

**EVALUACIÓN DE MICROORGANISMOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO
VEGETAL EN TOMATE (*Solanum lycopersicum*) VARIEDAD SANTA CLARA,
AISLADOS DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS DE HIGUERILLA (*Ricinus
communis*)**

CRISTIAN ALONSO RODRIGUEZ GONZALEZ

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:
Especialista en Microbiología Industrial**

**Director:
TERESA CABRA CENDALES M.Sc.**

**Codirector(es):
NAMER FERNANDO GALEANO
OMAR TAPASCO ÁLZATE M.Sc.**

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES
CENTRO DE INVESTIGACIÓN, PROYECCIÓN Y DESARROLLO
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA
AGROINDUSTRIAL
ESPECIALIZACIÓN EN MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
MANIZALES
2013**

Nota de aceptación

Firma de Director del Trabajo de Grado

Firma del presidente del Comité de Programa

Firma de integrante del Comité de Programa

Manizales, 15 de Enero de 2013

DEDICATORIA

***A MI JESÚS, POR SER MI ROCA Y MI FORTALEZA, MI LUZ Y MI SALVACIÓN,
A MIS PADRES, POR QUE HAN SIDO LUZ EN MI VIDA, POR BRINDARME SU
APOYO Y DARME SABIOS CONSEJOS EN LOS MOMENTOS CUANDO MÁS
LO NECESITABA.***

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darle sentido a todo lo que hago.

A mis padres por su apoyo incondicional.

A la Dra. Teresa Cabra por su sabia dirección en todos los aspectos que abarco este trabajo y por su apoyo incansable durante todo este tiempo.

Al Dr. Omar Tapasco quien por su asesoría técnica ha hecho posible este trabajo.

A Sandra Marulanda, quien nos colaboró siempre y nos apoyo con su conocimiento, a quien agradecemos por haber dispuesto de su tiempo para apoyarnos.

A Fernando Galeano, por su asesoría y tiempo invertido, quien nos proporcionó valiosos conceptos para el desarrollo de este trabajo.

A la Dra Gloria María Restrepo, que con sus sugerencias nos dio siempre dirección.

A las niñas de CALER, que siempre estuvieron pendientes de todo lo que necesitábamos.

CONTENIDO

1. OBJETIVOS	11
1.1 OBJETIVO GENERAL	11
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
2. MARCO TEORICO.....	12
2.1 RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL	12
2.1.1 Fitohormonas reguladoras del crecimiento vegetal	13
2.1.2 Producción de Auxinas por bacterias y plantas	13
2.1.3. Producción de Auxinas por PGRPs	14
2.1.4. Colonización de la raíz por PGRPs	16
2.1.5. Detección de Auxinas	16
2.1.6 Solubilización de fosfatos.	17
2.1.7 Mecanismos de acción en la solubilización microbiana de fosfatos.....	17
2.2 ANTAGONISMO MICROBIANO.....	18
2.2.1 El género <i>Bacillus</i> como antagonista de patógenos.	18
2.2.2 Mecanismos in vivo usados por <i>Bacillus subtilis</i> para el control de patógenos que afectan las plantas.....	19
2.3 LA QUITINA.....	20
2.3.1 Microorganismos quitinolíticos.....	21
2.4 EL TOMATE	22
2.5 CONSTRUCCIÓN DE ARBOLES FILOGENÉTICOS	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1 PRODUCCIÓN DE AIA Y SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS	25
3.1.1 Cuantificación de Ácido Indol-acético (AIA) por la técnica colorimétrica de Salkowski.	25
3.1.2 Desinfección de semillas	25
3.1.3 Esterilización de la turba.....	26
3.1.4 Preparación de Inóculos bacterianos.....	26
3.1.5 Recuento de microorganismos en el portador microbiano (Turba).....	26
3.1.6 Inoculación de semillas.....	26
3.1.7 Germinación y siembra de semillas.	26

3.1.8	Medición de parámetros de crecimiento	27
3.1.9	Solubilización de Fosfatos	28
3.2	PRUEBAS DE ANTAGONISMO	28
3.3	DETECCIÓN DE QUITINASAS	28
3.3.1	Preparación de la quitina coloidal	29
3.4	CONSTRUCCION DE ARBOLES FILOGENETICOS.....	29
3.4.1	Búsqueda y descarga de secuencias	29
3.4.2	Mapeo de Secuencias	29
3.4.3	Alineamiento de secuencias	29
3.4.4	Eliminación de secuencias redundantes	29
3.4.5	Construcción de arboles filogenéticos	30
3.4	ANÁLISIS DE DATOS.....	30
4.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	31
4.1	EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO INDOL-ACÉTICO ..	31
4.2	RECuento DE LA CONCENTRACION MICROBIANA EN LA TURBA.....	33
4.3	EFECTO DE <i>Bacillus subtilis</i> SOBRE LA GERMINACIÓN Y LA MORTALIDAD DE SEMILLAS DE TOMATE (<i>Solanum lycopersicum</i>) variedad <i>Santa Clara</i>).....	33
4.4	EFECTO PROMOTOR DEL CRECIMIENTO VEGETAL DE <i>Bacillus subtilis</i> EN TOMATE	36
4.5	SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS.....	40
4.6	PRUEBAS DE ANTAGONISMO	42
4.7	PRODUCCION DE QUITINASAS.....	43
4.8	CONSTRUCCION DE ARBOLES FILOGENETICOS.....	44
	CONCLUSIONES	49
	RECOMENDACIONES	50
	BIBLIOGRAFÍA.....	51

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Promotores de crecimiento producidos por algunos microorganismos	15
Tabla 2. Código de los microorganismos evaluados.....	24
Tabla 3. Clasificación de Duncan para la producción de AIA de cada microorganismo	32
Tabla 4. Recuento de <i>Bacillus subtilis</i> en la turba al inicio y final del ensayo.	33
Tabla 5. Matriz de correlaciones entre las variables estudiadas	37
Tabla 6. Matriz de correlaciones de las variables que permanecen.....	38
Tabla 7. Resumen de los resultados del ACP	39
Tabla 8. Microorganismos que solubilizaron fosfato en el medio PKV.....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rutas de síntesis de AIA en bacterias y plantas.	14
Figura 2. Estructura molecular de la quitina.....	20
Figura 3. Curva de calibración de AIA	31
Figura 4. Stock de soluciones de AIA usados para la curva de calibración.	32
Figura 5. Bandejas usadas para la germinación de las semillas con y sin inoculo.	34
Figura 6. Porcentaje de germinación por cada grupo.....	34
Figura 7. Porcentaje de germinación de semillas.....	35
Figura 8. Comparación entre la mortalidad de plantas con inoculo y sin inoculo	35
Figura 9. Dispersograma de las variables estudiadas.....	36
Figura 10. Primer plano factorial del ACP.....	38
Figura 11. Diagrama de sedimentación	39
Figura 12. Primer plano factorial del ACP con las variables retenidas.....	40
Figura 13. <i>Pseudomona fluorescens</i> , control positivo usado en la solubilización de fosfatos.....	41
Figura 14. <i>Bacillus subtilis</i> solubilizando fosfatos en PKV.....	41
Figura 15. <i>Bacillus pumilus</i> solubilizando fosfatos en PKV.....	41
Figura 16. Comparación del porcentaje de inhibición de <i>Fusarium equiseti</i> por cada cepa con respecto al control.....	42
Figura 17. Inhibición de <i>Fusarium equiseti</i> por <i>Bacillus subtilis</i>	43
Figura 18. <i>Serratia marcescens</i> , control positivo usado en la evaluación de quitinasas.....	44
Figura 19. Árbol filogenético basado en el gen ADNr 16S para 15 taxones bacterianos.....	46
Figura 20. Árbol filogenético basado en la región ITS para la cepa levaduriforme.....	47

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Medios de cultivo.....	56
ANEXO 2. Análisis de medias para el porcentaje de germinación de semillas con inóculo y sin inóculo.....	598
ANEXO 3. Análisis de medias para la mortalidad de plantas con inóculo y sin inóculo.....	609
ANEXO 4. Prueba de Duncan para la producción de AIA.....	60

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas ha surgido una tendencia hacia la producción limpia, cuyo fin es reducir el uso de insumos químicos para la fertilización y control de fitopatógenos que producen pérdidas agronómicas no solo en cultivos anuales sino también en cultivos perennes. Estos agroquímicos están implicados en la alteración de la microbiota natural del suelo, de manera que la reducen considerablemente y perjudican las interacciones benéficas entre el microorganismo y la planta. Por esta razón las investigaciones se han enfocado en la búsqueda de microorganismos que puedan ser usados para restablecer estas interacciones, al punto que sean empleados como biofertilizantes y/o biocontroladores, que mitiguen el impacto ambiental de los agroquímicos y reduzcan los costos de producción.

Al examinar los problemas derivados del empleo de plaguicidas es cada día más urgente la necesidad de buscar nuevas alternativas que reduzcan y ojalá eliminen el empleo de químicos. Adicionalmente, la acidez de los suelos es afectada con la aplicación de fertilizantes químicos, en la mayoría de casos los agricultores utilizan abonos nitrogenados, y su uso frecuente disminuye el pH del suelo, a un rango de acidez entre 3,5 y 5,0, lo que lo hace improductivo (Chien *et al.*, 2008).

En el mercado se consiguen insumos agrícolas que contienen microorganismos que actúan como promotores de crecimiento vegetal, pero son microorganismos aislados de ambientes diferentes que, en muchos casos, el cambio de condiciones hace que su funcionalidad se reduzca. Por tal motivo, es necesario identificar microorganismos nativos que actúen bajo las condiciones ambientales de la región y puedan usarse como alternativa al empleo de agroquímicos.

En respuesta a estas políticas de producción orgánica, en este trabajo, a 15 cepas bacterianas y 1 levaduriforme aisladas de residuos de higuera (*Ricinus communis*) fruto y torta, se les evaluó la capacidad promotora de crecimiento vegetal; comprobando la capacidad de cada cepa para producir Ácido Indol-acético y solubilizar fosfatos; su potencial antagonico frente al fitopatógeno *Fusarium equiseti* y su eficiencia en la producción de enzimas quitinolíticas. La cepa microbiana que mostró mayor producción de Ácido Indol-acético fue evaluada *in vivo* en la germinación de semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) variedad Santa Clara.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de promoción del crecimiento vegetal, de microorganismos aislados a partir de residuos de higuera (*Ricinus communis*)

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar en los microorganismos seleccionados, la capacidad de solubilización de fósforo y producción de ácido indol-acético como inductores del crecimiento vegetal, en semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*).
- Determinar la capacidad antagonista y quitinolítica de los microorganismos seleccionados a partir de aislamientos provenientes de residuos de higuera (*Ricinus communis*).
- Identificar la filogenia de los microorganismos evaluados.

2. MARCO TEORICO

2.1 RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL

El suelo es uno de los hábitats microbianos que presenta mayor diversidad, se estima que alberga cerca de 10^9 microorganismos por gramo de suelo y 10^4 especies diferentes por gramo de suelo. Estos microorganismos pueden interactuar en la rizosfera, con las raíces de las plantas, de modo que los exudados radicales, ricos en compuestos orgánicos les aportan gran variedad de nutrientes para llevar a cabo sus actividades metabólicas. En cuanto a la interacción que los microorganismos establecen con las plantas se pueden distinguir tres grandes grupos de comunidades microbianas, a saber:

1. Saprófitos: son microorganismos que utilizan la materia orgánica como fuente nutricional para llevar a cabo su actividad metabólica.
2. Patógenos: son los microorganismos responsables de muchas enfermedades en las plantas.
3. Simbiontes mutualistas: estos microorganismos benefician el desarrollo y nutrición de las plantas (Franco. M 2008)

De estos últimos, se han descrito diversos efectos benéficos, como la estimulación del desarrollo radicular y la germinación de las semillas de las plantas, debido a la producción de vitaminas, fitohormonas y otras sustancias. Muchos microorganismos mejoran las características estructurales del suelo, mediante la formación de agregados estables, resultado del crecimiento microbiano; varios están implicados en los ciclos biogeoquímicos de algunos nutrientes, de manera que actúan como biofertilizantes, aportando nutrientes al suelo.

También se ha encontrado que la resistencia de algunas plantas a factores estresantes de naturaleza biótica o abiótica se debe a la presencia de microorganismos capaces de establecer actividad antagonista frente a fitopatógenos, o que aumentan la tolerancia a la salinidad de los suelos o al déficit de agua. A estos microorganismos se les ha denominado, rizosféricos o rizobacterias, debido a la preferencia que tienen de interactuar en el sistema conformado por el suelo y la raíz. Estos microorganismos se conocen como microorganismos promotores de crecimiento vegetal (PGPR) y poseen diferentes mecanismos de acción:

1. Antagonismo o supresión de microorganismos fitopatógenos.
2. Proporcionando elementos biodisponibles para la planta (Biofertilizantes), como nitrógeno y fósforo.
3. Producción de fitohormonas (Bioestimulantes) (Saharan y Nehra, 2001).

Los bioestimulantes pueden actuar mediante la síntesis de reguladores de crecimiento, como auxinas y giberelinas, que producen un aumento en el desarrollo de pelos radicales y en la densidad misma de la raíz, manifestándose en el aumento de la capacidad de absorción de agua y captación de nutrientes, dando a la planta mayor viabilidad, productividad y resistencia a condiciones adversas como sequía (Saharan Y Nehra. 2001).

2.1.1 Fitohormonas reguladoras del crecimiento vegetal

Las fitohormonas son moléculas de bajo peso molecular, se les ha llamado "Reguladores del Crecimiento Vegetal", estas sustancias actúan en diversos tejidos diana, cumpliendo diferentes funciones fisiológicas, influyen en la división y diferenciación celular, dormancia y germinación de semillas, desarrollo de frutos y florecencia, actúan a concentraciones muy bajas y sus efectos varían de acuerdo a la interacción con otros reguladores (Celis y Gallardo. 2008). Se han descrito siete reguladores de crecimiento vegetal: auxinas, giberelinas, citoquininas, brasinosteroides, ácido abscísico, etileno y ácido jasmónico.

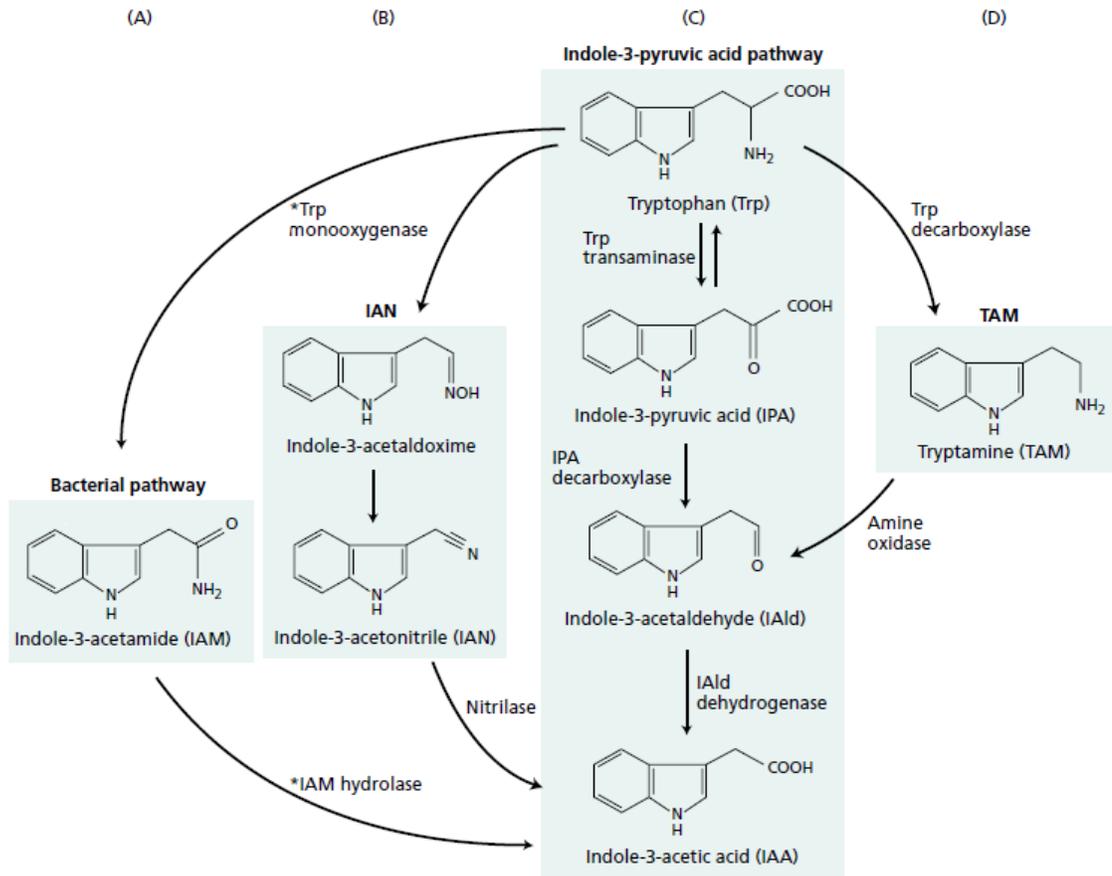
Las auxinas son naturalmente sintetizadas por la planta, son ampliamente utilizadas en el cultivo de hortalizas (Rodríguez y Martín. 2009) La auxina más común es el Ácido Indol-acético (AIA), que está íntimamente relacionada con los tropismos de la planta, como inclinaciones, giros o curvaturas del tallo; además, estimula el desarrollo del sistema radical de la planta, interviene en los procesos de división celular, estimula el desarrollo de frutos y número de hojas (Franco. M 2008). Las rizobacterias que sintetizan auxinas pueden producir AIA, a partir de triptófano que es exudado por la raíz de las plantas, este actúa como un precursor en la síntesis del AIA. (Loredo et al. 2004)

2.1.2 Producción de Auxinas por bacterias y plantas

El ácido indol-acético (AIA) es sintetizado en las plantas por medio de tres rutas diferentes, la ruta de triptamina (TAM), en donde la descarboxilación del triptófano origina triptamina, que por la acción de diversas enzimas es llevada finalmente a Ácido 3-Indol-acético. La ruta del indol 3-piruvato (IPA), en donde la triptamina (TAM) puede actuar como intermediaria y es transformada por acción enzimática hasta Indol 3 acetaldéido (IAId), y la ruta del indol 3-acetonitrilo (IAN), donde el triptófano es descarboxilado a indol 3 acetaldéido (IAOx) y a indol 3-acetonitrilo (IAN) y finalmente es convertido en Acido 3-Indol-acético.

Las bacterias, pueden sintetizar el ácido Indol-acético mediante una ruta metabólica que transforma el triptófano en Indol 3-acetamida (IAM) por acción de la triptófano mono-oxigenasa, y posteriormente a Ácido 3-Indol-acético por acción de la Indol 3-acetamida hidrolasa (Taiz y Zeiger. 2010).

Figura 1. Rutas de síntesis de AIA en bacterias y plantas.



Fuente: (Taiz y Zeiger, 2010)

Las enzimas exclusivas de bacterias, se identifican con un asterisco

2.1.3. Producción de Auxinas por PGRPs

En respuesta al impacto ambiental causado por el uso de agroquímicos la comunidad científica ha puesto su mirada en los microorganismos benéficos o rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGRP), capaces de estimular el crecimiento y desarrollo de las plantas. Los PGRP median a favor de las plantas por medio de complejas interacciones. La diversidad microbiana del suelo interactúa con la raíz y establece procesos simbióticos que benefician el desarrollo posterior de la planta. Estudios recientes demuestran que son muchos los microorganismos implicados en la ecología microbiana del suelo que utilizándolos correctamente pueden incluso reemplazar el uso de agroquímicos. (Cordis 2011)

En la actualidad se conoce una amplia diversidad de géneros y especies microbianas capaces de estimular el desarrollo de las plantas, algunos de estos PGRP se mencionan en la tabla 1.

Tabla 1. Promotores de crecimiento producidos por algunos microorganismos.

Promotor de crecimiento	Microorganismos productores
AIA	<i>Azospirillum brasilense</i> , <i>Azospirillum lipoferum</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Xanthomonas</i> , <i>Pseudomonas</i>
Giberelinas	<i>Agrobacterium sp.</i> , <i>Micrococcus spp.</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Azospirillum lipoferum</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> .
Giberelinas y Citoquina	<i>Azospirillum brasilense</i> , <i>Arthrobacter giacomelloi</i> .
AIA, Giberelinas y Citoquina	<i>Azospirillum paspali</i> , <i>Azotobacter spp.</i> , <i>Acinetobacter spp.</i> , <i>Agrobacterium sp.</i> , <i>Bacillus spp.</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Xanthomonas</i> , <i>Flavobacterium spp.</i>

Fuente: (Mantilla, 2007)

Sin embargo en los últimos años se ha creado controversia acerca de cuándo una rizobacteria se puede considerar promotora de crecimiento vegetal (PGRP), por lo que se han definido los siguientes criterios para determinarlo:

1. Que no invadan los tejidos internos de la planta, como ocurre con los hongos micorrízicos.
2. Que alcance una elevada concentración microbiana en la rizósfera, de modo que pueda realizar el efecto deseado.
3. Que puedan colonizar efectivamente la superficie de la raíz.
4. Que no afecte al hombre ni a otros microorganismos benéficos (Mantilla, 2007)

Se ha descrito la capacidad de muchos microorganismos (PGRP) para sintetizar auxinas, como el Ácido Indol-acético, siendo *Azospirillum* y *Azotobacter* algunos de los géneros más estudiados. También se han reportado cepas del género *Pseudomonas* capaces de sintetizar auxinas (Celis Y Gallardo 2008), y otros géneros como *Rhizobium* y *Bacillus*. Los microorganismos del género *Bacillus*

causan un efecto benéfico en las plantas mediante la producción de biosurfactantes y antibióticos, solubilización de fosfatos, o por medio de actividad antagónica frente a otros microorganismos fitopatógenos (Rodríguez y Martín, 2009).

2.1.4. Colonización de la raíz por PGRPs

Los microorganismos de la rizósfera pueden clasificarse desde el punto de vista ecológico, como de vida libre o asociativa. Los de vida libre se unen directamente a la raíz sin necesidad de establecer previamente poblaciones en la rizósfera, además pueden establecerse en la rizósfera sin que haya raíces y realizar normalmente sus actividades biológicas, lo que significa que no requieren estrictamente estar asociados a un hospedero. Los asociativos, necesitan de un hospedero para realizar sus procesos biológicos, y actuar como promotores de crecimiento vegetal.

Aún no están muy claros los procesos que median en la colonización radical, la forma en que las bacterias son atraídas hacia la raíz parece estar relacionada con la mayor producción de fuentes de carbono, mayor cantidad de agua disponible, o la atracción de muchos microorganismos por un gradiente de concentración nutricional o de otros estímulos hacia la planta (quimiotaxis, movimiento y adhesión).

Los genotipos tanto vegetal como microbiano, también pueden estar involucrados en la especificidad de asociación planta-microorganismo, de manera que estas uniones específicas son determinantes en los resultados de dicha asociación. Sin embargo hasta ahora solamente se ha encontrado un microorganismo, *Azotobacter paspali*, promotor del crecimiento vegetal asociado estrictamente, al pasto Bahía (*Paspalum notatum*). Esto ha generado en la comunidad científica algunos interrogantes sobre la forma en que se llevan a cabo los mecanismos de adhesión a la superficie de la raíz (Loredo et al. 2004)

2.1.5. Detección de Auxinas

La técnica colorimétrica de Salkowski es el método más utilizado para hacer estimaciones cuantitativas y cualitativas en la determinación de Ácido Indol-acético (AIA). El reactivo de Salkowski originalmente lleva en su composición ácido perclórico, este ácido oxida las moléculas de indol presentes en el AIA, generando una coloración que va de rosado a fucsia, sin embargo algunas modificaciones hechas al reactivo han permitido sustituir el ácido perclórico que es de alto costo por ácido sulfúrico, obteniéndose coloraciones semejantes. La técnica colorimétrica de Salkowski se basa en la cantidad de energía electromagnética que absorbe el AIA, se ha determinado que la longitud de onda a la que ocurre la mayor absorbancia de una solución de AIA es a 530 nanómetros, esto ha permitido hacer detecciones de esta auxina en caldos microbianos suplementados con triptófano (Celis y Gallardo 2008)

La detección de AIA con HPLC también se ha realizado con éxito en caldos de fermentación microbianos, este método permite alta sensibilidad, linealidad y especificidad, no obstante su mayor limitante es el factor económico porque requiere de recursos costosos. (Castillo et al. 2005; Tien et al. 1979)

2.1.6 Solubilización de fosfatos.

El fósforo es un componente de muchas estructuras celulares, como el DNA, y el RNA, además forma parte de fosfolípidos que componen algunas membranas biológicas dentro de la célula. El fósforo generalmente es absorbido por las plantas en forma de fosfato diácido (H_2PO_4^-) en suelos ácidos y como fosfato monoácido (HPO_4^{2-}) en suelos alcalinos, sin embargo estos compuestos pueden reaccionar fácilmente con algunos elementos presentes en el suelo, como el Hierro (Fe), Aluminio (AL) y Manganeseo (Mn) en suelos ácidos y con Calcio (Ca) y Magnesio (Mg) en suelos alcalinos, formando fosfatos altamente insolubles, que no están biodisponibles para las plantas. (Paredes y Espinosa 2010).

Algunos microorganismos del género *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Bacillus* han mostrado una alta capacidad para solubilizar fosfatos (Bernal 2010), pero esta propiedad no es exclusiva de protistas, ya que algunos hongos del género *Penicillium* y *Aspergillus* tienen alta capacidad para solubilizar fosfatos. (Patiño C. 2010)

2.1.7 Mecanismos de acción en la solubilización microbiana de fosfatos.

Producción de fosfatasas

La acción de las enzimas extracelulares que algunos microorganismos producen permite transformar macromoléculas presentes en el suelo y llevarlas a moléculas más pequeñas y asimilables por la planta, las fosfatasas básicamente actúan sobre la materia orgánica a través de tres grupos de enzimas:

Fosfatasas no específicas: defosforilan los enlaces fosfoéster o fosfoanhídros que hay en la materia orgánica

Fitasas: promueven la liberación del fósforo del ácido fítico del suelo

Fosfonatasas y liasas: permiten la división de los enlaces Carbono-Fósforo (C-P) de los fosfonatos orgánicos (Patiño, 2010; Paredes y Espinosa, 2010)

Solubilización por ácidos orgánicos

La solubilización de fosfatos por medio de la producción de ácidos orgánicos es uno de los mecanismos más frecuentes, se ha demostrado que los ácidos que intervienen en la solubilización de fosfatos como el ácido glucónico producido por algunos microorganismos Gram negativos, proviene de la oxidación de la glucosa, sin embargo se ha descrito una gran cantidad de ácidos orgánicos que realizan

esta misma función, tales como oxálico, cítrico, butírico, malónico, láctico, succínico, málico, , acético, glicónico, fumárico, adípico, indol-acético y 2-cetoglucónico.

Estos ácidos quelatan los elementos que conforman el fosfato insoluble en el suelo como el Calcio (Ca), Aluminio (Al) y Hierro (Fe), solubilizando el fosfato para que sea asimilado por la planta. Los diferentes ácidos orgánicos son producidos en virtud de la fuente de carbono que puede utilizar el microorganismo, de manera que entre mayor capacidad de asimilar diferentes fuentes de carbono tenga el microorganismo mejor respuesta en la solubilización se obtendrá, esto es importante cuando se mira a la luz de los exudados radicales de la planta, que están compuestos principalmente por fuentes carbonadas como fructosa, sucrosa y glucosa (Bernal, 2010).

Producción de protones y ácidos inorgánicos.

Otro mecanismo esta dado por la producción de protones durante la asimilación de amonio NH_4^+ por parte de algunos microorganismos del suelo que fijan nitrógeno, como *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* de manera que se propicia la liberación del fósforo para ser usado por la planta (Fernández, 2005).

La producción de ácidos inorgánicos también está involucrada en la solubilización de fosfatos; ácidos como el nítrico y sulfúrico son producidos en menor medida por algunos microorganismos que solubilizan el fosfato presente en el suelo.

2.2 ANTAGONISMO MICROBIANO.

El antagonismo es un proceso natural entre comunidades microbianas, los antagonistas son microorganismos que inhiben el desarrollo de otras poblaciones microbianas. Existen varias especies bacterianas descritas como antagonistas de microorganismos fitopatógenos, entre ellos *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* y hongos como *Trichoderma viride* y *Burkholderia cepacia* (Izzeddin y Medina. 2001; Trujillo et al. 2007).

Los mecanismos de acción implicados en los procesos de control biológico, están dados por: parasitismo directo y muerte del patógeno; competencia nutricional con el patógeno; efectos tóxicos directos por medio de la liberación de sustancias como antibióticos, sideróforos, enzimas líticas y detoxificadoras; efectos tóxicos indirectos sobre el patógeno por liberación de sustancias volátiles como etileno, inducción de resistencia sistémica en la planta (Orietta y Larrea, 2001). Los microorganismos antagonistas han sido utilizados para ejercer control sobre muchas enfermedades que causan pérdidas económicas en vegetales. (Toledo, 2004)

2.2.1 El género Bacillus como antagonista de patógenos.

Bacillus es uno de los géneros bacterianos más ampliamente estudiado en cuanto a capacidad antagónica, Gillen y colaboradores encontraron cuatro cepas de este

género, que mostraron actividad antagónica frente a *Fusarium spp.*, *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora capsici*, microorganismos que causan pérdidas del 40% al 60 % en los sistemas de producción del Chile, los microorganismos antagónicos fueron *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, y dos cepas de *Bacillus subtilis* (Cruz et al. 2006)

En 2007 Benítez y colaboradores identificaron varios morfotipos bacterianos del género *Bacillus*, entre ellos: *Bacillus brevis*, *Bacillus pumilis*, y *Bacillus sp* que mostraron capacidad antagónica frente a *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum*, dos fitopatógenos del suelo causantes de podredumbres en hortalizas, frutales y tubérculos (Benítez 2007)

López y su equipo aislaron 17 cepas del género *Bacillus* de un conjunto inicial de 323 aislados a partir de muestras de hojas, suelo y raíces, que fueron antagónicas de *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora aphanidermatum* microorganismos que afectan el cultivo de tabaco, en este estudio se observó producción de metabolitos tóxicos para los patógenos por parte de las bacterias antagónicas (Sosa et al. 2006).

Bacillus subtilis es uno de los mejores representantes de este género, es un fuerte antagonista y fitoprotector en cultivos de aguacate, tomate, frijol y cebolla, brindando protección contra fitopatógenos como *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* y *Alternaria porri*. Esta amplia capacidad antagonista en parte se debe a los mecanismos usados por *B. subtilis* que le permite una alta efectividad frente a un amplio espectro de hongos filamentosos patógenos (Orieta Y Larrea, 2001).

2.2.2 Mecanismos in vivo usados por *Bacillus subtilis* para el control de patógenos que afectan las plantas.

Bacillus subtilis es una bacteria Gram-positiva de forma bacilar, que forma una endospora central bajo condiciones de estrés, es estrictamente aeróbica; los mecanismos que median en su capacidad antagónica están dados principalmente por la producción de subtilina y otros antibióticos de la familia de las Iturinas que actúan sobre la pared celular de los hongos.

Otro mecanismo se relaciona con la estimulación de la resistencia sistémica inducida (RSI) de la planta. Maldonado y su equipo evaluaron la acción de *Bacillus subtilis* en la estimulación de la resistencia sistémica inducida (RSI) para proteger la calabacita del virus del mosaico del cohombro, encontrando que las plantas tratadas con el microorganismo mostraron diferencias estadísticas significativas en la concentración de unidades virales, además se ha demostrado que la RSI por *Bacillus subtilis*, no solo es efectiva contra virus, sino también contra hongos y bacterias patógenas (Maldonado et al, 2008)

Sin embargo no es fácil determinar con exactitud todos los mecanismos implicados en la acción antagónica de un microorganismo, ya que varios pueden

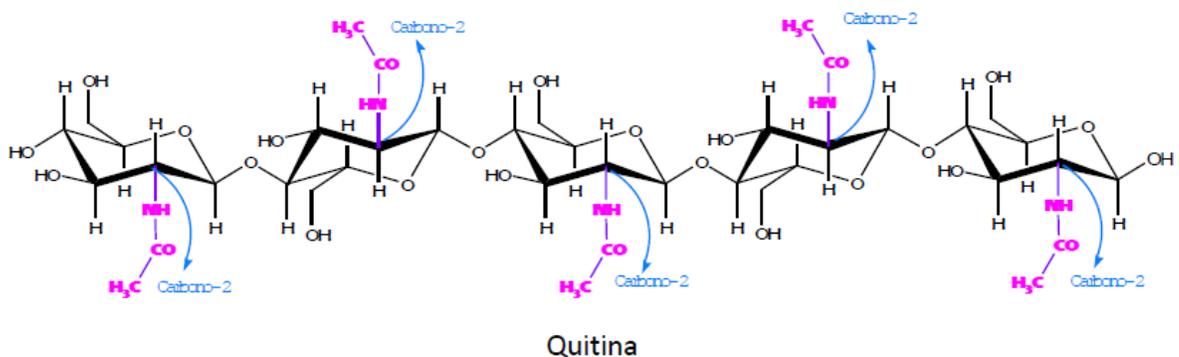
estar involucrados simultáneamente. Por otra parte existen interacciones microbianas que se llevan a cabo en la rizósfera y que determinan la resistencia o susceptibilidad de la planta frente a patógenos, generalmente son muchos los microorganismos que actúan brindando protección por medio de diversas actividades microbianas, que incluyen en muchos casos el parasitismo y la competencia nutricional.

Algunas cepas bacterianas como *Bacillus thuringiensis* han sido utilizadas para el control de insectos, ya que durante su fase de esporulación, *B. thuringiensis* forma cristales o cuerpos parasporales que contienen proteínas Cry que presentan actividad ante una gran variedad de insectos y cuyo efecto tóxico es incrementado por la acción de quitinasas bacterianas producidas por el microorganismo (Fortuna J. 2009).

2.3 LA QUITINA.

La quitina es un polisacárido formado por moléculas de N-acetilglucosamina (NAG), que se unen por enlaces β -1.4, Ver figura 2. Cuando se forman cadenas de más de seis monómeros es insoluble, los puentes de hidrógeno dan estabilidad a las estructuras dispuestas en paralelo. La quitina tiene tres formas moleculares, desde el punto de vista estructural: la forma alfa es la más abundante y las cadenas son antiparalelas; la forma beta cuyas cadenas son paralelas y la forma gamma que tiene las cadenas intercaladas, de manera que por cada cadena que se oriente en un sentido, hay dos que se orientan en sentido opuesto, la gamma quitina es la forma más atípica y extraña dentro de todas las quitinas. La quitina es uno de los compuestos orgánicos más abundantes de la naturaleza, después de la celulosa y es un componente esencial de las paredes celulares de hongos, del exoesqueleto de insectos y del caparazón de crustáceos. (Sastoque, 2005). La quitina es un recurso biológico abundante y renovable por síntesis biológica (Nava, 2009.)

Figura 2. Estructura molecular de la quitina



Fuente: (Nava, 2009)

2.3.1 Microorganismos quitinolíticos.

El uso de microorganismos para el control fitosanitario de insectos y hongos en cultivos de interés agrícola, se ha venido desarrollando en virtud de la capacidad de muchas bacterias y hongos de producir enzimas quitinolíticas denominadas quitinasas, entre los géneros y especies microbianas más reconocidas están *Vibrio*, *Streptomyces*, *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens*, *Clostridium* y arqueobacterias (Sastoque E. 2005).

Okumoto y su equipo reportaron en 2001 la capacidad de algunas cepas de *Bacillus sp* y *Pseudomonas fluorescens* para ejercer control biológico sobre *Alternaria solani* mediante la lisis de las células del hongo por la acción de quitinasas (Okumoto *et al.* 2001), en 2007 Sastoque y colaboradores reportaron un aislado alcalófilo y halotolerante de *Streptomyces sp* a partir de residuos de camarón, capaz de producir enzimas quitinolíticas, (Sastoque *et al.* 2007). En 2011 Castro y su equipo reportaron un aislado en exoesqueletos de camarón de la bacteria *Serratia sp.* BIOMI-363706, capaz de producir una quitinasa extracelular (Castro *et al.* 2011). De hecho se ha encontrado que muchos microorganismos marinos pueden tener un gran potencial para producir quitinasas, tal vez como resultado de la evolución en sus mecanismos enzimáticos para localizar alimento en animales marinos que poseen quitina.

Algunas cepas bacterianas como *Bacillus thuringiensis* han sido utilizadas para el control de insectos plaga en plantas, ya que durante su fase de esporulación, *B. thuringiensis* forma cristales o cuerpos parasporales que contienen una enorme cantidad de proteínas (endotoxinas) conocidas como proteínas Cry que presentan actividad ante gran variedad de insectos y cuyo efecto tóxico es incrementado por la acción de quitinasas bacterianas producidas por el microorganismo (Fortuna J. 2009)

El intestino de las larvas de insectos también ha sido una fuente de microorganismos quitinolíticos, Pinto (*et. al*) describen un conjunto de microorganismos aislados de larvas y del contenido de pupas de *Automeris Zugana* y *Rotschildia lebeau* en especial de Enterobacterias, capaces de producir gran diversidad de enzimas, entre las que se cuentan las quitinasas (Pinto *et al.* 2007).

Uno de los mecanismos microbianos implicados en el uso de la quitina por parte de la célula, fue expuesto por Yu y su equipo en 1991, al respecto se describió que una vez el microorganismo detecta la presencia de quitina en el medio, se une a ella e induce la liberación de quitinasas extracelulares que la degradan a oligosacáridos, estos entran al periplasma celular y posteriormente son transformados a residuos de N-acetilglucosamina (GlcNac) que son llevados al citoplasma mediante la vía del fosfoenol-piruvato, a partir de aquí los GlcNac son convertidos a Fructosa -6P que es utilizado en la glicólisis (Yu *et al.* 1991).

2.4 EL TOMATE

El tomate (*Solanum lycopersicum*), se ha considerado como una de las hortalizas de mayor importancia económica en muchos países del mundo, por la variedad de productos que se elaboran a partir de él, y las divisas que aporta (Santiago *et al.*, 1998). En Colombia, el tomate es cultivado principalmente en Norte de Santander, Huila, Valle, Santander, Tolima, Antioquia, Boyacá, Cesar, Nariño, Atlántico y Guajira. Se ha estimado que genera unos 2.309.440 jornales anuales, ya que cerca del 16% del área hortícola del país, se siembra en tomate (Corpoica, 2007).

El tomate es susceptible a muchas enfermedades fúngicas, la mayoría de ellas se generan cuando hay mal manejo en la cantidad de agua que recibe la planta, esto hace que se requiera frecuentemente aspersar agroquímicos para su control. Dentro de los principales hongos que afectan al tomate destacan: *Fusarium oxysporum*, *Stemphylium solani*, *Phytophthora infestans*, *Alternaria solani* y *Verticillium s p.* (Meister Media Worldwide, 2006). Las bacterias y los virus son también causantes de diversas enfermedades en el tomate, las enfermedades víricas que se han identificado en Colombia son causadas por los géneros *Tobamovirus*, *Cucumovirus*, *Potyvirus*, *Tospovirus*, *Begomovirus* y *Crinivirus* (Morales *et al.*, 2009) en tanto que las principales enfermedades bacterianas son causadas por *Clavibacter michiganensis*, *Xanthomonas campestris* y *Pseudomonas syringae*. (Meister Media Worldwide, 2006). Esta gran variedad de fitopatógenos que atacan al tomate, hace que su cultivo requiera el uso de una considerable cantidad de agroquímicos para su manejo, ocasionando problemas que comprometen la sostenibilidad de los agrosistemas y la biodiversidad

2.5 CONSTRUCCIÓN DE ARBOLES FILOGENÉTICOS

La filogenia es considerada la ciencia encargada de estimar la evolución de las especies, genes o genomas, en donde específicamente la filogenia molecular hace uso de las secuencias de ADN o proteínas para realizar las comparaciones evolutivas aprovechando las dependencias que existen desde el punto de vista estadístico entre las secuencias (Harvey y Nee, 1996).

La comparación de las secuencias del gen ADNr 16S permite establecer relaciones filogenéticas entre organismos procariotas, de forma similar la región ITS permite hacer lo mismo en eucariotas.

Esto ha traído una gran repercusión en la taxonomía microbiana, ya que ha dado lugar al sistema de clasificación actual que ha permitido la identificación rápida y precisa tanto de procariotas como de eucariotas. La identificación molecular que se basa en el análisis del gen ADNr 16S es comúnmente usada para la identificación de bacterias en donde otro tipo de técnica resulta imposible o simplemente requiere mucho tiempo. La amplificación del gen permite su posterior secuenciación y este proceso comienza preferentemente del ADN extraído de un cultivo puro bacteriano, aunque también puede conseguirse de una muestra proveniente de distintos tipos de fuente. Las moléculas de el ADNr 16S e ITS

están presentes en todas las bacterias y en todos los eucariotas respectivamente, y su análisis es por tanto, un instrumento de identificación universal, una de las características que las hace tan útil es que su estructura y función han permanecido sin mayores alteraciones durante un tiempo muy largo, de modo que cualquier cambio en la secuencia refleja sobre todo cambios aleatorios que ocurren de una forma suficientemente lenta, de modo que puede aportar información acerca de todos los procariotas a través de la escala evolutiva (Rodicio y Mendoza, 2004)

Existen relaciones jerárquicas entre los microorganismos que surgen a través de la evolución, los árboles filogenéticos nos permiten esquematizar dichas relaciones. Estos árboles constan de nodos unidos entre sí por ramas, las longitudes de estas ramas pueden significar la distancia evolutiva que hay entre nodos. Los árboles agrupan los organismos, de manera que todo lo que hay alrededor de un nodo es considerado un grupo monofilético, es decir, que todo el grupo se originan de un único ancestro común y por tanto pueden poseer rasgos comunes, cuando se presenta que un grupo excluye a algunos de sus descendientes se denomina parafilético (Baldauf, 2003).

Actualmente hay diversos métodos que permiten la construcción de árboles filogenéticos, que han sido categorizados en uno de los siguientes grupos (Sandria, 2003):

Basados en distancias: Realizan un cálculo de la distancia evolutiva para todos los pares de unidades taxonómicas operacionales o secuencias de ADN, de manera que el árbol filogenético finalmente se construye utilizando las relaciones entre estas distancias, entre los métodos más conocidos están;

Método de evolución mínima (ME), Método Neighbor-Joining (NJ) y UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means), sin embargo UPGMA asume siempre una tasa de evolución constante por esta razón no es recomendable usarlo para inferir árboles filogenéticos en aquellos casos en que el conjunto de secuencias no cumple con esta hipótesis, ya que podría no reflejar necesariamente una historia evolutiva.

Basados en caracteres discretos: realizan un análisis de los caracteres que forman las secuencias y no de las distancias entre pares de éstas. Estos métodos cuentan los eventos de mutación acumulados en las secuencias y por lo tanto es posible eliminar la pérdida de información que ocurre cuando los caracteres son transformados a distancias, entre estos métodos se incluye Método de máxima parsimonia (MP), Método de parsimonia evolutiva (EP), Método de máxima probabilidad (ML)

3. MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de cepas nativas aisladas de residuos lignocelulósicos de higuera (*Ricinus communis*) fruto y torta, se seleccionaron 15 cepas bacterianas y una levaduriforme, para evaluar inductores de crecimiento vegetal (solubilización de fósforo y producción de ácido indol-acético AIA), actividad quitinolítica y actividad antagónica.

Las cepas fueron suministradas por el Centro de recursos microbiológicos UCM, cada microorganismo posee un código de identificación como se resume en la siguiente tabla. (Tabla 2)

Tabla 2. Código de los microorganismos evaluados

MICROORGANISMO	CODIGO
<i>Bacillus pumilus</i>	GIBI_000187_AG_B
<i>Bacillus altitudinis</i>	GIBI_000188_AG_B
<i>Bacillus pumilus</i>	GIBI_000189_AG_B
<i>Bacillus pumilus</i>	GIBI_000192_AG_B
<i>Bacillus pumilus</i>	GIBI_000193_AG_B
<i>Bacillus sp.</i>	GIBI_000194_AG_B
<i>Bacillus sp.</i>	GIBI_000195_AG_B
<i>Bacillus sp.</i>	GIBI_000197_AG_B
<i>Bacillus sp.</i>	GIBI_000199_AG_B
<i>Bacillus subtilis</i>	GIBI_000200_AG_B
<i>Bacillus sp.</i>	GIBI_000201_AG_B
<i>Bacillus pumilus</i>	GIBI_000203_AG_B
<i>Bacillus pumilus</i>	GIBI_000204_AG_B
<i>Bacillus pumilus</i>	GIBI_000206_AG_B
<i>Bacillus sp.</i>	GIBI_000208_AG_B
<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	GIBI_000209_AG_Y

3.1 PRODUCCIÓN DE AIA Y SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS

3.1.1 Cuantificación de Ácido Indol-acético (AIA) por la técnica colorimétrica de Salkowski.

Para la cuantificación de Ácido Indol-acético (AIA) se siguió la metodología descrita por Celis y Gallardo (2008). Las bacterias seleccionadas para evaluar la producción AIA como fitohormona estimulante del crecimiento vegetal, fueron cultivadas en agar nutritivo y el hongo levaduriforme en agar papa dextrosa (PDA).

Se realizó una curva patrón tomando concentraciones de 5, 10, 15, 20 25 y 30 $\mu\text{g/ml}$ de AIA (Sigma), a partir de una solución stock de 100 $\mu\text{g/ml}$. Luego se tomó 1 ml de cada una de las soluciones y se le adicionó 2 ml del reactivo de Salkowski preparado a partir de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 7,9 M y cloruro férrico (FeCl_3) 40 mM. Se dejó reposar por 30 minutos a temperatura ambiente y se leyeron las absorbancias de los patrones a 530nm en un espectrofotómetro Pharo 300 de Merck, con los valores obtenidos se halló la ecuación que relaciona la concentración de AIA en función de la absorbancia. Luego se realizó la medición de Ácido Indol-acético producido por cada microorganismo, para ello se preparó una suspensión de cada cepa microbiana en solución salina al 0.85%, leyendo a una longitud de onda de 540 nanómetros se ajustó la absorbancia de esta solución a 0,20, lo que es equivalente a una concentración de 10^8 cel/ml. Se hizo una dilución en caldo tripticasa de soya para favorecer la producción de auxinas, hasta obtener una concentración de 10^6 cel/ml, este procedimiento se realizó por triplicado para cada cepa. Las cepas microbianas se incubaron a 30°C y la cepa levaduriforme se incubó a temperatura ambiente, se mantuvieron en agitación constante a 120rpm durante 96 horas, tiempo en el cual se producen los picos máximos de producción de AIA para estos microorganismos (Celis y Gallardo, 2008).

Para realizar las mediciones de AIA, pasadas las 96 horas de incubación se tomaron 2 ml de cada caldo de cultivo y se centrifugaron por 10 minutos a 5000 rpm, posteriormente se tomó 1ml del sobrenadante y se mezcló con 2ml del reactivo de Salkowski, se dejó reposar por 30 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 530 nm para determinar la concentración de AIA producida por los microorganismos seleccionados. Una vez cuantificada la producción de AIA de cada microorganismo, se realizó un análisis estadístico mediante la prueba de Duncan para determinar entre los microorganismos el mayor productor de AIA, y evaluar el efecto de su inoculación en la germinación y desarrollo de semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) variedad Santa Clara.

3.1.2 Desinfección de semillas

Se tomaron 120 semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) variedad Santa Clara, se sumergieron en hipoclorito de sodio al 5% durante un minuto, en etanol al 70 %

por un minuto y finalmente se realizaron cuatro lavados con agua destilada estéril (Castro y Roa 2006).

3.1.3 Esterilización de la turba.

Para evaluar el efecto del microorganismo en la germinación y crecimiento de las semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) se utilizó turba comercial, proveniente de turberas canadienses (*Sphagnum*), ésta fue esterilizada durante 1 hora a 121 °C tres veces (Castro y Roa, 2006).

3.1.4 Preparación de Inóculos bacterianos

El inóculo bacteriano fue preparado en caldo tripticasa de soya, con una concentración de 10^8 células/ml, se utilizaron 300 ml del inóculo por kilogramo de turba, la turba inoculada fue incubada por 96 horas a 30 °C; según Castro y Roa (2006) los microorganismos pueden perder viabilidad una vez inoculados en la turba, por lo cual la incubación permite mejorar la viabilidad.

3.1.5 Recuento de microorganismos en el portador microbiano (Turba)

Transcurridas las 96 horas de incubación de la turba se procedió a hacer un recuento en placa del microorganismo, para esto se preparó una solución madre con 90 ml de agua peptonada estéril y 10 gramos de turba, luego se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-8} , se sembró por duplicado en profundidad 1ml en agar nutritivo y se incubó a 30 °C por 48 horas (Castro y Roa, 2006)

3.1.6 Inoculación de semillas

Se inocularon 60 semillas con la solución del microorganismo en caldo tripticasa de soya, con una concentración de 10^8 células/ml y se colocaron en agitación por 1 hora a 120 rpm; se realizó también un blanco con 60 semillas, colocadas en agua destilada estéril y en agitación durante una hora a 120 rpm (Reyes et al., 2008).

3.1.7 Germinación y siembra de semillas.

Para evaluar el efecto del microorganismo en la germinación y desarrollo de la planta, se sembraron en bandejas de germinación que contenían la turba inoculada, 6 grupos cada uno con 10 semillas inoculadas. Las semillas sin inóculo fueron sembradas en turba sin inóculo, igualmente divididas en seis grupos con 10 semillas cada uno, se sembraron de forma completamente aleatoria, asignándole un pozo al azar a cada una.

Las bandejas de germinación fueron regadas con 2 ml de agua destilada estéril durante 6 días que permanecieron en oscuridad, posteriormente se expusieron a la luz y se regaron cada 2 días con igual cantidad de agua.

Al cabo de 9 días se obtuvo el máximo de germinación para todos los ensayos, con los datos obtenidos se determinó el porcentaje de germinación para cada grupo.

3.1.8 Medición de parámetros de crecimiento.

Las plántulas obtenidas de la germinación fueron llevadas hasta el día 37, tiempo en el cual habían desarrollado 2 hojas verdaderas, se eligieron 15 plantas con inóculo y 15 sin inóculo de forma completamente aleatoria, se midió la longitud radical, la altura de la planta, peso húmedo y peso seco (Castro y Roa, 2006).

Se realizó un recuento en placa por el método de siembra en profundidad de la turba con inóculo en la que estaban sembradas las plantas para verificar si la viabilidad de los microorganismos se mantuvo constante en la turba.

Longitud radical: se midió la longitud desde la base de la raíz hasta el punto de crecimiento más alto.

Longitud del tallo: Se midió la altura de la planta desde la base del tallo hasta el punto de crecimiento más alto.

Peso de materia húmeda/seca. Cada una de las unidades experimentales se seccionó en dos partes, tallos con hojas y raíz, cada parte fue pesada para determinar el peso húmedo, posteriormente fueron coladas en crisoles y llevadas a un horno HACEB a 60 °C por un tiempo de 72 horas al cabo del cual se pesó nuevamente cada parte de la planta para determinar el peso seco. Con los datos obtenidos se realizó un análisis por el método de componentes principales (ACP).

El Análisis de Componentes Principales es una técnica estadística de síntesis de la información, o reducción de la dimensión (número de variables), es decir, ante un banco de datos con muchas variables, el objetivo es reducirlas a un menor número perdiendo la menor cantidad de información posible.

La técnica consiste en encontrar transformaciones ortogonales de las variables originales para conseguir un nuevo conjunto de variables incorreladas, es decir que no tienen relación lineal, denominadas Componentes Principales, que se obtienen en orden decreciente de importancia. Los nuevos componentes principales serán una combinación lineal de las variables originales que serán independientes entre sí, se espera que, solo unas pocas (las primeras) recojan la mayor parte de la variabilidad de los datos, obteniéndose una reducción de la dimensión en los mismos. Luego el propósito fundamental de la técnica consiste en la reducción de la dimensión del espacio de los datos con el fin hacer descripciones sintéticas y simplificar el problema en estudio (León et al, 2008).

3.1.9 Solubilización de Fosfatos

Para determinar la capacidad de los microorganismos de solubilizar fosfatos se hizo una evaluación cualitativa.

Los microorganismos seleccionados se sembraron por picadura en medio Pikovskaya (PVK) (ver anexo 1.) y se incubaron a 30 °C por 7 días. Este medio contiene como única fuente de fósforo, fosfato de calcio, una sustancia altamente insoluble, se adicionó verde de bromocresol como indicador de pH, la formación de un halo alrededor de la colonia indica que el microorganismo posee potencial para solubilizar fósforo (Bernal, 2010). Se utilizó como control positivo la bacteria *Pseudomonas fluorescens*.

3.2 PRUEBAS DE ANTAGONISMO.

Se sembró cada cepa en Agar Papa Dextrosa(PDA), haciendo dos líneas paralelas a 2 cm del centro de la caja de Petri y se incubaron por 24 horas a 30 °C, pasado este tiempo se sembró un disco de 0,5 cm del hongo filamentoso *Fusarium equiseti* en el centro de la caja de Petri; el hongo tenía una semana de crecimiento previo. Se sembró un control negativo usando *Escherichia coli*, y un testigo absoluto sin las barreras del microorganismo, conteniendo solamente el disco de 0,5 cm del hongo, todas las siembras fueron realizadas por triplicado. Como parámetros evaluativos, se midió el porcentaje de inhibición a partir del crecimiento radial del hongo hacia el lado izquierdo y derecho, el cual se estimó con base en la diferencia obtenida entre el crecimiento del patógeno confrontado con la cepa antagónica y el crecimiento en el cultivo control, esta medición se realizó al cabo de 12 días, tiempo en el cual los controles fueron completamente invadidos (Benítez *et al*, 2007).

3.3 DETECCIÓN DE QUITINASAS.

Se realizó la detección cualitativa de enzimas degradadoras de quitina, como mecanismo eficaz de algunos microorganismos para obtener energía a partir de la quitina como única fuente de carbono, y que permite seleccionarlos como posibles controladores biológicos. Para esto se sembró en el medio quitina coloidal (Lang *et al.*, 2002) (ver anexo 1).

Este medio contiene quitina coloidal como única fuente de carbono de manera que induce la producción de quitinasas por parte del microorganismo, si este la posee. (Nava, 2009)

Los microorganismos fueron sembrados por picadura en las cajas de Petri con medio de quitina coloidal, la prueba se consideró positiva al observar crecimiento o un halo claro alrededor del crecimiento del microorganismo después de una

semana de incubación a 30°C. Se utilizó como control positivo *Serratia marsescens*. (Pinto et al, 2007).

3.3.1 Preparación de la quitina coloidal

El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por (Castro et al., 2011) y (Jin Wu et al., 2009).

Se diluyeron 40 g de quitina en 400 ml de HCl concentrado y se colocaron en agitación constante (150 rpm) durante 2 horas, posteriormente se agregaron 2 litros de agua destilada fría y se agitó la mezcla rápidamente para formar el precipitado de quitina, la solución resultante se filtró para obtener la pasta de quitina coloidal a la que se le realizaron lavados sucesivos con agua destilada (200ml), con el fin de eliminar los residuos de ácido.

La pasta obtenida, se esterilizó durante 15 min a 15 psi y se almacenó a 4 °C hasta su posterior uso.

3.4 CONSTRUCCION DE ARBOLES FILOGENETICOS

3.4.1 Búsqueda y descarga de secuencias

Para la construcción de los árboles filogenéticos se utilizó el programa BLAST x, con el fin de buscar secuencias similares para cada una de las 16 cepas microbianas evaluadas (15 bacterianas y una levaduriforme), dichas secuencias fueron descargadas del Genbank por medio del programa NCBI Batch entrez. Todas las secuencias bacterianas analizadas corresponden al gen ADNr 16S, en tanto que la secuencia de la levadura corresponde a la región ITS.

3.4.2 Mapeo de Secuencias

De las secuencias descargadas, cuatro secuencias que se iban a utilizar para la construcción de los árboles filogenéticos bacterianos, tenían más de tres millones de pares de bases, por lo cual se hizo un mapeo, que consistió en buscar la secuencia de la cepa con código GIBI_000187_AG_B dentro de cada una de las secuencias de gran longitud, esto se realizó mediante el programa BLAT (Bhagwat et al., 2012), posteriormente las secuencias fueron editadas mediante el programa BioEdit (Hall, 1999)

3.4.3 Alineamiento de secuencias

Todos los alineamientos fueron realizados con Clustal W 2.0 (Thompson et al., 1994), se utilizaron los parámetros por defecto para realizar los alineamientos.

Se realizó un primer alineamiento con el fin de determinar que la orientación de las secuencias fuera correcta, en caso de no serlo, se buscó la secuencia reversa complementaria para realizar el alineamiento, y se editaron las secuencias para que al alinearlas quedaran del mismo tamaño (780 pb)

3.4.4 Eliminación de secuencias redundantes

Para la eliminación de secuencias redundantes se utilizó el programa CD-Hit 4.6 (Li y Godzik, 2006), que permitió eliminar las secuencias redundantes, para

finalmente realizar la construcción de los árboles filogenéticos, el bacteriano y el levaduriforme.

3.4.5 Construcción de arboles filogenéticos

Se utilizó el programa MEGA 5.0 para la construcción de los árboles filogenéticos, usando Neighbor-Joining como método de construcción del árbol, y evaluando la confiabilidad haciendo bootstrapping de 10.000 repeticiones , teniendo en cuenta que cada rama se repitiera como mínimo en el 50% de las veces (Tamura *et al*, 2011).

3.4 ANÁLISIS DE DATOS.

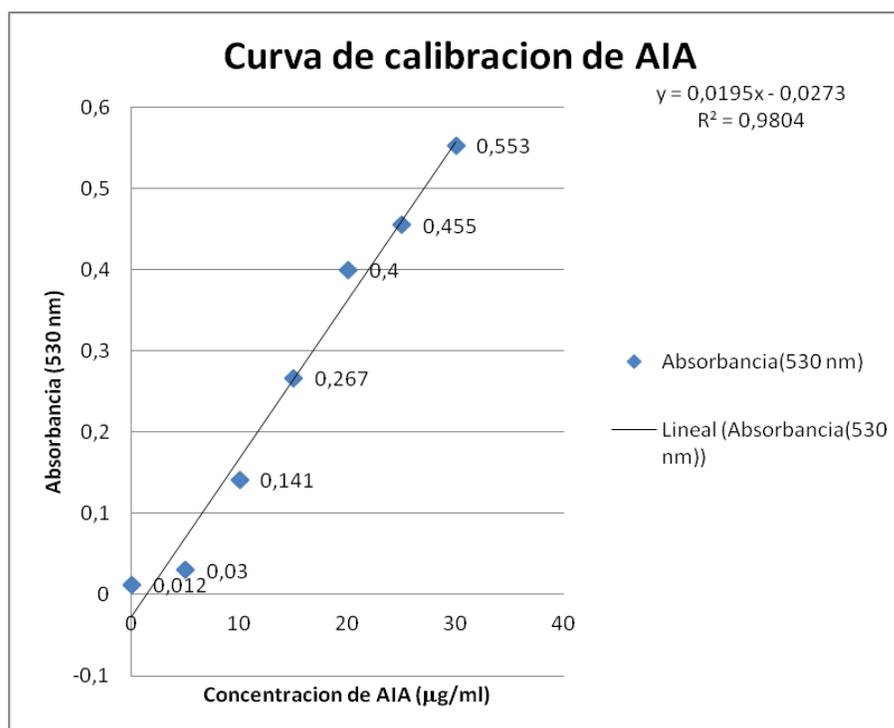
Los análisis estadísticos fueron realizados mediante SPSS versión 18.0, y R versión 2.15

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO INDOL-ACÉTICO

El stock de soluciones de Ácido Indol-acético (AIA), con concentraciones de 0, 5, 10, 15, 20, 25, y 30 $\mu\text{g/ml}$ de AIA permitió obtener la ecuación de la curva de calibración que relaciona la absorbancia en función de la concentración como muestra la figura 3, con un R^2 de 0,9804.

Figura 3. Curva de calibración de AIA



Posteriormente con esta ecuación se determinaron las concentraciones de Ácido Indol-acético (AIA) producidas por cada microorganismo. A los datos obtenidos se les realizó un análisis estadístico por el método de Duncan, de manera que se obtuvieran grupos clasificados en orden de producción, según la producción de AIA de los microorganismos, sin embargo no se hallaron diferencias estadísticas significativas para la producción de AIA ($p > 0,05$), aunque la clasificación de Duncan dejó ver que la cepa correspondiente a *Bacillus subtilis* (identificada en la tabla 3 con el código 200) obtuvo el mejor promedio de producción de AIA, por lo que se escogió para los ensayos in vivo con las plantas de tomate. Las hipótesis nula y alterna propuestas para el análisis estadístico fueron:

$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 \dots \dots = \mu_{16}$; La producción de AIA es igual estadísticamente para todas las cepas.

$H_1: \mu_i \neq \mu_j$, para al menos una j ; La producción de AIA no es igual en todas las cepas

Figura 4. Stock de soluciones de AIA usados para la curva de calibración

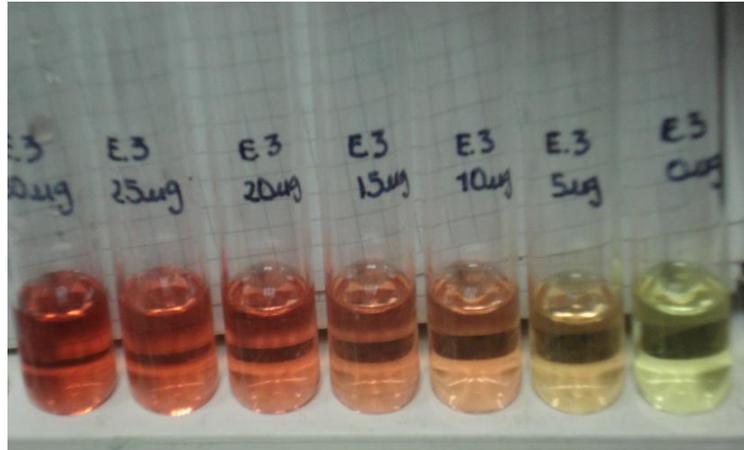


Tabla 3. Clasificación de Duncan para la producción de AIA de cada microorganismo.

CEPA	PRODUCCIÓN DE AIA (µg/ml)	
	SUBCONJUNTO 1	SUBCONJUNTO 2
209	2,49	
208	2,68	
204	2,96	2,96
193	3,29	3,29
203	3,31	3,31
199	3,45	3,45
188	3,58	3,58
187	3,99	3,99
194	4,01	4,01
201	4,04	4,04
189	4,14	4,14
197	4,16	4,16
206	4,23	4,23
192	4,37	4,37
195	5,04	5,04
200		5,47

El género *Bacillus* no es generalmente un gran productor de AIA, no obstante se han reportado algunas cepas capaces de producir hasta 16µg/ml (Tejera *et al.*, 2011) y 55 µg/ml (Felici *et al.*, 2008; Tsavkelova, 2006).

4.2 RECUENTO DE LA CONCENTRACION MICROBIANA EN LA TURBA

Se realizó un recuento en placa para determinar las unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo de turba de *Bacillus subtilis*, al inicio y al final para evaluar el efecto del microorganismo sobre la germinación y el desarrollo de la planta, para constatar la viabilidad del microorganismo en la turba a través del tiempo en el que se realizaron los ensayos.

La tabla 4 muestra los valores del recuento de *Bacillus subtilis* en la turba al inicio y final de los ensayos.

Tabla 4. Recuento de *Bacillus subtilis* en la turba al inicio y final del ensayo.

Recuento de <i>Bacillus subtilis</i> en la turba	Inicio del ensayo	Final del ensayo
	16x10 ⁷ UFC/g	79x10 ⁷ UFC/g

4.3 EFECTO DE *Bacillus subtilis* SOBRE LA GERMINACIÓN Y LA MORTALIDAD DE SEMILLAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*) variedad *Santa Clara*)

El máximo de germinación de las semillas de tomate, se obtuvo al día 9, tanto para las semillas inoculadas como para las no inoculadas con *Bacillus subtilis*. No se evidenciaron diferencias significativas (P>0,05) entre el control y las semillas inoculadas en lo que concierne al porcentaje de germinación (ver anexo 2), sin embargo, se observó una alta mortalidad de plantas que no poseían el inóculo. Se hizo un análisis estadístico por comparación de medias de muestras independientes, que mostró una diferencia estadísticamente significativa (P< 0,05) entre las plantas inoculadas y el control (ver anexo 3), verificando que *Bacillus subtilis* ayudó a proteger las plantas y por ende a disminuir la mortalidad.

Figura 5. Bandejas usadas para la germinación de las semillas con y sin inóculo

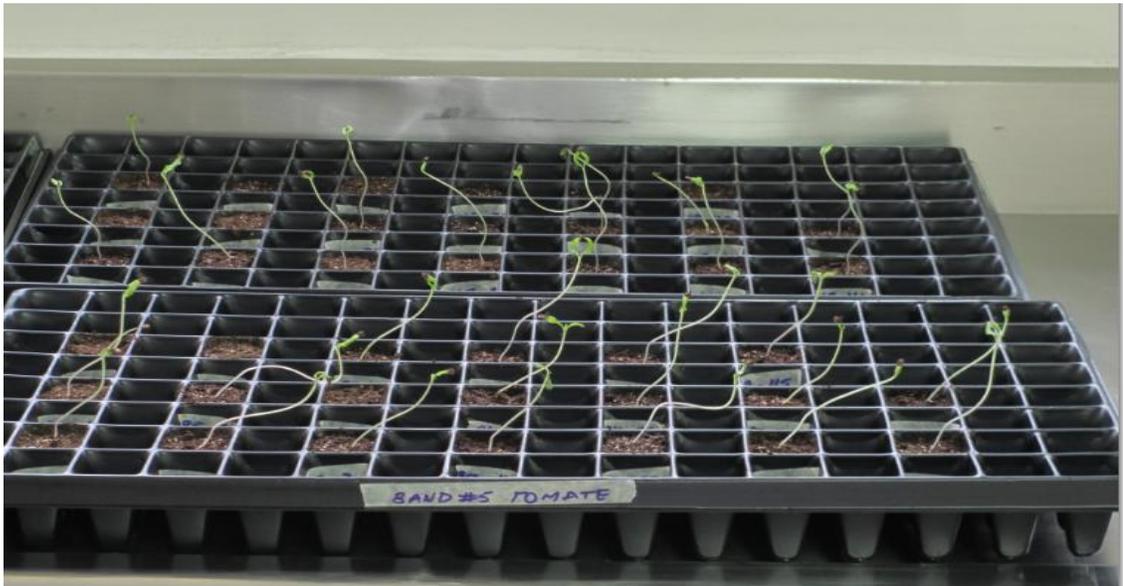


Figura 6. Porcentaje de germinación por cada grupo.

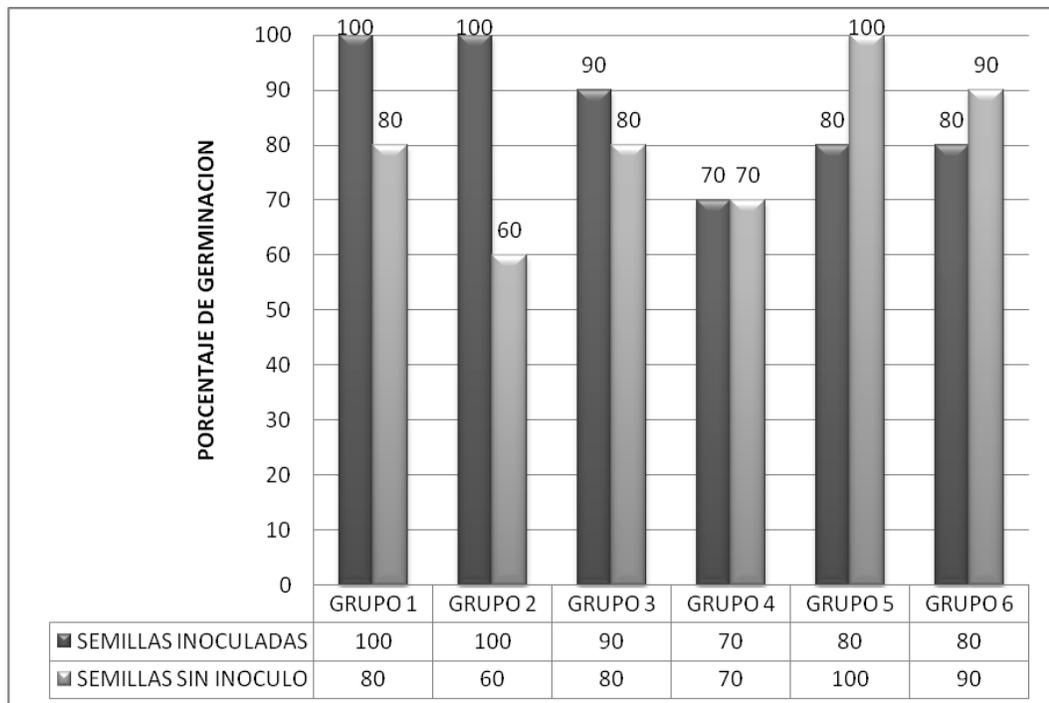


Figura 7. Porcentaje de germinación de semillas

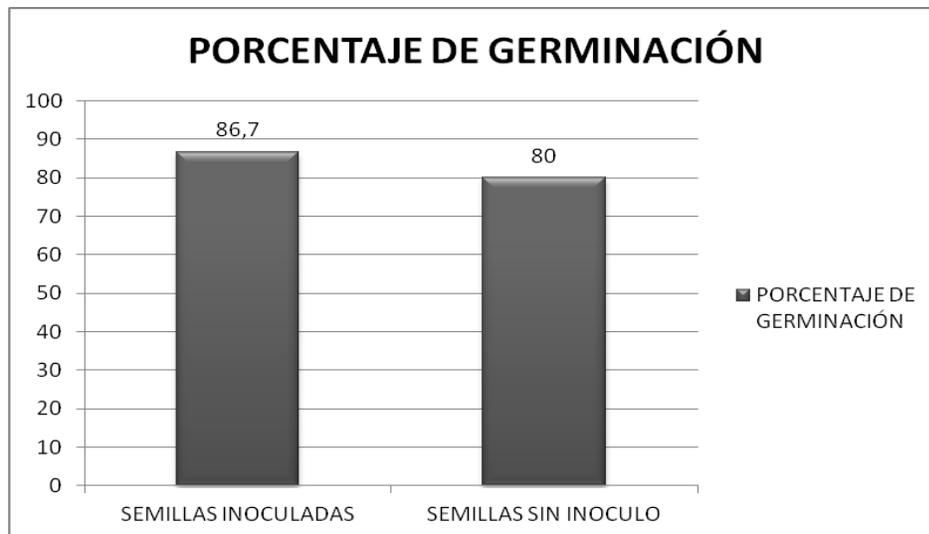
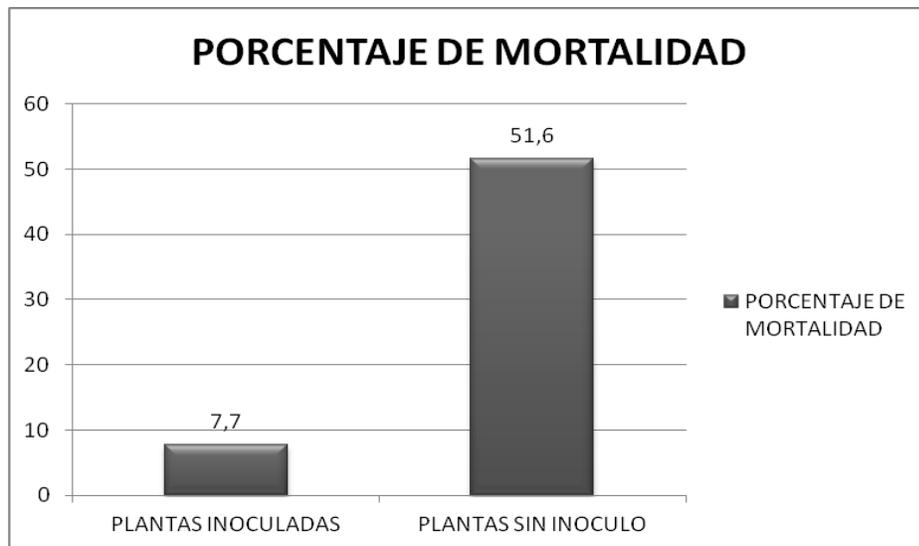


Figura 8. Comparación entre la Mortalidad de plantas con inculo y sin inculo.



Izzeddin y Medina en 2011 reportaron que *Bacillus subtilis* podía producir un aumento estadísticamente significativo en la germinación de semillas inoculadas con respecto a un tratamiento control de semillas de tomate, aunque si bien en este estudio no se vio tal efecto, no obstante la inoculación de las semillas si fue determinante para reducir la mortalidad de las plantas inoculadas con respecto al

control, esto puede ser debido a la capacidad que tiene *Bacillus subtilis* de inducir un aumento en la resistencia sistémica de la planta, contra diversos agentes fitopatógenos que incluyen hongos, bacterias, nematodos y virus (Maldonado *et al.*, 2008).

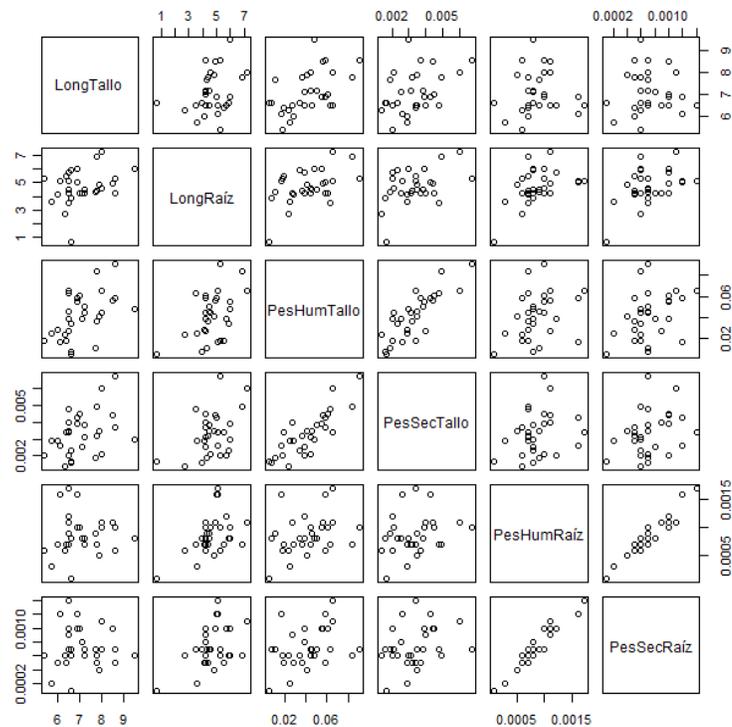
4.4 EFECTO PROMOTOR DEL CRECIMIENTO VEGETAL DE *Bacillus subtilis* EN TOMATE

Una vez que se obtuvo el máximo de germinación en el día 9 de las 60 semillas tratadas con y sin inóculo, se dejaron en la turba 45 plantas inoculadas con *Bacillus subtilis* y 45 plantas de control por 28 días más, tiempo en el cual se desarrollaron 2 hojas verdaderas, posteriormente se tomaron 15 plantas con inóculo y 15 plantas del control para hacer la determinación de la longitud del tallo, longitud de la raíz y el peso húmedo/seco del tallo y la raíz.

Los datos obtenidos fueron analizados por el método de las componentes principales, utilizando SPSS 18.0

En el dispersograma (figura 9) se puede observar la evidente correlación positiva existente entre el peso húmedo de la raíz y el peso seco de la raíz, así como entre el peso húmedo del tallo y el peso seco del tallo. Y aunque se observan también otras correlaciones, estas son menos fuertes que las anteriores.

Figura 9. Dispersograma de las variables estudiadas



La confirmación de la fuerte correlación positiva entre el peso húmedo y el peso seco de la raíz se presenta en la tabla 5, con un coeficiente de correlación de 0.947, y entre el peso húmedo y el peso seco del tallo, con un coeficiente de 0.823. Llama la atención en la matriz que todas las variables presenten una correlación positiva, lo que indica que el incremento en una variable está relacionado con el incremento de las otras.

Por otra parte el hecho de que se evidencie correlación entre las variables implica que es apropiado el uso del análisis de componentes, el cual tiene entre sus objetivos reducir la dimensión del problema estudiado, y esto no se podría realizar si entre las variables no existiera algún grado de interdependencia.

Tabla 5. Matriz de correlaciones entre las variables estudiadas

	LongTallo	LongRaíz	PesHumTallo	PesSecTallo	PesHumRaíz	PesSecRaíz
LongTallo	1,0000	0,3054	0,5199	0,4127	0,0305	0,0040
LongRaíz	0,3054	1,0000	0,4899	0,4436	0,4694	0,4668
PesHumTallo	0,5199	0,4899	1,0000	0,8227	0,3191	0,3644
PesSecTallo	0,4127	0,4436	0,8227	1,0000	0,2579	0,2996
PesHumRaíz	0,0305	0,4694	0,3191	0,2579	1,0000	0,9474
PesSecRaíz	0,0040	0,4668	0,3644	0,2996	0,9474	1,0000

En el plano (figura 10) se puede observar la alta superposición entre las variables peso húmedo y peso seco de la raíz y tallo respectivamente, lo que nos indica la presencia de información redundante en las variables medidas. Específicamente, el conocer el valor de la variable peso húmedo de la raíz permite pronosticar el valor de la variable peso seco de la raíz, de forma análoga ocurre con los datos del tallo de la planta. Dado lo anterior, y en la perspectiva de mejorar la calidad de la lectura plasmada en el plano, se realiza una eliminación de la información redundante, es decir, los valores del peso seco de la raíz y del tallo.

Figura 10. Primer plano factorial del ACP

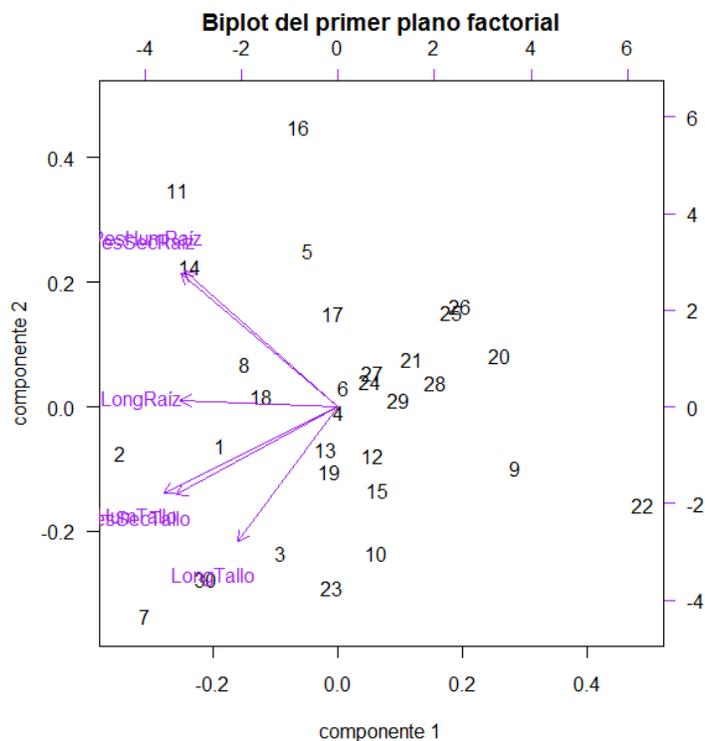
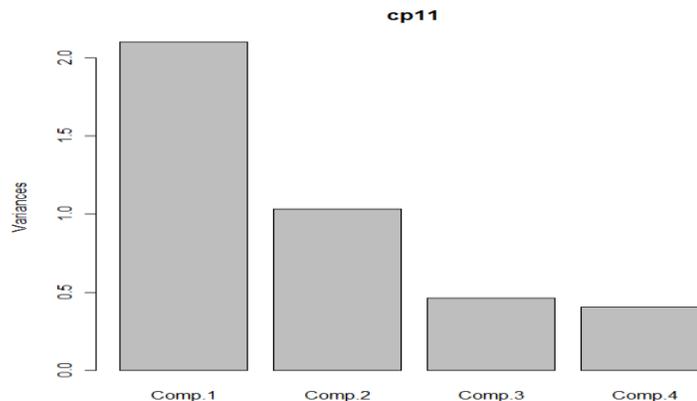


Tabla 6. Matriz de correlaciones de las variables que permanecen

	L.Tallo	L.Raíz	PHu.Tallo	PHu.Raíz
L.Tallo	1,0000			
L.Raíz	0,3054	1,0000		
PHu.Tallo	0,5199	0,4899	1,0000	
PHu.Raíz	0,0305	0,4694	0,3191	1,0000

En diagrama (figura 11) se pueden observar, los valores correspondientes a los valores propios del ACP, en el cual se detecta que los primeros dos componentes son los únicos que sobrepasan el valor de uno, acudiendo al criterio de retener los componentes cuyos valores propios sean superiores a la unidad, el primer plano factorial (que contiene a los dos primeros componentes) es apropiado para explicar la interdependencia presente en los datos estudiados.

Figura 11. Diagrama de sedimentación



Además de los valores puntuales de los valores propios, la tabla 7 registra el porcentaje de varianza explicada por cada uno de los componentes, así como los porcentajes acumulados explicados, observándose entonces que el primer componente retiene el 52.5 % de la variabilidad total de los datos, mientras que el segundo componente el 25.8 %, por lo que el primer plano factorial explica el 78.3 % de la variabilidad total de los datos.

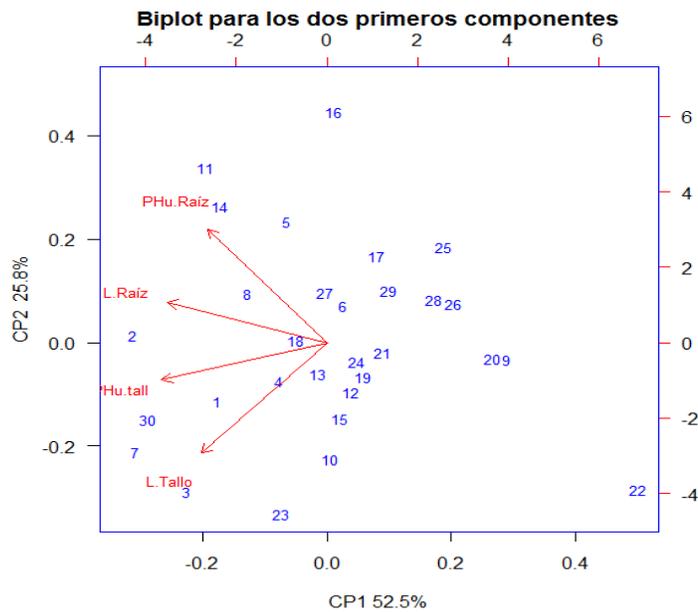
Tabla 7. Resumen de los resultados del ACP

Resumen Análisis de Componentes Principales				
	Comp.1	Comp.2	Comp.3	Comp.4
Valores propios	1,4490	1,0162	0,6814	0,6350
Proporción de varianza explicada	0,5249	0,2582	0,1161	0,1008
Proporción Acumulada	0,5249	0,7831	0,8992	1,0000

En el plano factorial obtenido (figura 12) se observa que en general, los vectores que identifican a las variables presentan alta longitud, lo que indica que todas las variables estudiadas quedan bien representadas en este plano, por lo que no sería necesario recurrir al análisis de otros planos factoriales. Mirando los resultados, se detecta que el primer componente es un indicador del tamaño de las plantas, cuyo incremento se ve registrado hacia la izquierda, es decir, las plantas de mayor tamaño se ubican hacia la izquierda, mientras que las de menor tamaño se ubican hacia la derecha del plano. Entre tanto, el segundo componente es un indicador de la forma de las plantas, y que contrapone a las variables peso húmedo de la raíz y longitud de tallo. Particularmente, las plantas con altos pesos de raíz y longitudes pequeñas del tallo, se ubican hacia el eje positivo de la ordenada del plano, mientras que plantas con bajo peso de raíz y longitudes grandes del tallo se

ubican hacia el eje negativo de la ordenada del plano. Teniendo presente que las plantas registradas con los números del 1 al 15 corresponden a plantas inoculadas con el microorganismo, mientras que las registradas con los números del 16 al 30 son aquellas plantas que sirvieron como grupo control, se observa que las plantas con altas mediciones biofísicas, es decir, las plantas más grandes se encuentran ubicadas en los cuadrantes de la izquierda del plano, en donde en su mayoría son plantas inoculadas. El plano registra que el proceso de inoculación de las plantas de tomate con *Bacillus subtilis* incide en el incremento de las longitudes del tallo y raíz, así como los pesos del tallo y la raíz. *Bacillus subtilis* ha sido reportado como promotor de crecimiento vegetal efectivo cuando ha sido inoculado en plantas de calabacita (Maldonado *et al.*, 2008), tomate, pimentón y cebolla (Izzeddin y Medina, 2011), esto debido a los diversos mecanismos que puede utilizar como la solubilización de fosfatos y el antagonismo frente a fitopatógenos que afectan el desarrollo de las plantas, sumado a eso, en este trabajo se verificó que *Bacillus subtilis*, puede producir AIA como otro mecanismo para estimular el desarrollo vegetal.

Figura 12. Primer plano factorial del ACP con las variables retenidas



4.5 SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS

La prueba de solubilización de fosfatos realizada en el medio Pikovskaya (PKV), permitió evaluar de manera cualitativa los microorganismos con capacidad de solubilizar fosfatos, lo que se evidenció con un cambio de color del medio entre verde y amarillo, se utilizó *Pseudomonas fluorescens* como control positivo (Figura 13). Las cepas que solubilizaron fosfatos se relacionan en la siguiente tabla.

Tabla 8. Microorganismos que solubilizaron fosfato en el medio PKV

CODIGO	NOMBRE
GIBI_000200_IN_B	<i>Bacillus subtilis</i>
GIBI_000206_IN_B	<i>Bacillus pumilus</i>

Figura 13. *Pseudomonas fluorescens*, control positivo usado en la solubilización de fosfatos.

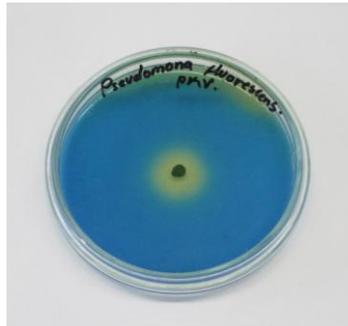


Figura 14. *Bacillus subtilis*, solubilizando fosfatos en PKV

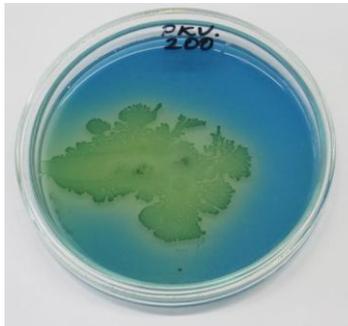
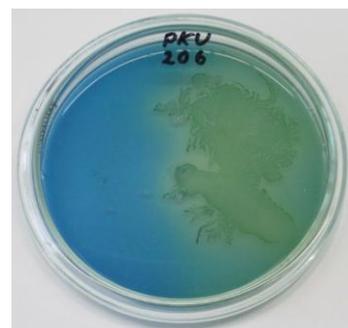


Figura 15. *Bacillus pumilus*, solubilizando fosfatos en PKV



El género *Bacillus* es uno de los más estudiados respecto a la capacidad de solubilizar fosfatos, dentro de él se destacan las especies *B. megaterium* y *B. subtilis* que pueden producir ácidos orgánicos como principal mecanismo de solubilización, aunque también pueden actuar enzimas como las fitasas que se excretan al medio (Tejera et al., 2011).

Bacillus pumilus es bien conocido por su capacidad de producir fitohormonas, pero recientemente se ha descrito la existencia de cepas capaces de solubilizar fosfatos además de giberelinas (Pérez, 2012).

4.6 PRUEBAS DE ANTAGONISMO

Bacillus subtilis (cepa numero 200), obtuvo el mayor porcentaje de inhibición con respecto al control negativo, los datos se observan en la figura 16.

Figura 16. Comparación del porcentaje de inhibición de *Fusarium equiseti* producida por cada cepa con respecto al control

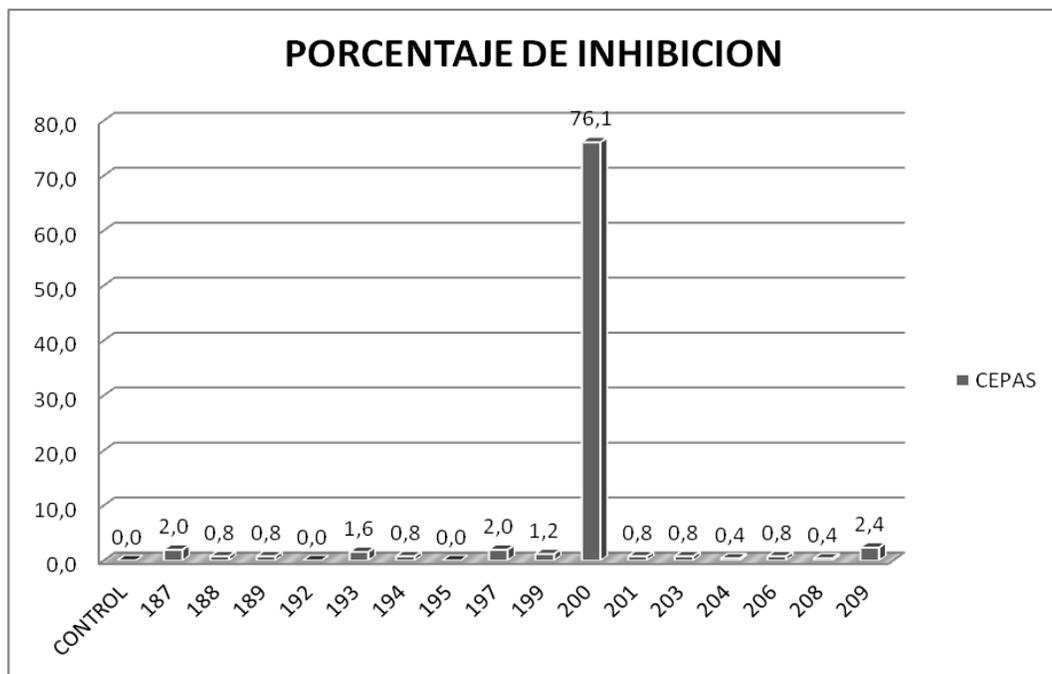
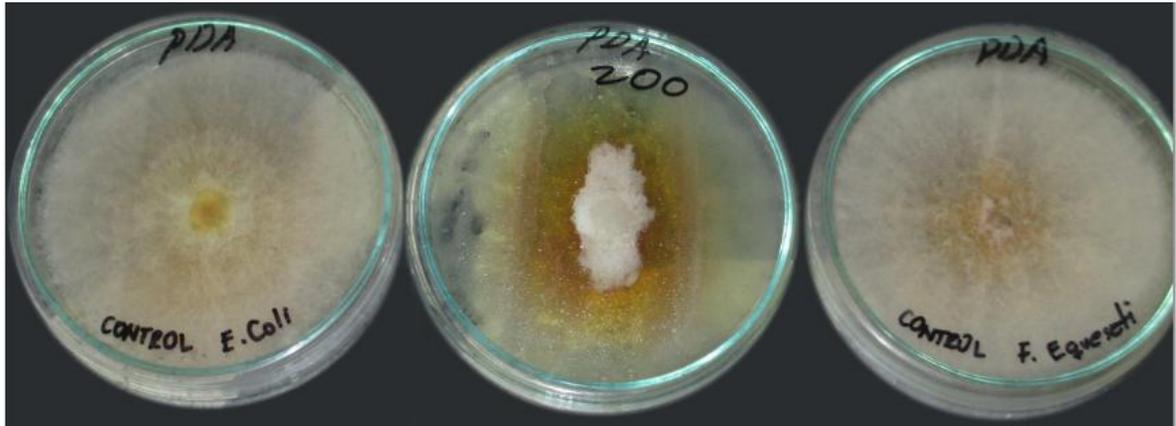


Figura 17. Inhibición de *Fusarium equiseti* por *Bacillus subtilis*.



Bacillus subtilis en el centro, los controles negativos a los extremos.

La capacidad antagónica de *Bacillus subtilis* esta dada por la producción de diversos metabolitos, entre los que se incluyen la Iturina A y fengicina, ambas son lipopéptidos que tiene un enorme potencial dentro del control biológico ya que pueden inhibir un rango amplio de patógenos de plantas (Ragazzo, 2011); además se destaca la producción de diversas enzimas que actúan fundamentalmente sobre hongos como *Fusarium stilboides*, *F. oxysporum*, *F. xylarioides* y *Rhizoctonia solani* entre esas enzimas se destacan lipasas, proteasas y β -1,3 -glucanasas (Tejera , 2011).

4.7 PRODUCCION DE QUITINASAS.

Para evaluar la producción de quitinasas, los microorganismos fueron sembrados en medio quitina coloidal, se utilizó *Serratia marcescens* como control positivo, sin embargo ninguna de las 16 cepas microbianas evaluadas mostró actividad quitinolítica, al no presentar crecimiento ni halos de solubilización.

La mayoría de los microorganismos evaluados en este trabajo corresponden a bacterias gram positivas del género *Bacillus*, existen reportes de algunas cepas de este género que pueden producir quitinasas (Okumoto *et al.* 2001) sin embargo en este trabajo ningún microorganismo exhibió actividad quitinolítica.

Figura 18. *Serratia marcescens*, control positivo usado en la evaluación de quitinasas.



4.8 CONSTRUCCION DE ARBOLES FILOGENETICOS

El análisis de las secuencias del gen ADNr 16S para las cepas bacterianas y de la región ITS para la levadura permitió obtener los árboles filogenéticos que se esquematizan en las figuras 19 y 20 respectivamente.

La cepa identificada como 200 AG B (*Bacillus subtilis*) fue agrupada con *Bacillus amyloliquefaciens* la cual fue aislada en plantas de maní (NCBI, 2011), de este microorganismo se han reportado cepas con uso potencial en biocontrol debido a que su capacidad de producir quitinasas, que actúan frente a hongos fitopatógenos inhibiendo su crecimiento (Balvatín et al., 2009). Gül y colaboradores reportaron en 2008 dos cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* (FZB24 y FZB42) promotoras del crecimiento vegetal, que aumentaron la producción de plantas de tomate en un 8-9% con respecto un tratamiento control (Gül et al., 2008), estas características al parecer conservadas, son también coherentes con los hallazgos obtenidos en este trabajo ya que la cepa 200, mostró

actividad antagonista frente al fitopatógeno *Fusarium equiseti* y capacidad como promotor de crecimiento vegetal en las plantas de tomate.

La cepa bacteriana 203 aunque si bien es la más alejada del grupo, no obstante también fue agrupada con la cepa 200, este microorganismo fue identificado previamente como *Bacillus pumilus*, pero en este trabajo no mostró ningún tipo de actividad como promotor de crecimiento vegetal.

La cepa 188, al agruparla muestra similitud con *Bacillus pumilus*, este microorganismo fue aislado en solventes orgánicos (NCBI, 2010), estos microorganismos que presentan la característica de ser tolerantes a solventes orgánicos tienen un uso potencial en procesos de biorremediación y de biocatálisis en presencia de estas sustancias (Sardessai y Bhosle, 2004).

Las demás cepas evaluadas en este trabajo, no fueron agrupadas de manera que se pueda establecer inferencias a partir de los datos obtenidos y que se esquematizan en el árbol, debido a que probablemente no hay información suficiente dentro de la región amplificada para agruparlos o separarlos en diferentes grupos.

Figura 19. Árbol filogenético basado en el gen *ADNr* 16S para 15 taxones bacterianos. Para la construcción del árbol se empleó el método Neighbor-Joining con un *Bootstrap* de 10.000 réplicas. El árbol fue realizado en el programa MEGA 5.0, al código de acceso al GenBank se especifica al final del nombre del microorganismo.

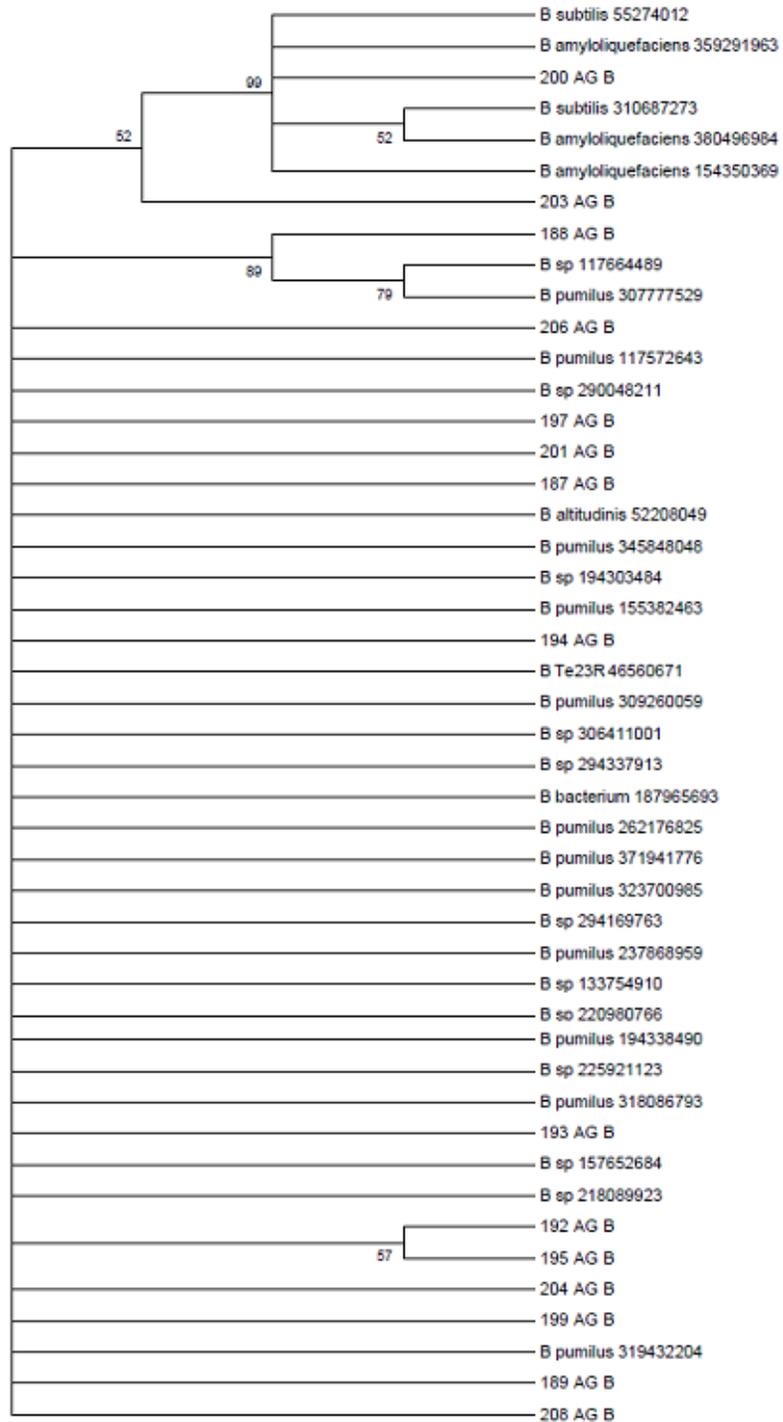
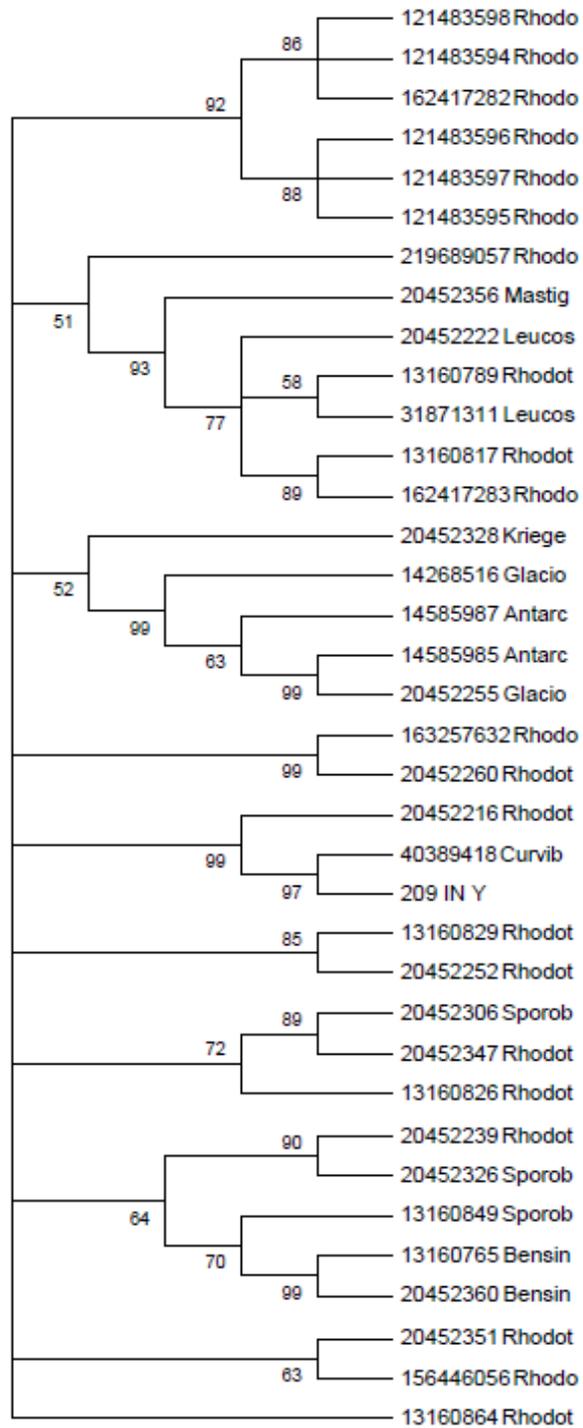


Figura 20. Árbol filogenético basado en la región ITS para la cepa levaduriforme. El código de acceso al GenBank se especifica al inicio del nombre del microorganismo.



En la figura 20, se observa que la levadura identificada con el código 209 IN Y, fue agrupada con el microorganismos 40389418 Curvib, que corresponde a *Curvibasidium pallidicorallinum*, este hongo se caracteriza por ser dimórfico, con hifas de 1,5 a 2,5 μm de diámetro, las hifas se forman después del apareamiento de cepas sexualmente compatibles, posee teliosporas generalmente esféricas aunque a veces pueden ser ovoides y las basidiosporas son de morfología baciliforme.

El microorganismo 20452216 Rhodot, corresponde a *Rhodotorula fujisanensis* y fue dispuesto en el mismo grupo con la levadura 209 IN Y y *Curvibasidium pallidicorallinum*, con respecto a este último comparte la capacidad de formar teliosporas, esporas de resistencia donde ocurre la cariogamia y cuya germinación induce la formación de un tubo germinal. Tras la meiosis generan basidiosporas haploides que germinan y que pueden dar origen a hifas que producen otros tipos de esporas o bien conidios, por tanto no generan cuerpos fructíferos.

Estos géneros de microorganismos no han sido reportados hasta ahora como promotores de crecimiento vegetal (Sampaio *et al.*, 2004), de igual manera en este trabajo la levadura 209 IN Y, no mostró potencial como promotora de crecimiento vegetal.

CONCLUSIONES

- El microorganismo *Bacillus subtilis* (GIBI_000206_IN_B), fue dentro de 15 cepas bacterianas y una levaduriforme evaluadas, el mejor productor de Ácido Indol-acético (AIA), al ser evaluado in vivo sobre plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* variedad Santa Clara) mostró tener capacidad como promotor de crecimiento vegetal.
- La cepa de *Bacillus pumilus* (GIBI_000206_IN_B) y *Bacillus subtilis* pueden solubilizar fosfatos, lo que las hace aptas como promotores de crecimiento vegetal (PGRPs)
- *Bacillus subtilis* debido a su capacidad para producir diversos metabolitos que inhiben el desarrollo de hongos y bacterias que afectan los cultivos de interés económico, ha mostrado el mayor porcentaje de inhibición frente al fitopatógeno *Fusarium equiseti*, es un microorganismo importante para ser utilizado como biocontrolador.
- Los ensayos realizados en este trabajo permitieron determinar que ninguna de las cepas microbianas evaluadas tiene potencial como productora de quitinasas.
- Los análisis filogenéticos mostraron que la cepa *Bacillus subtilis* (GIBI_000206_IN_B), fue agrupada con cepas microbianas que han sido reportados en la literatura como promotores de crecimiento vegetal, específicamente con *Bacillus amyloliquefaciens*.

RECOMENDACIONES

- La cepa de *Bacillus subtilis* debe ser evaluada hasta la fase de producción en plantas de tomate, de manera que pueda verificarse si su inoculación beneficia estadísticamente o no la producción, ya que la finalidad misma de usarlo como bioinsumo debe verse reflejada en la formación del fruto.
- Se sugiere hacer una comparación de *Bacillus subtilis* con respecto a diversos tratamientos en los que se haga aplicación de abonos químicos y determinar en qué proporción pueden ser reemplazados los agroquímicos cuando se hacen inoculaciones con el microorganismo.

BIBLIOGRAFÍA

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Baldauf S. (2003). Phylogeny for the faint of heart: a tutorial. *Trends in Genetics* .19(6): pp 345-351.
- Balvatín C., Cerda F., Lira R. (2009). Biotecnología en el control de microorganismos fitopatógenos. *CIENCIA CIERTA*.19: pp 111-117
- Bellaaj O., Younes I., Younes H., Hajji S., Nasri M.(2012). Chitin extraction from shrimp shell waste using Bacillus bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules* 51:1196– 1201.
- Benítez S, Bustamante J., Sánchez P., Corrales L. (2007). Aislamiento de los microorganismos cultivables de la rizosfera de *Ornithogalum umbellatum* y evaluación del posible efecto biocontrolador en dos patógenos del suelo. *Nova* [en línea], 5 (julio-diciembre) : [fecha de consulta: 20 de marzo de 2012] Disponible en:
<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=41150805>
- Bernal L. (2010). Aislamiento de microorganismos solubilizadores de P (PSM) de las raíces de *Vanilla* sp. Tesis de grado. *Pontificia Universidad Javeriana*. Bogotá.
- Bhagwat. M., Young. L., Robinson R. (2012). *Using BLAT to Find Sequence Similarity in Closely Related Genomes*. Current Protocols in Bioinformatics. Mar;Chapter 10:Unit10.8.
- Castañeda-Agulló M. (1956). *Studies On The Biosynthesis Of Extracellular Proteases By Bacteria*. *J. Gen. Physiol.* 89: 369–373.
- Castillo G., Altunoa B., Michelena G., Sánchez J., Acosta M.(2005). Cuantificación del contenido de ácido indol-acético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. *Anales de Biología*. 27: 137-142.
- Castro. S, Roa C. 2006. Bacterias endófitas de *Cordia alliodora* Oken y *Tabebuia rosea* Bertold D.C: potencial como promotoras de crecimiento vegetal en la propagación de su hospedero. Carrera de Microbiología Agrícola y Veterinaria, Facultad de ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Castro R., Álvarez A., Machado E., Mendoza M., Gómez R., García P. (2011). Caracterización de una quitinasa extracelular producida por *Serratia* sp. BIOMI-363706 usando quitina coloidal como sustrato. *Revista Sociedad Química de Perú*. 77 (2): 101-108
- Celis. L, Gallardo. I. 2008. Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (Acido Indol-acético y Giberelinas) en cultivos microbianos. Carrera de Microbiología Agrícola y Veterinaria, Facultad de ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.

- Chien S., Gearhart M., Collamer D. (2008). Acidez generada por los fertilizantes nitrogenados: Nueva evaluación de los requerimientos de cal. *Informaciones agronómicas*. 41:16-17.
- Cordis.(2011).El sistema inmunitario. *Servicio de Informacion Comunitario sobre investigación y desarrollo*. [en línea] http://cordis.europa.eu/fetch?CALLER=NEWSLINK_ES_C&RCN=33388&ACTION=D (Consultada: 17 de Agosto de 2012)
- Corpoica. (2007). Manual técnico. Buenas prácticas agrícolas en la producción de tomate bajo condiciones protegidas. Primera Edición. FAO. Gobernación de Antioquia.
- Cruz R., Hernández F., Gallegos G., Rodríguez R., Aguilar C., Padrón E., Reyes M. (2006). *Bacillus* spp. Como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento en el cultivo de chile. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 24 (002) : 105-114.
- Felici, C.; Vettori, L.; Giraldi, E.; Forino, L.A.; Toffanin, L.; Tagliasacchi, L.A.; Nuti, M. (2008). Single and co-inoculation of *Bacillus subtilis* and *Azospirillum brasilense* on *Lycopersicon esculentum*: Effects on plant growth and rhizosphere microbial community. *Applied Soil Ecology*. 40: 260–270.
- Fernández L., Zalba P., Gómez M., Sagardoy M. (2005). Bacterias solubilizadoras de fosfato inorganico aisladas de suelos de la región sojera. *Cl. Suelo (Argentina)*.. 23 (1): 31-37.
- Finagro. (2012). Tomate. [en línea] https://www.finagro.com.co/html/i_portals/index.php?p_origin=internal&p_name=content&p_id=MI-256&p_options=#COLOMBIA (Consultada: 19 de Agosto de 2012)
- Fortuna J. (2009). Caracterización bioquímica y molecular de quitinasas en cepas mexicanas de *B. thuringiensis*. Tesis de grado. *Instituto politécnico Nacional*. Reynosa, México.
- Franco C. (2008).Evaluación de caracteres PGRP en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Tesis doctoral. España. Universidad de Granada.
- Hall. T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Harvey P., Nee S. (1993).New uses for new phylogenies. *European Review*.1: pp 11-19
- Izzeddin N., Medina L. (2011). Efecto del control biológico por antagonistas sobre fitopatógenos en vegetales de consumo humano. *Salus online*. Antagonistas y fitopatógenos en vegetales. 15(3): 8-18
- Jin. Y., Yu. C., Kuen Y. (2009). Cloning and expression of chitinase a from *serratia marcescens* for large-scale preparation of *n,n*-diacetyl chitobiose. *Journal of the Chinese Chemical Society*. 56: 688-695.
- Lang. W., lung. I., How. C. Choan K., Teish. W., Kuo. Y., Jon. J., Lu. C.(2002). Production of antifungal compounds from chitin by *Bacillus subtilis*. *Enzyme and microbial Tecnology*. 31: 321-328.

- León A., Llinás H., Tilano J. (2008). Análisis multivariado aplicando componentes principales al caso de los desplazados. *Ingeniería y desarrollo*. Universidad del norte. Enero –Junio (23): 119-142.
- Li. W., Godzik. A. (2006). Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*. 22 (13): 1658-1659.
- Liu Y., Tao Y., Yan Y., Li B., Li H., Li C.(2011).Biocontrol Efficiency of *Bacillus subtilis* SL-13 and Characterization of an Antifungal Chitinase. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 19(1) :128-134.
- López A. (2009). Comportamiento de cuatro heteroinjertos (HIB) de tomate (*Lycopersicon sculentum* Mill) frente a la enfermedad de la gota producida por *Phytophthora infestans* de Bary. Tesis de grado. *Pontificia Universidad Javeriana*. Bogotá.
- Loredo C., López L., Espinosa D. (2004).Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: una revisión. *TERRA Latinoamericana*. 22(2):. 225-239.
- Maldonado E., Ochoa L., Tlapal B. (2008). Efecto del ácido acetil salicílico y *Bacillus subtilis* en la infección causada por Cucumber mosaic virus en calabacita. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 14 (1). Pp. 55-59.
- Mantilla M. (2007).Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de Crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* var. yoko ono) en periodo de enraizamiento. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.
- Meister Media Worldwide. Plagas y enfermedades del tomate: Guía de identificación y manejo. *Productores de Hortalizas*. Marzo, 2006.
- Morales F., Tamayo P., Castaño M., Olaya C., Martínez A., Velasco A. (2009) Enfermedades virales del tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) en Colombia. *Fitopatología Colombiana*. 33(1): 23-27.
- Nava I .(2009) .Demostración de la actividad de quitina desacetilasa en *Bacillus thuringiensis*. Trabajo de grado. *Instituto Politécnico Nacional*. México.
- NCBI. (2011). *Bacillus amyloliquefaciens* strain SWM1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. [en línea]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/359291963> (Consultada: 24 de Octubre de 2012)
- NCBI. (2010). *Bacillus pumilus* strain AK39674 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. [en línea]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/307777529> (Consultada: 24 de Octubre de 2012)
- Orietta F., Larrea V. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo integrado de plagas (Costa Rica)*. 62: 96-100.
- Okumoto S., Bustamante., Gamboa A.(2001) .Actividad de cepas de bacterias quitinolíticas antagonistas a *Alternaria solani* in vitro. *Manejo integrado de plagas (Costa Rica)*. 59:.. 58-61
- Paredes M., Espinosa D. (2010). Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra latinoamericana*. 28(1): 61-70.

- Patiño C. (2010). Solubilización de fosfatos por poblaciones bacterianas aisladas de un suelo del valle del Cauca. Estudio de biodiversidad y eficiencia. Trabajo de grado. *Universidad Nacional de Colombia*. Palmira.
- Pérez R. (2012). Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal en pepino (*Cucumis sativus* L.) . *Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas*. Tesis de maestría. Montecillo, Texcoco. México
- Pinto A., Uribe L., Blanco J., Fontecha G., Rodríguez C., Mora M., Janzen D., Chavarría F., Díaz J., Sittenfeld A. (2007). Actividades enzimáticas en aislamientos bacterianos de tractos digestivos de larvas y del contenido de pupas de *Automeris Zugana* y *Rothschildia lebeau* (Lepidoptera: saturniidae). *Revista Biología Tropical*. 55 (2): 401- 415
- Ragazzo J., Robles A., Lomelí L., Luna G., Calderón M. (2011). Selección de cepas de *Bacillus* spp. Productoras de antibióticos aisladas de frutos tropicales. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 17 (Especial 1): 5-11.
- Rattanakit N, Plikomol A, Yano S, Wakayama M, Tachiki T, (2002), Utilization of Shrimp Shellfish Waste as a Substrate for Solid-State cultivation of *Aspergillus* sp. S 1- 13: Evaluation of a Culture Based on Chitinase Formation Which Is Necessary for Chitin-Assimilation, vol 93, No. 6, 550-556
- Reyes. I, Álvarez. L, El-Ayoubi. H, Valery. A. 2008. *Selección y evaluación de rizobacterias promotoras de crecimiento en pimentón y maíz*. *Bioagro*. 20: 37-48.
- Rinaudo M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci*. 31 603–632.
- Rodicio. M.R., Mendoza. M.C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicación en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 22 (4): pp 238-245
- Rodríguez C., Martín M. (2009). Aislamiento y selección de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en cultivos de Uchuva (*Physalis peruviana* L.) con capacidad antagónica frente a *Fusarium* sp. Tesis de grado. Bogotá, Colombia. Pontificia Universidad Javeriana
- Saharan BS., Nehra V. (2001). Plant growth promoting rhizobacteria: A critical review. *Life Sciences and Medicine Research*. Volume 2011: LSMR-21.
- Sampaio. J., Golubev. W., Fell. J., Gadanho .M., Golubev. N. (2004) .*Curvibasidium cygneicollum* gen. nov., sp. nov. and *Curvibasidium pallidicorallinum* sp. nov., novel taxa in the Microbotryomycetidae (Urediniomycetes), and their relationship with *Rhodotorula fujisanensis* and *Rhodotorula nothofagi*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54: pp 1401-1407.
- San L., Tzu W., Yue H.(2011). Bioconversion of chitin-containing wastes for the production of enzymes and bioactive materials. *Carbohydrate Polymers*. 84:732–742
- San L., Tzu W., Yue H., Hui F., Yu J. (2006). Bioconversion of shellfish chitin wastes for the production of *Bacillus subtilis* W-118 chitinase. *Carbohydrate Research*. 341: 2507–2515.

- Sandria J. (2003). Aplicaciones de la Inteligencia Artificial al análisis de Biosecuencias. Tesis de Maestría (maestría en inteligencia artificial). Universidad Veracruzana. Veracruz, México.
- Santiago J., Mendoza M., Borrego F. (1998). Evaluación de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) en invernadero: criterios fenológicos y fisiológicos. *Agronomía Mesoamericana*. 9(1): 59-65.
- Sardessai Y., Bhosle S. (2008). Industrial potential of organic solvent tolerant bacteria. *Biotechnol Prog*. May-Jun; 20(3): pp 655-60.
- Sastoque E. (2005). Aislamiento y selección de microorganismos productores de quitinasas a partir de residuos de concha de camarón con potencial biocontrolador. Tesis de grado. *Pontificia Universidad Javeriana*. Bogotá.
- Sastoque E., Mercado M., Martínez M., Quevedo B., Rodríguez M. (2007). Producción de quitinasas extracelulares de una cepa alcalófila halotolerante de *Streptomyces* sp. Aislada de residuos de camarón. *Revista mexicana de Ingeniería Química*. 6 (002): Pp. 137-146.
- Sosa A., Pazos R., González M. (2006). Nuevos aislados de *Bacillus* spp. Antagonistas a *Sclerotium rolfii*, *Rhizoctonia solani* y *Pythium aphanidermathum*. *Fitosanidad*. 10 (1): Pp. 73-74.
- Taiz L., Zeiger E. (2010). *Plant Physiology*. Quinta Edición. Editorial Sinauer, New York. Pp 428.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Tejera B., Rojas M., Heydrich M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 42 (3): 131-138.
- Thompson JD , Gibson TJ , Higgins DG. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. (2002) *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D. Baxevanis ... [et al.]*, Chapter 2 :Unit 2.3
- Thompson J., Higgins D., Gibson T. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 22: pp 4673-4680.
- Tien T.M., Gaskins M.H, Hubbell D.H. (1979). Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl Miller (*Pennisetum americanum* L.). *Applied and Environmental Microbiology*. 37(5): 1016-1024.
- Toledo D. (2004). Evaluación in vitro del efecto de cepas nativas de la bacteria *Bacillus* sp. En el biocontrol de la bacteria *Erwinia carotovora*. Trabajo de grado. Universidad de Talca. Chile.
- Trujillo I., Díaz A., Hernández A., Heydrich M. (2007). Antagonista de cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia* contra hongos fitopatógenos del arroz y el maíz. *Revista protección vegetal*. 22 (1): 41-46.

- Tsavkelova, E.; Cherdyntseva, T.A.; Botina, S.G.; Netrusov, A.I. (2007). Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiological Research*. 162: 69-76.
- Wang S, Yen Y, Tzeng G, Hsieh C, (2005), Production of antifungal materials by bioconversion of shellfish chitin wastes fermented by *Pseudomonas fluorescens* K-188, *Enzyme and Microbial Technology*, Journal of bioscience and bioengineering. Vol. 36 49–56
- Yu C., Bassler N., Lee C., Roseman S. (1991). Chitin utilization by marine bacteria. Degradation and catabolism of chitin oligosaccharides by *Vibrio furnissii*. *The journal of Biological Chemistry*. 266: Pp. 24276- 24286.
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L., and Miller W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 2000; 7(1-2):203-14

ANEXO 1. Medios de cultivo

AGAR NUTRITIVO

Extracto de carne	1 g/L
Extracto de levadura	2 g/L
Peptona	5 g/L
Cloruro de Sodio	5 g/L
Agar-agar	15 g/L
pH	7.0

AGAR PDA

Extracto de papa	500 ml/L
D (+) glucosa	10.0 g/L
Agar-agar	17.0 g/L
pH	7.0

CALDO TRIPTICASA DE SOYA

Peptona de caseína	17.0 g/L
Peptona de soya	3.0 g/L
Glucosa	2.5 g/L
Cloruro de sodio	5.0 g/L
Fosfato hidrogeno dipotásico	2.5 g/L
pH	7.0

MEDIO QUITINA COLOIDAL

0,2% de quitina coloidal
0,1% de K_2HPO_4
0,05% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
2% de Agar-agar
pH de 7.0

MEDIO PIKOVSKAYA

Extracto de levadura	0.50
Dextrosa	10.00
Fosfato de calcio	5.00
Sulfato de amonio	0.50
Cloruro de potasio	0.20
Sulfato de magnesio	0.10
Sulfato de manganeso	0.0001
Sulfato ferroso	0.0001
Verde de bromocresol	0,022
Agar -agar	15.00
pH	7.0

El fosfato de calcio se autoclava en seco, y se adiciona después de autoclavar el medio con los demás componentes (Franco, 2008).

ANEXO 2. Análisis de medias para el porcentaje de germinación de semillas con inóculo y sin inóculo

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
Porcentaje de Germinacion	Se han asumido varianzas iguales	,000	1,000	,877	10	,401	6,66667	7,60117	-10,26979	23,60313
	No se han asumido varianzas iguales			,877	9,769	,402	6,66667	7,60117	-10,32429	23,65762

ANEXO 3. Análisis de medias para la mortalidad de plantas con inóculo y sin inóculo

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
Mortalidad	Se han asumido varianzas iguales	1,397	,265	-7,730	10	,000	-45,00000	5,82142	-57,97092	-32,02908
	No se han asumido varianzas iguales			-7,730	6,476	,000	-45,00000	5,82142	-58,99460	-31,00540

ANEXO 4. Prueba de Duncan para la Producción de AIA

CONCENTRACION A.I.A

	CEPA	N	Subconjunto	
			1	2
Duncan ^{a,b}	209	3	2,4933	
	208	3	2,6767	
	204	3	2,9667	2,9667
	193	3	3,2933	3,2933
	203	3	3,3067	3,3067
	199	3	3,4467	3,4467
	188	3	3,5767	3,5767
	187	3	3,9833	3,9833
	194	3	4,0133	4,0133
	201	3	4,0400	4,0400
	189	3	4,1367	4,1367
	197	3	4,1600	4,1600
	206	3	4,2300	4,2300
	192	3	4,3733	4,3733
	195	3	5,0367	5,0367
	200	3		5,4700
	Sig.		,063	,067

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 1,842.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000

b. Alfa = ,05.

Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error^a

Variable dependiente:CONCENTRACION A.I.A

F	gl1	gl2	Sig.
,930	15	32	,543

Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.

a. Diseño: Intersección + CEPA

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Residuo para CONCENTRACION.A.I.A	,079	48	,200*	,970	48	,263

a. Corrección de la significación de Lilliefors

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.