadístico de los porcentajes de semillas con presencia de *B. subtilis* y con hongos por tratamiento y variedad. En las semillas de los controles de todas las variedades de cebolla se observó crecimiento de bacterias morfológicamente semejantes a *B. subtilis* aunque en porcentajes bajos, salvo en las correspondientes a la variedad Lanzarote, por lo que esta bacteria podría estar presente de forma esporádica en ellas. También crecieron otras bacterias en todas las semillas de los controles en una baja proporción, excepto en las variedades Lanzarote y Masca. En las semillas tratadas con *B. subtilis* (cepa B1 y Serenade® Max) el crecimiento bacteriano debido a la propia semilla quedó enmascarado por el de la bacteria inoculada.

Tabla 4. Resultado estadístico del porcentaje de semillas de cebolla de variedades tradicionales con crecimiento de *B. subtilis* y con crecimiento fúngico incubadas 14 días a 25°C en medio de cultivo PDA antes y después de la conservación

Variedad	Tratamiento	Porcentaje de semillas con crecimiento de <i>B. subtilis</i>		Porcentaje de semillas con crecimiento de hongos	
		Antes	Después	Antes	Después
Lanzarote*	Serenade® Max	92,0 a*	99,5 a*	9,0 a*	0,0 a*
	Cepa B1 de <i>B. subtilis</i>	86,5 a*	89,0 b*	14,5 a*	11,0 b*
	Control	0,0 b*	0,0 c*	100,0 b*	100,0 c*
	%CV	12,95	7,56	11,95	5,66
	p	0,00	0,00	0,00	0,00
Carrizal Bajo	Serenade® Max	100,0 a	100,0 a	0,0 a	0,0 a
	Cepa B1 de <i>B. subtilis</i>	100,0 a	100,0 a	4,5 a	13,0 b
	Control	6,5 b	7,5 b*	49,0 b*	79,0 c
	%CV	7,05	6,91	9,45	13,52
	p	0,00	0,00	0,00	0,00
Carrizal Alto	Serenade® Max	100,0 a	100,0 a	7,0 a	9,0 a
	Cepa B1 de <i>B. subtilis</i>	100,0 a	100,0 a	14,0 b	8,5 a
	Control	18,5 b	12,0 b	93,0 c	75,0 b
	%CV	6,08	7,00	10,91	11,75
	p	0,00	0,00	0,00	0,00
Guayonje (2010)	Serenade® Max	100,0 a	100,0 a*	0,0 a	0,0 a*
	Cepa B1 de <i>B. subtilis</i>	73,0 b	100,0 a*	18,0 b	24,0 b*
	Control	1,5 c	4,0 b*	100,0 c	81,0 c*
	%CV	11,05	3,10	9,92	19,7
	p	0,00	0,00	0,00	0,00
Guayonje (2013)	Serenade® Max	100,0 a	100,0 a	0,0 a	0,0 a
	Cepa B1 de <i>B. subtilis</i>	88,0 b	100,0 a	12,0 b	9,0 a
	Control	5,0 c	7,0 b	30,5 c	97,5 b
	%CV	17,58	5,06	3,96	8,47
	p	0,00	0,00	0,00	0,00
Masca	Serenade® Max	100,0 a	100,0 a	0,0 a	0,0 a
	Cepa B1 de <i>B. subtilis</i>	100,0 a	100,0 a	3,0 a	0,0 a
	Control	3,5 b	3,5 b	100,0 b	100,0 b
	%CV	2,61	2,61	10,12	10,04
	p	0,00	0,00	0,00	0,00
Ramblera	Serenade® Max	100,0 a	100,0 a	0,0 a	0,0 a
	Cepa B1 de <i>B. subtilis</i>	100,0 a	100,0 a	0,0 a	9,0 b
	Control	11,0 b	6,0 b	75,5 b	93,0 c
	%CV	3,67	5,38	3,97	6,96
	p	0,00	0,00	0,00	0,00

%CV: Porcentaje del coeficiente de variación. Los datos que se presenta en la tabla han sido sometidos a una transformación de $\arcsen \sqrt{x}$ para su análisis estadístico. Valores medios seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes según la prueba de rango múltiple de Tukey ($p \leq 0,05$). * Porcentajes obtenidos a los 3 días de siembra debido a la presencia de mucorales a partir de esta lectura.

En los tres tratamientos de las semillas de las variedades Lanzarote (siembras posteriores al tratamientos y después de almacenadas) y Guayonje (2010) (sólo siembras posteriores a los tratamientos) se detectaron hongos pertenecientes al Orden Mucorales de crecimiento rápido a partir del tercer día, que ocuparon toda la placa e impidieron la observación del crecimiento de otros microorganismos. Por tanto, no hay datos de las lecturas a 7 y 14 días para estos lotes, y el estudio estadístico se realizó con los datos a los 3 días. En

el resto de los lotes de semilla el estudio estadístico se realizó con los datos obtenidos a los 14 días.

Los resultados del estudio estadístico de la tabla 4 muestran diferencias significativas entre las semillas control y las semillas tratadas (cepa B1 de *B. subtilis* y Serenade® Max) en todos los lotes de semillas. También se observó, en semillas de Guayonje antes de la conservación, diferencias significativas entre los tratamientos con *B. subtilis* (cepa B1 de *B. subtilis* y Serenade® Max), aunque con valores muy próximos.

En la tabla 5 se muestra el análisis estadístico agrupando todas las variedades de semilla de cebolla y se expone el comportamiento de los tres tratamientos (control, cepa 1 de *B. subtilis* y Serenade® Max) respecto a las semillas con presencia de *B. subtilis* y a las semillas con presencia de hongos. Se observaron diferencias significativas entre los controles y las semillas tratadas (cepa B1 de *B. subtilis* y Serenade® Max) en todos los lotes de semillas. Únicamente se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con *B. subtilis* (cepa B1 de *B. subtilis* y Serenade® Max) en el porcentaje de semillas con hongos tras el periodo de conservación, obteniendo las semillas tratadas con Serenade® Max un menor porcentaje de semillas con hongos que las tratadas con la cepa B1 de *B. subtilis*.

Tabla 5. Análisis estadístico de las diferencias encontradas entre tratamientos agrupando todas las variedades de semilla de cebolla en los estudios realizados inmediatamente después de los tratamientos y tras el periodo de conservación

Tratamiento	Porcentaje de semillas con <i>B. subtilis</i>		Porcentaje de semillas con hongos	
	Inmediatamente después	Tras el periodo de conservación	Inmediatamente después	Tras el periodo de conservación
Serenade® Max	98,8a	99,9a	2,3a	1,3a
Cepa B1 de <i>B. subtilis</i>	92,5a	98,4a	10,0a	10,7b
Control	6,6b	5,7b	78,3b	89,4c
%CV	11,1	4,7	24,2	11,6
p	0,00	0,00	0,00	0,00

%CV: Porcentaje del coeficiente de variación

En la tabla 6 y 7 se detallan por variedad de cebolla y tratamiento aplicado los porcentajes de semillas con microorganismos después de la aplicación y tras dos meses de conservación. Se observó crecimiento de hongos de las especies *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. en una considerable proporción de semillas de los controles de todos los lotes. Esta proporción se vio reducida con cualquiera de los dos tratamientos y sufrió algunas variaciones con el almacenamiento de las semillas. En seis de las siete variedades creció *Fusarium* sp., aunque se observaron variaciones entre tratamientos, almacenamiento y tiempo de incubación hasta la lectura. **De forma general, a medida que hay una mayor presencia de *B. subtilis*, disminuye el porcentaje de semillas con crecimiento fúngico.** En el Anexo I se incluyen fotografías con el efecto de la aplicación de los tratamientos en las diferentes variedades locales de cebolla.

Tabla 6.- Porcentajes de semillas de cebolla de variedades tradicionales con crecimiento fúngico o bacteriano incubadas 14 días a 25°C en medio de cultivo PDA después de la aplicación del tratamiento (media y desviación estándar)

Variedad	Tratamiento	Microorganismo				
		<i>B. subtilis</i>	Bacteria	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Fusarium</i>
Lanzarote*	Control	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	88,0 ± 0,8	12,0 ± 0,8	0,0 ± 0,0
	Cepa B1 de <i>B. subtilis</i>	86,5 ± 1,5	0,0 ± 0,0	14,5 ± 1,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	Serenade® Max	92,0 ± 0,8	0,0 ± 0,0	9,0 ± 0,8	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Carrizal Bajo	Control	6,5 ± 1,0	11,5 ± 1,8	24,5 ± 1,4	19,0 ± 1,5	5,5 ± 0,8
	Cepa B1 de <i>B. subtilis</i>	100,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	4,5 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	Serenade® Max	100,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Carrizal Alto	Control	18,5 ± 1,6	1,5 ± 0,4	88,5 ± 1,4	4,5 ± 0,8	0,0 ± 0,0
	Cepa B1 de <i>B. subtilis</i>	100,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	4,5 ± 0,5	7,0 ± 0,8	2,5 ± 0,4
	Serenade® Max	100,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,0 ± 0
Guayonje* (2010)	Control	1,5 ± 0,4	2,0 ± 0,4	97,0 ± 0,5	4,5 ± 0,6	0,0 ± 0,0
	Cepa B1 de <i>B. subtilis</i>	73,0 ± 2,3	6,5 ± 0,9	15,0 ± 0,8	3,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
	Serenade® Max	100,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Guayonje (2013)	Control	5,0 ± 0,8	8,5 ± 1,1	21,0 ± 1,6	9,0 ± 0,6	0,0 ± 0,0
	Cepa B1 de <i>B. subtilis</i>	88,0 ± 0,8	0,0 ± 0,0	8,0 ± 0,7	4,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
	Serenade® Max	100,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Masca	Control	3,5 ± 0,7	0,0 ± 0,0	19,5 ± 1,2	81,5 ± 1,3	0,0 ± 0,0
	Cepa B1 de <i>B. subtilis</i>	100,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,5 ± 0,6	0,5 ± 0,2	0,0 ± 0,0
	Serenade® Max	100,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Ramblera	Control	11,0 ± 1,4	4,5 ± 1	60,5 ± 2,5	10,0 ± 1	5,0 ± 0,9
	Cepa B1 de <i>B. subtilis</i>	100,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	Serenade® Max	100,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

*: Porcentaje obtenido a los 3 días debido a la presencia de mucorales a partir de esta lectura

Tabla 7.- Porcentajes de semillas de cebolla de variedades tradicionales con crecimiento fúngico o bacteriano incubadas 14 días a 25°C en medio de cultivo PDA después de la conservación (media y desviación estándar)

Variedad	Tratamiento	Microorganismo				
		<i>B. subtilis</i>	Bacteria	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Fusarium</i>
Lanzarote*	Control	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	Cepa B1 de <i>B. subtilis</i>	89,0 ± 0,8	0,0 ± 0,0	11,0 ± 0,8	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	Serenade® Max	99,5 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

Variedad	Tratamiento	Microorganismo				
		<i>B. subtilis</i>	Bacteria	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Fusarium</i>
Carrizal Bajo	Control	7,5 ± 6,4	3,0 ± 0,6	72,0 ± 2,4	2,0 ± 0,4	3,0 ± 0,5
	Cepa B1 de <i>B. subtilis</i>	100,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,5 ± 0,4	10,5 ± 0,9
	Serenade® Max	100,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Carrizal Alto	Control	12,0 ± 1,6	1,5 ± 0,4	67,5 ± 2,5	5,5 ± 0,8	2,5 ± 0,4
	Cepa B1 de <i>B. subtilis</i>	100,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	8,5 ± 0,7
	Serenade® Max	100,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	9,0 ± 1,0
Guayonje* (2010)	Control	4,0 ± 0,6	1,0 ± 0,4	71,0 ± 2,2	8,5 ± 0,8	1,5 ± 0,4
	Cepa B1 de <i>B. subtilis</i>	100,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	20 ± 2	0,0 ± 0,0	4,0 ± 0,5
	Serenade® Max	100,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Guayonje (2013)	Control	7,0 ± 0,9	1,0 ± 0,3	89,5 ± 1,5	5,0 ± 0,6	3,0 ± 0,5
	Cepa B1 de <i>B. subtilis</i>	100,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	6,5 ± 1	0,0 ± 0,0	2,5 ± 0,4
	Serenade® Max	100,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Masca	Control	3,5 ± 0,5	0,0 ± 0,0	56,0 ± 2,5	59,5 ± 2,2	2,5 ± 0,6
	Cepa B1 de <i>B. subtilis</i>	100,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	Serenade® Max	100,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Ramblera	Control	6,0 ± 0,8	2,5 ± 0,6	73,5 ± 2,2	15,0 ± 1,7	4,5 ± 0,8
	Cepa B1 de <i>B. subtilis</i>	100,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	6,5 ± 1,2	0,5 ± 0,2	2,0 ± 0,4
	Serenade® Max	100,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

*: Porcentaje obtenido a los 3 días debido a la presencia de mucorales a partir de esta lectura

5.2.- Ensayos de germinación

En la Tabla 8 se muestran los resultados de los porcentajes de germinación de semillas de los siete lotes de seis variedades locales que fueron tratadas con la cepa B1 de *B. subtilis* y con Serenade® Max inmediatamente después de la aplicación de los tratamientos y tras dos meses de conservación a 4°C. Se observó que todas las variedades locales no mostraban diferencias significativas entre tratamientos con respecto al porcentaje de germinación, excepto para la variedad Guayonje (2010) y Carrizal Bajo, a los 6 y 12 días de la siembra, respectivamente. En la primera de estas variedades, se observó que entre los tratamientos con la cepa B1 de *B. subtilis* y con Serenade® Max existieron diferencias significativas, pero no entre el tratamiento control y la cepa B1. En la variedad Carrizal Bajo hubo diferencias significativas entre el tratamiento con Serenade® Max y el control, sin embargo, no las hubo entre estos tratamientos y el realizado con la cepa B1.

Los porcentajes de germinación de cada variedad a los seis y doce días de la siembra después de dos meses de conservación de las semillas y su tratamiento estadístico se exponen en la Tabla 8. Se observaron diferencias significativas entre tratamiento en las variedades Carrizal Bajo a los 6 y 12 días, Guayonje 2010 a los 12 días y Ramblera a los 6 días. En la variedad Carrizal Bajo, a los seis días, se dieron diferencias significativas entre Serenade® Max y el control, pero no entre ellos y el tratamiento con la cepa B1; y a los 12 días, las diferencias significativas fueron entre la cepa B1 y Serenade® Max. En la variedad Guayonje 2010 se

observan diferencias significativas entre el tratamiento con la cepa B1 y el control. En la variedad Ramblera, las semillas del tratamiento control germinaron en una proporción muy baja a los 6 días por lo que dio lugar a diferencias significativas con los otros dos tratamientos, aunque la germinación se igualó a los 12 días.

A pesar de que se observaron diferencias significativas en algunas variedades, los valores de germinación fueron muy similares, por lo que las diferencias entre tratamientos no parecen revestir importancia en la germinación de las semillas y apuntan a que los tratamientos pueden ser utilizados sin que repercutan negativamente en ella.

Comparando los resultados de estas dos últimas evaluaciones de germinación (semillas evaluadas inmediatamente después de la siembra y semillas evaluadas tras 2 meses de conservación) se observó que los porcentajes de germinación a los seis días eran superiores en las semillas conservadas que en las evaluadas inmediatamente después de tratamiento.

Los resultados de los porcentajes de germinación evaluados inmediatamente después del tratamiento a las semillas muestran que el tratamiento con la cepa B1 de *B. subtilis* fue el que obtuvo más veces el mayor porcentaje de germinación en casi todas las variedades. Por el contrario, en la evaluación tras dos meses de conservación, el tratamiento con Serenade[®] Max obtuvo más veces porcentajes más elevados que la cepa B1. Es muy importante destacar que en ninguno de los ensayos de germinación se observaron anomalías en las raíces de las semillas germinadas.

Tabla 8. Porcentajes de germinación de cada variedad a los seis y doce días de la siembra después de la aplicación y tras dos meses de conservación de los tratamientos a las semillas y resultado del análisis estadístico

		Variedad Local													
		Lanzarote		Carrizal Alto		Carrizal Bajo		Guayonje (2010)		Guayonje (2013)		Masca		Ramblera	
Tratamiento / días		6	12	6	12	6	12	6	12	6	12	6	12	6	12
Después de la aplicación	Control	87,5 a	91,5 a	87,0 a	91,5 a	76,5 a	91,5 b	90,5 ab	90,5 a	49,0 a	90,5a	84,5 a	91,5 a	51,5 a	84,0 a
	Cepa B1 de <i>B. subtilis</i>	86,0 a	92,0 a	87,5 a	92,0 a	73,0 a	92,0 ab	89,5 b	90,0 a	55,5 a	94,5 a	87,5 a	93,5 a	58,5 a	85,5 a
	Serenade® Max	87,0 a	93,5 a	88,0 a	92,5 a	79,0 a	92,5 a	86,5 a	88,5 a	72,5 a	93,0 a	88,5 a	95,5 a	65,5 a	84,0 a
	%CV	4,67	3,95	6,02	2,72	4,88	4,46	7,15	25,89	2,12	1,79	4,69	2,92	4,44	3,88
	p	0,06	0,52	0,73	0,50	0,12	0,03	0,04	1,00	0,37	0,22	0,56	0,57	0,46	0,12
Tras dos meses de conservación	Control	84,5 a	95,5 a	87,0 a	93,0 a	86,5 a	89,5 ab	62,5 a	87,0 b	87,5 a	87,5 a	76,5 a	91,5 a	51,5 b	92,5 a
	Cepa B1 de <i>B. subtilis</i>	89,0 a	91,5 a	90,0 a	90,5 a	84,0 ab	94,5 a	76,5 a	93,5 a	87,5 a	90,0 a	83,0 a	95,5 a	81,0 a	90,0 a
	Serenade® Max	85,5 a	91,5 a	87,0 a	90,0 a	73,5 b	87,0 b	82,0 a	90,0 ab	88,0 a	88,5 a	84,5 a	93,0 a	78,0 a	91,5 a
	%CV	10,43	4,44	5,35	5,84	8,89	3,65	14,97	3,45	4,13	6,11	11,72	3,23	9,00	5,34
	p	0,76	0,33	0,18	0,70	0,02	0,02	0,19	0,04	0,97	0,66	0,48	0,22	0,00	0,77

%CV: Porcentaje del coeficiente de variación. Los datos que se presenta en la Tabla han sido sometidos a una transformación de arcsen $\sqrt{(x)}$ para su análisis estadístico. Valores medios seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes según la prueba de rango múltiple de Tukey ($p \leq 0,05$).

5.3.- Efecto de la aplicación de Serenade® Max a las semillas de cebolla sobre el desarrollo de las plántulas en fase de vivero

5.3.1.- Evaluación de las plántulas

En la tabla 9, 10 y 11 se exponen los pesos de la parte aérea, radicular y total de las plántulas antes del trasplante así como el porcentaje de materia seca de la parte aérea y radicular de cada tratamiento de los tres ensayos.

Tabla 9.- Resultados del análisis estadístico de peso y porcentaje de materia seca de la parte aérea y radicular de las plántulas antes del trasplante en el ensayo 1

Tratamientos	Peso parte aérea (g) ±SE	Peso parte radicular (g) ±SE	Peso total (g) ±SE	Porcentaje de materia seca (aérea) ±SE	Porcentaje de materia seca (radicular) ±SE
Control	27,7±2,9a	11,5±0,9a	39,2±3,9a	9,1±0,5a	5,9±0,5a
Serenade® Max	23,2±2,2a	11,3±1,2a	34,5±3,3a	9,3±0,2a	5,5±0,3a
p	0,2646	0,9441	0,3993	0,7629	0,6639

Los datos que se presenta en la Tabla están sometidos a una transformación de $\arcsen \sqrt{(x)}$ para su análisis estadístico. Valores medios seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes según la prueba test "t" para muestras independientes ($p \leq 0,05$). SE: Standard Error.

Tabla 10.- Resultados del análisis estadístico de peso y porcentaje de materia seca de la parte aérea y radicular de las plántulas antes del trasplante en el ensayo 2

Tratamientos	Peso parte aérea (g) ±SE	Peso parte radicular (g) ±SE	Peso total (g) ±SE	Porcentaje de materia seca (aérea) ±SE	Porcentaje de materia seca (radicular) ±SE
Control	261,0±27,0a	43,4±5,9a	304,5±32,9a	8,4±0,2a	7,2±0,3a
Serenade® Max	334,7±14,4a	44,9±2,1a	379,6±14,7a	8,1±0,2a	7,1±0,04a
p	0,0529	0,8227	0,0819	0,3688	0,6312

Los datos que se presenta en la Tabla están sometidos a una transformación de $\arcsen \sqrt{(x)}$ para su análisis estadístico. Valores medios seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes según la prueba test "t" para muestras independientes ($p \leq 0,05$) SE: Standard Error.

Tabla 11.- Resultados del análisis estadístico de peso y porcentaje de materia seca de la parte aérea y radicular de las plántulas antes del trasplante en el ensayo 3

Tratamientos	Peso parte aérea (g) ±SE	Peso parte radicular (g) ±SE	Peso total (g) ±SE	Porcentaje de materia seca (aérea) ±SE	Porcentaje de materia seca (radicular) ±SE
Control	189,8±5,2a	37,1±0,9a	226,9±4,7a	6,4±0,2a	5,3±0,3a
Serenade® Max	194,3±6,2a	42,2±2,1a	236,5±7,1a	6,8±0,08a	5,9±0,1a
p	0,6025	0,0715	0,3014	0,1045	0,1148

Los datos que se presenta en la Tabla están sometidos a una transformación de $\arcsen \sqrt{(x)}$ para su análisis estadístico. Valores medios seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes según la prueba test "t" para muestras independientes ($p \leq 0,05$) SE: Standard Error.

Los resultados del análisis estadístico muestran que no existen diferencias significativas entre las plántulas tratadas con Serenade® Max y las no tratadas, por lo que la aplicación de dicho producto para el control de hongos de semilla no produce efectos negativos durante esta fase.

5.3.2.- Aislamiento de la bacteria de plántulas obtenidas de semillas tratadas con Serenade® Max

En las unidades formadoras de colonias bacterianas observadas en los aislamientos de las raíces de las plántulas de los dos tratamientos no se observaron colonias de *B. subtilis*.

5.4.- Evaluación del comportamiento productivo en campo de plantas cuyas semillas y/o plántulas antes del trasplante, fueron tratadas con Serenade® Max

En la tabla 12 se exponen el resultado del análisis estadístico del número de cebollas cosechadas por metro cuadrado, los kilogramos por metro cuadrado y los gramos por cebolla.

Tabla 12.- Resultado del análisis estadístico de los parámetros productivos evaluados

Tratamientos	Rendimiento Kg/m ² ±SE	Cebollas cosechadas/m ² ±SE	Peso medio bulbo g /cebolla
Serenade® Max a semillas	7,98±0,35a	38,24±1,08a	141,86±6,16a
Serenade® Max a plántulas	7,73±0,56a	40,28±1,76a	137,39±10,0a
Serenade® Max a semillas y plántulas	7,14±0,41a	38,57±1,70a	126,91±7,24a
Control	7,35±0,28a	42,13±1,09a	130,58±5,0a
%CV	8,81	5,29	8,80
p	0,4258	0,1879	0,4232

%CV: Porcentaje del coeficiente de variación. SE: Standard error. Valores medios seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes según la prueba de rango múltiple de Tukey ($p \leq 0,05$).

Se observa que no existen diferencias significativas entre los tratamientos con respecto a los distintos parámetros productivos evaluados, por lo que la aplicación del producto Serenade® Max a las semillas en el control de hongos y/o a las plántulas antes del trasplante, no produce efectos negativos en la producción del cultivo.

6. DISCUSIÓN

En este trabajo se estudió el potencial de la bacteria *B. subtilis* para el control del crecimiento *in vitro* de hongos fitopatógenos a partir de la semilla. Se trabajó con un aislado de *B. subtilis* obtenido de semillas de cebolla que mostraban actividad antagonista en placa y del formulado comercial Serenade® Max (*B. subtilis* cepa QST 713). Se comparó el comportamiento de las semillas tratadas con la bacteria frente a las semillas no tratadas y se estudió la persistencia del tratamiento después de dos meses, simulando los efectos de la conservación refrigerada de las semillas antes de su plantación. Se trataron distintos lotes de semilla de distintas variedades y agricultores para ver si el tratamiento funcionaba de modo similar frente a diferentes poblaciones fúngicas y con distintas semillas. Se estudiaron los efectos del tratamiento con *B. subtilis* de la semilla en el crecimiento de las plántulas de cebolla en vivero y por último, se evaluó el comportamiento productivo en campo de plantas cuyas semillas y/o plántulas antes del trasplante fueron tratadas con *B. subtilis*.

Los tratamientos con la cepa B1 o con el formulado Serenade® Max inhibieron el crecimiento de los hongos detectados en las semillas de los mismos lotes sin tratar. El

tratamiento aplicado a las semillas mantiene sus efectos inhibidores después de varios meses de almacenamiento. Entre estos hongos se encontraban los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Estos tres hongos concuerdan con los principales encontrados por Hernández *et al.*, (2012), entre los géneros presentes en las variedades locales Guayonje, Masca y Carrizal Alto. También se observó la presencia de forma natural de *B. subtilis* en las semillas de las variedades locales de Tenerife como en aquel caso.

Basurto-Cadena (2006), demostraron que *B. subtilis* inhibía *in vitro* a *F. verticillioides*, obtenido en el cultivo de la fresa. Virgen *et al.*, (1990) obtuvieron una reducción en la incidencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* en plantas de sandía, mediante el tratamiento de la semilla con *B. subtilis*. Intha *et al.*, en el año 2013, demostraron que *B. subtilis* inhibía el 60% de los patógenos presentes en naranjas. Podile y Prakash (1996), demostraron que la aplicación de *B. subtilis* a las semillas de cacahuete produce una reducción en la incidencia de la podredumbre de la corona en un suelo infestado de *A. niger*.

Por otro lado, Utkhede y Rahe (1983) estudiaron cuatro aislados de la bacteria *B. subtilis* como agente de control biológico. Como resultado de ese estudio se demostró que *B. subtilis* presentaba inhibición *in vitro*. Lazarette, *et al.* (1994), aseguraron que el efecto benéfico de *B. subtilis* no se debe exclusivamente al antagonismo proporcionado a los patógenos sino que influye positivamente en la germinación, desarrollo y rendimiento del cultivo debido a la producción de sustancias promotoras del crecimiento y al mejoramiento de la nutrición de las plantas. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio tanto en la germinación, como en vivero y campo después del tratamiento con *B. subtilis* a las semillas y/o plántulas, no evidencian que esta bacteria haya actuado promoviendo un mayor desarrollo y rendimiento del cultivo, pues los resultados no difieren de los obtenidos en plantas no tratadas.

Los resultados del presente estudio coinciden con lo descrito por Castellanos *et al.*, (2005), en el que *B. subtilis* presenta una efectiva inhibición del crecimiento micelial de diferentes patógenos, después de haber sido sometida a un mayor tiempo de almacenamiento.

La aplicación de Serenade[®] Max en las semillas de cebolla demostró una alta eficacia en el control de hongos, esto confirma lo descrito por Martínez-López y Borbolla-Ibarra (2010), quienes comprobaron que la aplicación de Serenade[®] Soil (QST713) sin combinación con otros productos disminuyó los daños causados por *Fusarium spp.* en papa.

El producto comercial Serenade[®] Max actualmente no se encuentra autorizado por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente para su aplicación en semillas ni en el cultivo de cebolla. **La aplicación de este producto a las semillas de cebollas mediante inmersión en agua durante 20 minutos fue eficaz en el control de hongos y podría apoyar la solicitud de autorización en este cultivo y en este tipo de material vegetal.** Asimismo se considera interesante el estudio de este método de control en semillas de otras especies vegetales ya que podría ser un método aplicable en agricultura ecológica.

7. CONCLUSIONES

- 1. Los principales géneros fúngicos presentes en las semillas de cebollas de las variedades locales estudiadas fueron *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y hongos pertenecientes al orden Mucorales y esporádicamente *B. subtilis* entre otras bacterias.**
- 2. De forma general, se observó que a medida que hay una mayor presencia de *Bacillus subtilis* en las semillas, disminuye el crecimiento fúngico, llegando en múltiples casos a reducir al 100% la presencia de hongos en las semillas tratadas.**

3. **La conservación de las semillas durante 2 meses a 4°C no reduce los efectos del tratamiento con Serenade® Max en el control de hongos de la semilla, mientras que con la cepa B1 de *B. subtilis* dicho efecto se vio ligeramente reducido.**
4. **La germinación de las semillas de las variedades locales de cebolla no se vio afectada por la aplicación de tratamientos con la cepa B1 de *B. subtilis* ni con el formulado Serenade® Max.**
5. **La aplicación de Serenade® Max a las semillas no produjo efectos negativos en el desarrollo de las plántulas en vivero.**
6. **En las plántulas de semillas tratadas con Serenade® Max no se recuperó *Bacillus subtilis* de su rizosfera en el momento del trasplante.**
7. **La aplicación de Serenade® Max a las semillas y/o a las plántulas antes del trasplante no produjo efectos negativos en el cultivo.**
8. **La preparación y aplicación del tratamiento con Serenade® Max mediante inmersión de las semillas de cebolla durante 20 minutos se considera válido para su utilización como método de control de hongos en semilla de cebolla.**
9. **La aplicación de *B. subtilis* a semillas de otras especies agrícolas podría ser de interés como método de control de hongos fitopatógenos en el ámbito de la agricultura ecológica.**

8. AGRADECIMENTOS

Agradecemos la colaboración del CCBAT y al ICIA por suministrarnos las semillas de cebolla utilizadas en este trabajo, a Desirée Afonso Conservadora del CCBAT, por cedernos las semillas y por sus recomendaciones sobre el manejo de éstas, a Julio Hernández del Departamento de Protección Vegetal del Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, por su asesoramiento y ayuda en la identificación de los hongos detectados y al Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. Este trabajo ha formado parte del Trabajo de Fin de Carrera de Víctor Manuel Luis Gorrín con el objeto de obtener el título de Ingeniero Agrónomo.

9. BIBLIOGRAFÍA

- BASURTO CADENA, M. G., VÁZQUEZ ARISTA, M., FONT SAN AMBROSIO, M. J., GARCÍA JIMÉNEZ, J. 2006. **Estudio de la actividad in vitro de *Bacillus subtilis* frente a los hongos patógenos de fresón *Fusarium verticilloides* y *Rhizoctonia solani*.** Resúmenes del VII Congreso SEAE de Agricultura y Alimentación Ecológica. Zaragoza, del 18 al 23 de septiembre de 2006.
- CASTELLANOS, J. J., ORTIZ. L., OLIVA, P., DUEÑAS, J. M., FRESNEDA, J., FRAGA, S., MELENDEZ, O. 2005. **Estudios relacionados con el uso de *Bacillus subtilis* en el control**

- GARCÍA, M. M. 2003. **Plagas, enfermedades y fisiopatías del cultivo de la Cebolla.** Generalitat Valenciana. Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación. Valencia. 113 p.
- GOBIERNO DE CANARIAS. 2010. **Estadística Agraria de Canarias 2010.** Gobierno de Canarias. Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Aguas. 25 p.
- DIEKMANN, M. 1997. FAO/IPGRI. **Technical guidelines for the safe movement of germplasm Nº 18. Allium spp.** Food and Agriculture Organization of the United Nations-Rome/International Plant Genetic Resources Institute, Roma.
- EL-NAGERABI, S. A. F. y ABDALLA, R. M. O. 2004. **Survey of seedborne fungi of sudanese cultivars of onion, with new records.** Phytoparasitica, 32 (4) 413-416.
- HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ, J., PERERA GONZÁLEZ, S., SIVERIO DE LA ROSA, F. Y TASCÓN RODRÍGUEZ, C. 2012. [en línea] [consultado el 07/11/2014] **Estudio preliminar de tratamientos de desinfección de semilla de variedades locales de cebolla de Tenerife.** Cabildo de Tenerife. 15 p. Disponible en <http://www.agrocabildo.org/publicaciones_detalle.asp?id=473>
- LAZZARETE, E., MENTEN, J. O. Y BETTIO, W. I. 1994. **Bacillus subtilis antagónicos aos principales patógenos asociados a sementes de Feijao e trigo.** Fitopatología Venezolana (7). 42 – 46 p.
- MARTÍNEZ-LÓPEZ, E. Y BORBOLLA-IBARRA, S. 2010. [en línea] [consultado el 07/11/2014] **Efficacy of Serenade Soil (QST 713)TM, for Fusarium spp. control in potato in Los Mochis, Sinaloa.** XII Congreso Nacional de la papa. Tapalpa. Jalisco. México. <http://www.conpapa.org.mx/pdf/Memoria_del_Congreso_de_Papa_2010.pdf>
- PODILE, A.R. Y PRAKASH, A.P. 1996. **Lysis and Biological Control of Aspergillus niger by Bacillus subtilis AF 1.** Canadian Journal of Microbiology, 42(6), 533-538.
- REDDY, M. S. Y RAHE, J. 1989. **Growth effects associated with seed bacterization not correlated with populations of Bacillus subtilis inoculant in onion seedling rhizospheres.** Soil Biology and Biochemistry. 21 (3). 373-378.
- SCHAAD, N.W., SAETTLER, A.W. 1990. **Detection of Bacteria in Seed and Other Planting Material.**
- TASCÓN, C. 2012. **Las cebollas de Tenerife. Cultivo y variedades.** Centro de Conservación de la Biodiversidad Agrícola de Tenerife. Servicio Técnico de Agricultura y Desarrollo Rural. Cabildo Insular de Tenerife. 103 p.
- UTKHEDE, R., Y RAHE, E. 1983. **Effect of Bacillus subtilis on growth and protection of onion against white rot.** Journal of Phytopathology, 106, 199-203 p.
- VIRGEN, C.G., GARCÍA, J., Y ESPINOSA, J. L. 1990. **Control Biológico del marchitamiento de la sandía causada por Fusarium oxysporum f sp. niveum con**

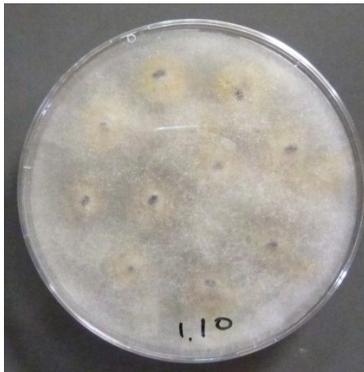
ANEXO

ANEXO I.- EFECTO DE LA APLICACIÓN DE LA CEPA B1 DE *B. SUBTILIS* Y SERENADE® MAX EN LAS DIFERENTES VARIEDADES LOCALES DE CEBOLLA

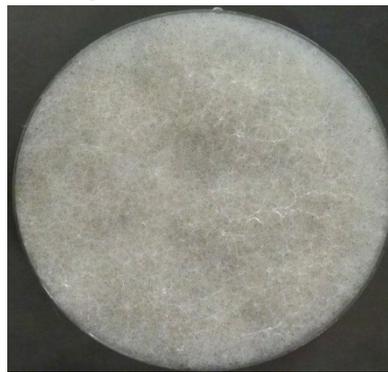
ANEXO I.1.- Inmediatamente después de la aplicación de los tratamientos

Lanzarote (14 días)

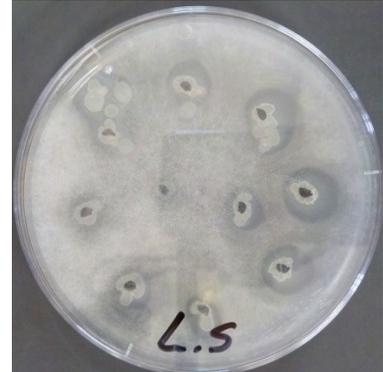
Control



Cepa B1 de *B. subtilis*



Serenade® Max

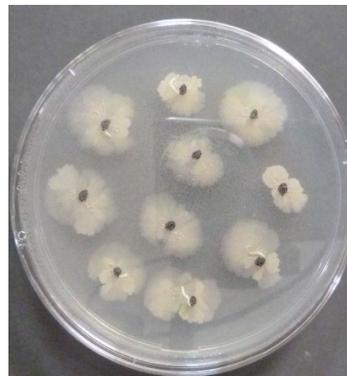


Carrizal Alto (14 días)

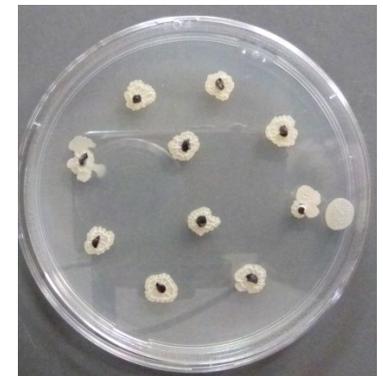
Control



Cepa B1 de *B. subtilis*



Serenade® Max

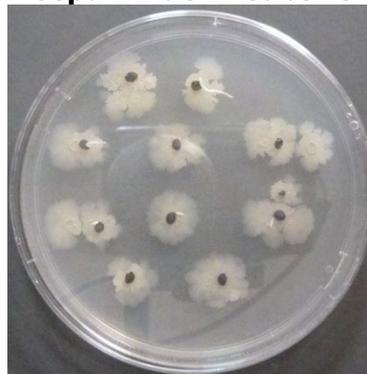


Carrizal Bajo (14 días)

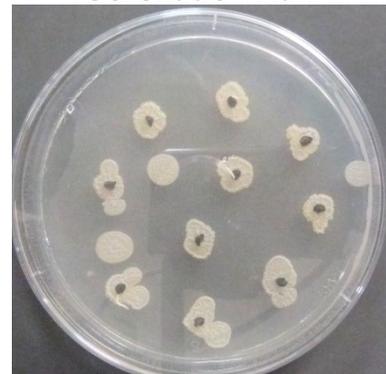
Control



Cepa B1 de *B. subtilis*



Serenade® Max



Guayonje, 2010 (14 días)

Control



Cepa B1 de *B. subtilis*



Serenade® Max



Guayonje, 2013 (3 días)

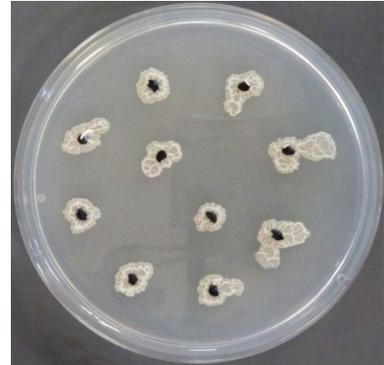
Control



Cepa B1 de *B. subtilis*

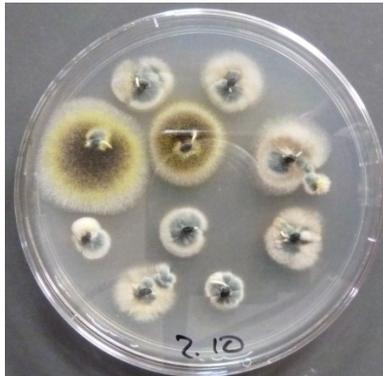


Serenade® Max

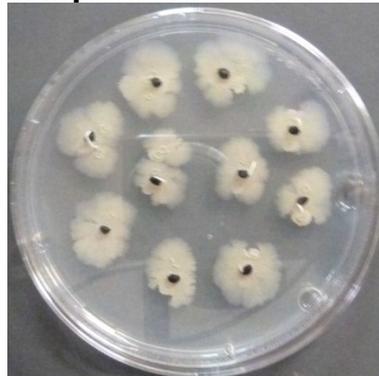


Masca (14 días)

Control



Cepa B1 de *B. subtilis*



Serenade® Max

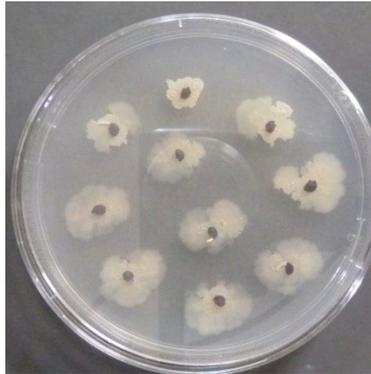


Ramblera (14 días)

Control



Cepa B1 de *B. subtilis*



Serenade® Max



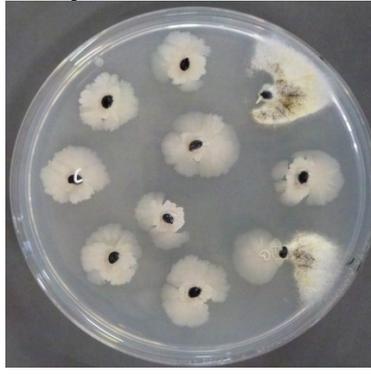
ANEXO I.2.- Tras dos meses de conservación después de la aplicación de los tratamientos

Lanzarote (3 días)

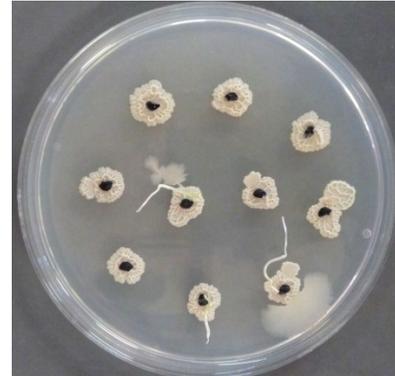
Control



Cepa B1 de *B. subtilis*



Serenade® Max



Carrizal Alto (14 días)

Control



Cepa B1 de *B. subtilis*



Serenade® Max

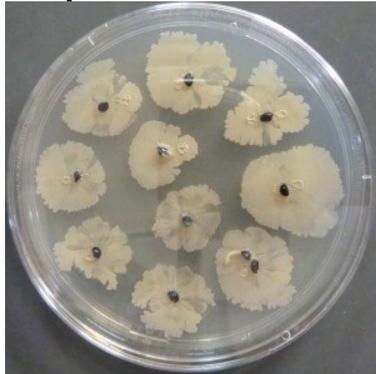


Carrizal Bajo (14 días)

Control



Cepa B1 de *B. subtilis*



Serenade® Max



Guayonje, 2010 (14 días)

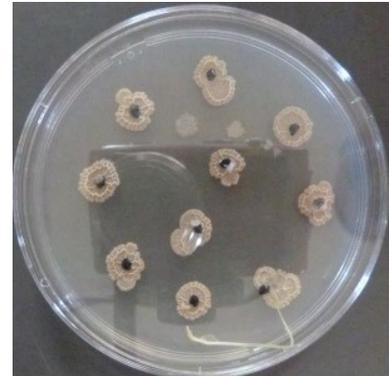
Control



Cepa B1 de *B. subtilis*



Serenade® Max



Guayonje, 2013 (14 días)

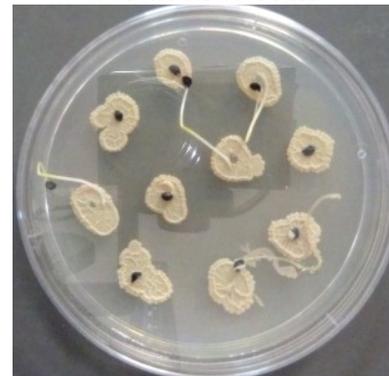
Control



Cepa B1 de *B. subtilis*



Serenade® Max



Masca (14 días)

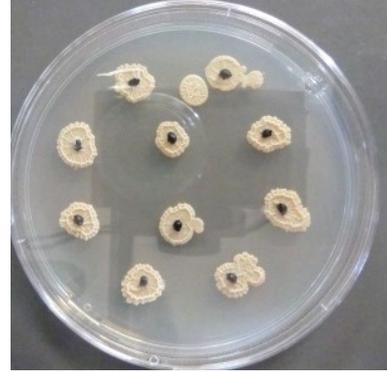
Control



Cepa B1 de *B. subtilis*



Serenade® Max

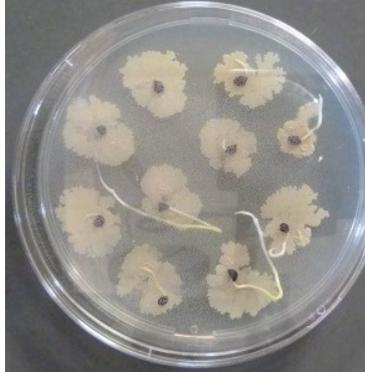


Ramblera (14 días)

Control



Cepa B1 de *B. subtilis*



Serenade® Max



Oficinas de Extensión Agraria y Desarrollo Rural

Oficina	Dirección	Teléfono	e-mail
Ud. Central S/C de Tenerife	C/ Alcalde Mandillo Tejera, 8.	922 239 275	servicioagr@tenerife.es
La Laguna	Plaza del Adelantado, 11 Ed. Apartamentos Nivaria	922 257 153	aeall@tenerife.es
Tejina	C/ Palermo, 2.	922 546 311	aeate@tenerife.es
Tacoronte	Ctra. Tacoronte-Tejina, 15	922 573 310	aeata@tenerife.es
La Orotava	Plaza de la Constitución, 4.	922 440 009	aealao@tenerife.es
Icod de los Vinos	C/ Key Muñoz, 5	922 815 700	aeaicod@tenerife.es
S.J. de la Rambla	Avda. 19 de marzo, San José	922 360 721	aeaicod@tenerife.es
El Tanque	C/ Pedro Pérez González s/n.	922 136 318	aeaicod@tenerife.es
Buenavista del Norte	C/ El Horno, 1.	922 129 000	aeabu@tenerife.es
Guía de Isora	Avda. de la Constitución s/n.	922 850 877	aeagi@tenerife.es
Valle San Lorenzo	Ctra. General, 122.	922 767 001	aeavsl@tenerife.es
Granadilla de Abona	San Antonio, 13.	922 774 400	aeagr@tenerife.es
Vilaflor	Avda. Hermano Pedro, 22.	922 709 097	aeagr@tenerife.es
Arico	C/ Benítez de Lugo, 1.	922 161 390	aeaar@tenerife.es
Fasnia	Ctra. Los Roques, 21.	922 530 058	aeaf@tenerife.es
Güímar	Plaza del Ayuntamiento, 8.	922 514 500	aeaguimar@tenerife.es
C.C.B.A.T.	C/Retama 2, Puerto de la Cruz Jardín Botánico	922 573 110	ccbiodiversidad@tenerife.es

Síguenos en:

www.agrocabildo.com

