

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE BACTERIAS
PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL FRENTE A TRES
AISLAMIENOS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C.
Snyder & H.N. Hansen**

KAREN TATIANA VALENZUELA OSPINA

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES
CENTRO DE INVESTIGACIÓN, PROYECCIÓN Y DESARROLLO
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA
AGROINDUSTRIAL
ESPECIALIZACIÓN EN MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
MANIZALES
2014**

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE BACTERIAS
PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL FRENTE A TRES
AISLAMIENTOS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C.
Snyder & H.N. Hansen**

KAREN TATIANA VALENZUELA OSPINA

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

Director:

**SANDRA MARÍA MARULANDA MORENO
Especialista en Microbiología Industrial**

Asesor:

**NARMER FERNANDO GALEANO VANEGAS
Microbiólogo**

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES
CENTRO DE INVESTIGACIÓN, PROYECCIÓN Y DESARROLLO
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA
AGROINDUSTRIAL
ESPECIALIZACIÓN EN MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
MANIZALES
2014**

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, 24 OCTUBRE de 2014

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación va dedicado con inmenso cariño a mi madre quien desde el cielo aboga por mi bienestar y éxito, a mi padre y hermano quienes han apoyado día tras día mi proceso académico siendo mi fuerza e inspiración para perseguir mis metas. A Sandra Marulanda quien con mucha dedicación me enseñó la hermosa disciplina de investigar y ha sido un ejemplo a seguir en este campo.

A ustedes les dedico este proceso de formación como especialista, el cual será base primordial de lo que constituirá mi vida profesional y laboral en el futuro.

Con cariño,

Tatiana.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a Dios padre por guiarme y darme sabiduría para culminar con éxito este proceso académico, a mi familia y mi directora de proyecto quienes fueron un constante respaldo durante esta experiencia, a Fernando Galeano quien me asesoró en la etapa final del proyecto, al grupo de investigación GIBI quienes muy amablemente me abrieron las puertas para poder ejecutar este trabajo y a la Universidad Católica de Manizales por su labor de formación en programas de posgrado, lo cual me permitió dar un paso más en mi vida profesional.

Atentamente,

Tatiana.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. OBJETIVOS	17
5. MARCO TEORICO.....	18
5.1. Generalidades del cultivo de tomate	18
5.2. Marchitez vascular en tomate.....	20
5.2.1. <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>lycopersici</i>	21
5.3. Bacterias promotoras de crecimiento vegetal.....	23
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
6.1. Microorganismos	25
6.2. Reactivación de microorganismos.....	25
6.3. Pruebas de antagonismo.....	26
6.3.1. Antagonismo directo: cultivos duales.....	26
6.4. Pruebas funcionales	27
6.4.1. Pruebas cualitativas de producción de quitinasas	27
6.4.2. Pruebas cualitativas de producción de celulasas.....	27
6.4.3. Pruebas cualitativas de producción de proteasas.....	27
6.5. Análisis estadístico	27
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
8. CONCLUSIONES.....	37
9. RECOMENDACIONES	38
10. BIBLIOGRAFÍA.....	39
ANEXOS.....	43

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Agentes causales de Marchitez en Tomate	20
Tabla 2. Biocontrol de hongos fitopatógenos de Tomate.....	23
Tabla 3. Bacterias evaluadas como antagonistas frente a <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	25
Tabla 4. Clasificación de Bacterias según su desempeño.....	28
Tabla 5. Reporte de bacterias antagonistas de <i>Fusarium oxysporum</i> en los últimos cinco años.....	31
Tabla 6. Promedio del crecimiento micelial en mm a los 6 días de incubación.	32
Tabla 7. Pruebas funcionales a bacterias Superiores y Buenas.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Planta de Tomate	18
Figura 2. Cultivares de Tomate comunes en Colombia.	19
Figura 3. Marchitamiento unilateral de la planta de tomate	21
Figura 4. <i>Fusarium oxysporum</i>	22
Figura 5. Plantilla para pruebas de antagonismo directo	26
Figura 6. Cepa con el mayor porcentaje de inhibición micelial (GIBI_000139_AG_B).....	29
Figura 7. Cepa con porcentaje nulo de inhibición micelial (GIBI_00146B_AG_B).29	
Figura 8. Comparación de los porcentajes de Inhibición superior obtenidos frente al promedio reportado en los últimos 5 años.	32
Figura 9. Dendrograma de pruebas enzimáticas a BPCV.	33

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Agar PDA.....	43
Anexo 2. Caldo DYGS	43
Anexo 3. Medio Quitosano N° 1.....	43
Anexo 4. Medio Quitosano N° 2.....	43
Anexo 5. Medio CMC N° 1	44
Anexo 6. Medio CMC N° 2.....	44
Anexo 7. ANDEVA.....	44
Anexo 8. Medias del porcentaje de inhibición micelial	45

RESUMEN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L) es una hortaliza de producción mundial que provee grandes aportes económicos a nivel nacional. Una de las enfermedades que lo afecta es la Marchitez vascular que se relaciona con pérdidas del 60% de producción. El manejo de esta enfermedad se hace frecuentemente con agroquímicos, los cuales aumentan los costos de producción y tienen repercusiones negativas en el medio ambiente y la salud pública. Uno de los agentes causales más común es el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici*, del cual se conocen 3 razas. Actualmente se buscan estrategias diferentes para realizar el manejo de las enfermedades vegetales, por ejemplo, el uso de bioinsumos que son más económicos y amigables con el medio ambiente en comparación con los insumos de síntesis química.

En este trabajo se hizo una tamizaje entre 34 BPCV para evaluar su capacidad antagónica frente a tres aislamientos del patógeno mencionado. En agar PDA se hicieron pruebas de antagonismo directo entre las BPCV y el hongo. Se calculó el porcentaje de inhibición micelial y se escogieron 15 bacterias con los mejores y peores índices de antagonismo, a través de un análisis de varianza y pruebas de comparación clasificándose en cuatro categorías (Superiores, Buenas, Deficientes y Nulas) donde el menor porcentaje de inhibición fue 0% y el mayor 77.56%. Se realizaron pruebas funcionales que permitieron determinar la capacidad de producción de enzimas tales como: Quitinasas, Proteasas y Celulasas, esperando una relación entre antagonismo y actividad enzimática.

A través de un dendrograma se reconocieron 4 grupos (1, 2, 3 y 4), donde se observó que las bacterias agrupadas en cada uno de estos, no tenían relación respecto a su actividad enzimática o género con el antagonismo mostrado por ellas. Por su parte, las 10 bacterias superiores y buenas fueron comparadas y se encontró que 8 de estas fueron positivas para Quitinasas y 5 fueron positivas para Proteasas. Dichas enzimas están relacionadas con la degradación de la pared celular de los hongos ya que uno de los componentes principales de esta es la quitina. Teniendo en cuenta lo anterior, surge la idea tentativa de que la actividad enzimática de las 10 mejores bacterias, puede ser uno de los mecanismos que utilizaron para ejercer el efecto antagónico sobre el patógeno. Para poder definir con certeza cuales son los mecanismos de acción antagónica de las bacterias, es necesario utilizar técnicas que permitan evaluar otras características diferentes a la producción de enzimas, tales como: producción de antibióticos, biosurfactantes, sideróforos, entre otros.

Palabras clave: BPCV, *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici*, Antagonismo, Marchitez vascular, Tomate.

ABSTRACT

Tomato culture (*Solanum lycopersicum* L) is a world farming vegetable that provides lots of income to nation. One of the diseases that affect it is Vascular Wilt, which is related to 60% production losses. To manage this disease is frequently used agrochemical products, which represents a rise of production costs and have a negative effect on environment and public health. One of the most common causal agents is the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* that have three races. Nowadays, different strategies to manage plant diseases are sought out, for example, use of bioinputs that is cheaper and friendlier with environment than agrochemicals.

In this work a screening of 34 PGPB was conducted to evaluate its antagonistic capacity over three strains of pathogen mentioned above. On PDA medium, direct antagonism test was made between PGPB and fungus. The mycelia inhibition percentage was calculated and 15 bacteria with best and worst results was chosen using analysis of variance and means comparisons test in order to classify it in four categories (Superior, Good, Poor and Void) where lesser inhibition percentage was 0% and major one was 77.56%. Functional tests were made to determine the ability of bacteria to produce enzymes like: Chitinases, Proteases and Celluloses.

Building a dendrogram, 4 groups (1, 2, 3 y 4) were recognized. Bacteria isolates belonging to the same cluster do not have any particular related characteristic, no enzymatic activity or bacteria genera. On the other hand, the 10 superior and good bacteria were compared, 8 of this ones were positive to Chitinases and 5 ones were positive to Proteases. Those enzymes are related to degradation of cell wall of fungus because one of the principal constituents of this is Chitin. Based on that, hypothesis about enzymatic activity of 10 best bacteria could be one of the mechanisms responsible of antagonistic performance. In order to define certainly which are the mechanisms of antagonistic action of bacteria, is necessary to use techniques to value another characteristics different to enzyme production, like: antibiotic, biosurfactants, siderophores among others.

Key Words: PGPB, *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici*, Antagonism, Vascular Wilt, Tomato.

1. INTRODUCCIÓN

La producción de tomate (*Solanum lycopersicum* L) representa un importante renglón en la economía colombiana. En el año 2012 la producción nacional alcanzó casi 650.000 toneladas, según datos reportados por la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). La producción de esta hortaliza se ve amenazada por el ataque de gran número de plagas y enfermedades que impactan enormemente los ingresos de los agricultores.

La Marchitez vascular es una de las enfermedades mas comunes en tomate, se ha reportado en por lo menos 32 países y genera perdidas del 60%. Es causada por diferentes generos de microorganismos entre los que se incluyen bacterias, hongos y nemátodos. Los signos de enfermedad incluyen desde marchitamiento unilateral de la planta hasta necrosis total.

Uno de los agentes causales es el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici*, que es capaz de propagarse muy fácilmente a través de sus esporas para invadir los cultivos y pueden permanecer por largos periodos de tiempo en el suelo, debido a unas estructuras especializadas llamadas clamidosporas que les permiten sobrevivir aun cuando no está presente su hospedero. Actualmente se conocen 3 razas diferentes de este patógeno.

Existen escasas medidas de control de la enfermedad, dentro de las que se destaca el uso de agroquímicos con sus consabidas consecuencias negativas a nivel económico por sus altos costos, a nivel medioambiental e incluso tiene repercusión sobre la salud pública. Recientemente el uso de insumos biológicos basados en microorganismos o sus metabolitos, ha constituido una estrategia interesante en el control de enfermedades infecciosas en plantas. Las Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV) se han propuesto como microorganismos con capacidad antagónica frente a un número importante de patógenos de plantas, constituyendo una alternativa promisoras para el control integrado de enfermedades.

Las BPCV, se encuentran en el suelo como mutualistas obligados y no obligados, donde interactúan con la planta y otros microorganismos. Además de favorecer el desarrollo vegetal, tienen actividad antagónica frente a patógenos a través de diferentes mecanismos como: Producción de antimicrobianos, biosurfactantes y enzimas, competencia por nichos y nutrientes, e inducción del sistema de resistencia de la planta.

En el presente trabajo se pretende hacer una selección de BPCV con actividad antagónica sobre *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici*, por medio de un tamizaje entre 34 bacterias que pertenecen a la colección de microorganismos del Instituto de Investigación en Microbiología y Biotecnología Agroindustrial de la Universidad Católica de Manizales.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Marchitez vascular causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, es una enfermedad de gran impacto en cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum* L) en nuestro país. Dicha enfermedad, ha sido reportada en los departamentos de Antioquia, Caldas, Huila, Santander, Tolima y Valle del Cauca (Tamayo M & Jaramillo N, 2006) causando pérdidas superiores al 60% (Ascencio Álvarez et al., 2008).

El patógeno, se favorece de las condiciones ambientales y se transmite en semillas o a través del suelo contaminado. Los restos de las plantas afectadas son fuente de inóculo, puesto que el hongo tiene la capacidad de esporular fácilmente y de esta manera se moviliza por medio del viento y el agua hasta alcanzar las plantas sanas. También es capaz de desarrollar estructuras especializadas llamadas clamidosporas, que le permiten sobrevivir en el suelo por largos periodos de tiempo. (Escalona C, Alvarado V, Monardes, Urbina Z, & Martin B, 2009).

La contaminación de los cultivos de tomate con *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* disminuye la tasa de crecimiento de las plantas y causa deterioro parcial o total del cultivo, por tanto, decrece la producción y esto se ve reflejado en resultados negativos a nivel económico.

La incidencia de la Marchitez vascular por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* resulta tan grave en algunas zonas del país, que los productores se han visto obligados a adoptar medidas preventivas como la desinfección del suelo para el cultivo y la siembra individual de plantas con el material preparado; lo cual incrementa los costos debido a la mayor inversión de tiempo y recursos para la producción (Jaramillo N, Rodríguez, Guzman A, Zapata, & Rengifo M, 2007).

El control de esta enfermedad ha sido manejada mediante la aplicación de insumos de síntesis química que además de ser costosos pueden representar un riesgo para el medio ambiente y la salud humana y animal. El uso inadecuado de los agroquímicos se ha asociado con suelos anegados, desérticos, salinos, erosionados, entre otros, que los hacen improductivos. Además, también tienen un impacto sobre el agua, puesto que por fenómenos de desagüe o lixiviación, pueden alcanzar fuentes hídricas superficiales y profundas. (Ongley, 1997). Aproximadamente, sólo un 0.1% de dichos insumos químicos tiene contacto con el patógeno, por tanto la gran mayoría se convierte en un contaminante ambiental que repercute sobre el suelo, agua, microorganismos nativos y salud pública. (Torres & Capote, 2004).

Por lo anterior, se hace necesario explorar nuevas alternativas para ser integradas a los esquemas de manejo de la Marchitez vascular que permitan la producción sostenible del cultivo.

3. JUSTIFICACIÓN

El tomate es la segunda hortaliza más producida en el mundo. Colombia ocupa la posición número 30 entre los 173 países productores reportados por la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Para el año 2012 la producción nacional alcanzó 646.904 toneladas, ocupando el puesto número 11 entre 72 cultivos (FAOSTAT, 2012).

El tomate se produce en los departamentos de Boyacá, Caldas, Cauca, Cundinamarca, Huila, Nariño, Norte de Santander, Quindío, Risaralda, Tolima y Valle del Cauca con un área total de cultivo de aproximadamente 8077 Hectareas. (DANE, 2010) Sin embargo, debido a los múltiples problemas fitosanitarios del cultivo, su producción se ve limitada haciéndose necesario el empleo de gran cantidad de agroquímicos.

Una de las principales enfermedades que ataca el tomate es la Marchitez Vascular, para la cual existen pocas medidas de manejo. Recientemente, en el campo de la agricultura, ha venido creciendo y tomando un alto nivel de importancia el control de plagas y enfermedades utilizando distintas especies de bacterias y hongos nativos del suelo o sus metabolitos. Los alcances biotecnológicos, han permitido desarrollar productos a base de estos organismos vivos, los cuales han mostrado resultados promisorios para el control de plagas y enfermedades; trayendo además una ventaja adicional frente a los agroquímicos por ser de bajo costo y amigables con el medio ambiente. (Villa, Frías, & González, 2005).

Dentro de los microorganismos descritos como biocontroladores, las llamadas Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (BPCV), han mostrado grandes ventajas, pues además de otorgar beneficios nutricionales a los cultivos pueden actuar en calidad de antagonistas frente a algunos patógenos.

Las BPCV son microorganismos que hacen parte del ecosistema del suelo, donde se asocian a otros microorganismos y a las plantas. Dichas asociaciones son mutualismos obligados y no obligados que comprenden tres grupos: las bacterias simbióticas formadoras de nódulos, las endofíticas que pueden colonizar estructuras internas de la planta, y las rizobacterias de vida libre asociadas al sistema radicular de la planta. (Criollo, Obando, Sánchez M, & Bonilla, 2012).

Las asociaciones microorganismo-planta ofrecen ventajas competitivas a la planta, pues le permiten mayor versatilidad en la captación y asimilación de nutrientes, una mayor tolerancia al estrés ambiental, resistencia frente a patógenos y básicamente contribuyen al mantenimiento de la salud vegetal de forma directa. También ejercen su actividad de manera indirecta actuando en calidad de biocontroladores o antagonistas de patógenos, lo que resulta en un incremento de la tasa de crecimiento de las plantas y por lo tanto un aumento en el rendimiento de los cultivos. (Rives, Acebo, & Hernández, 2007).

La Colección de Microorganismos del Instituto de Investigación en Microbiología y Biotecnología Agroindustrial de la Universidad Católica de Manizales cuenta con un importante número de cepas catalogadas como BPCV provenientes de agroecosistemas de regiones caldenses. Este grupo de bacterias tienen actividades relacionadas con promoción de crecimiento vegetal demostradas, sin embargo, hasta la fecha no se ha evaluado su actividad como biocontroladores.

En el presente trabajo se pretende realizar un tamizaje y selección de BPCV basados en su capacidad antagónica frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* con miras a proponer alternativas para el manejo de la Marchitez vascular en el cultivo de tomate, contribuyendo a la optimización de Buenas Prácticas Agrícolas y producción sostenible de este cultivo en el país.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la capacidad antagónica de Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal frente a tres aislamientos de *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Medir el efecto antagonico de Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal frente al hongo *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* mediante ensayos de actividad *in vitro*.
- Determinar la capacidad de producción de enzimas antifúngicas en las bacterias que presentan mayor actividad antagónica a través de pruebas funcionales.

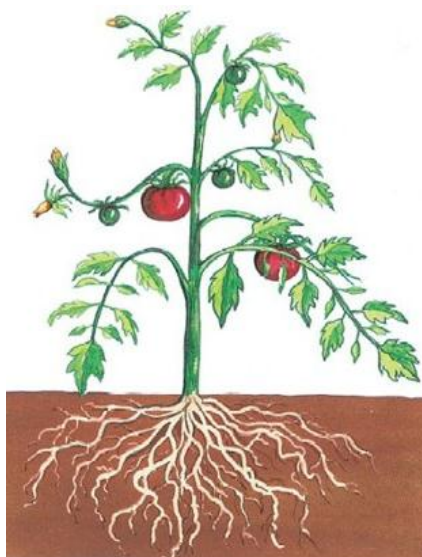
5. MARCO TEORICO

5.1. Generalidades del cultivo de tomate

Uno de los vegetales de producción agrícola con significativa expansión a nivel mundial es el tomate común *Solanum lycopersicum* L (Peralta, Knapp, & Spooner, 2006) Se clasifica taxonómicamente en Reino: *Plantae*, División: *Tracheophyta*, Clase: *Agnoliopsida*, Orden: *Solanales*, Familia: *Solanaceae*, Género: *Solanum* y Especie: *Solanum lycopersicum* L (ITIS, 2014).

La planta de tomate (Figura 1) se desarrolla sobre el suelo, partiendo de un sistema radicular que puede llegar a medir 2 metros de profundidad, el cual se compone de una raíz primaria y muchas secundarias. Su tallo principal es anguloso, semileñoso, velloso y su grosor oscila entre 2 – 4 cm en la base, mientras que en la parte distal está el meristemo apical, donde se inician los nuevos primordios foliares y florales. Las hojas están ubicadas de forma alternada sobre el tallo, son compuestas e imparipinnadas, con folíolos peciolados, lobulados y con borde dentado. La primera flor se forma en la yema apical y las demás se desarrollan lateralmente por debajo de la primera, tienen cinco o más sépalos, de igual número de pétalos amarillos dispuestos en forma helicoidal y de igual número de estambres que se alternan con los pétalos. Por último se encuentra el fruto que puede ser bilocular o plurilocular y su peso va desde pocos miligramos hasta 600 gramos aproximadamente; se constituye de pericarpio, tejido placentario y semillas (Escalona C et al., 2009).

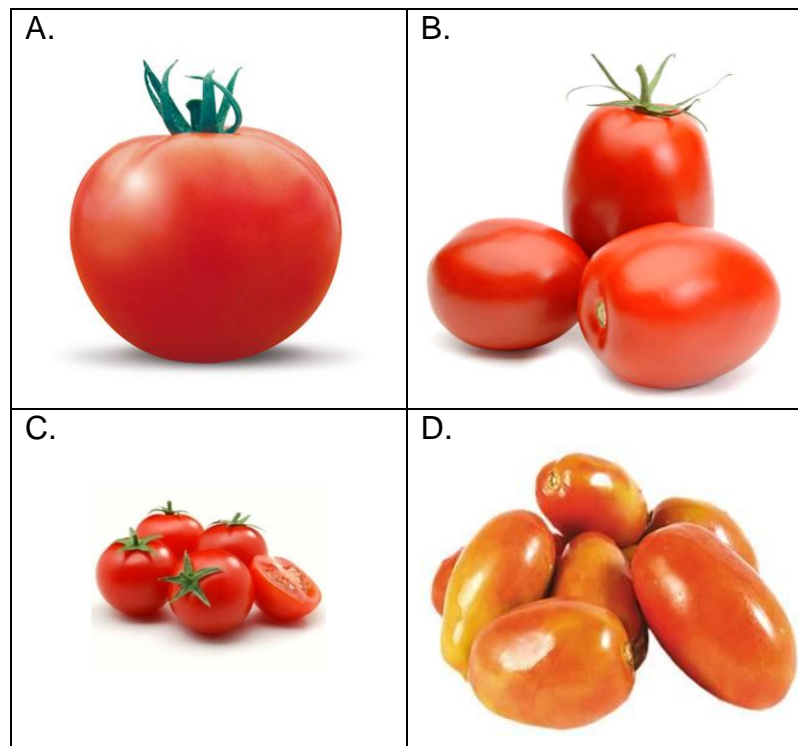
Figura 1. Planta de Tomate



Tomado en Septiembre de 2014 de <http://wikivirya.pbworks.com/w/page/5124980/4%C2%BA%20Las%20Plantas%20y%20los%20Hongos>

A nivel mundial se pueden encontrar tomates con características muy diferentes en cuanto a su tamaño, forma y color. Existen más de 60 cultivares diferentes reportados, entre ellos: Applause, Angela, Corazón de Buey, Montserrat, Pera de Girona, Roma, Valenciano, entre muchos otros. (Cuenca Sánchez, 2013). En Colombia se encuentra comúnmente cuatro cultivares (Figura 2), que corresponden a: *Solanum lycopersicum* 'Milano', 'Chonto', 'Cherry' e 'Industrial'. Los cultivares 'Milano' y 'Chonto' comúnmente tienen modificaciones genéticas (híbridos), por ejemplo: Torrano, Calima, Santa Fe, Santa Clara, entre otras, las cuales les brindan características mejoradas con respecto a su vida media en la fase poscosecha y resistencia a patógenos (Jaramillo Noreña, Rodríguez, Guzmán A, & Zapata, 2006).

Figura 2. Cultivares de Tomate comunes en Colombia.



A. Tomate Milano B. Tomate Chonto C. Tomate Cherry D. Tomate Industrial

Tomado en Septiembre de 2014: A. <http://www.semprecol.com/tomate.html> B. <http://almenu.co/productos/tomate-chonto> C. <http://www.jardineria.pro/plantas/flores-frutos/como-plantar-tomate-cherry-en-tu-jardin/#.VCoUrf15PKU> D. <http://www.agricultura.gob.do/perfiles/los-vegetales/el-tomate-industrial/>

El tomate generalmente se siembra en clima cálido, sin embargo la planta tiene muy buena adaptación en climas templados; por tanto, se puede cultivar en zonas que estén a alturas entre los 100 y 1500 m.s.n.m. En el año cualquier época es adecuada para su producción, pero cabe resaltar que en época de lluvia hay una

mayor incidencia de enfermedades y en sequía son las plagas quienes protagonizan la amenaza más grande (Corpeño, 2004).

Entre sus requerimientos esenciales están: Luz solar, temperatura entre 28- 30° C durante el día y 15 a 18° C durante la noche, humedad relativa de 65 - 70 %, suelos fértiles, profundos y bien drenados. La planta puede desarrollarse en suelos franco-arenosos, arcillo-arenosos y orgánicos con un pH preferentemente entre 5.9-6.5, ya que entre estos valores se logra aprovechar más eficazmente los fertilizantes que se utilicen (Corpeño, 2004).

Económicamente, el tomate se encuentra como una de las hortalizas más cultivadas y con mayor valor. A su vez la demanda ha venido creciendo gracias a la agroindustria, porque el producto además de comercializarse fresco tiene otras formas de consumo como: pulpas, salsas, aderezos, jugos, entre otros (Escalona C et al., 2009). Según cifras de la FAO (Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura), en el año 2012 a nivel mundial el cultivo de tomate abarcó 4,803,680.17 hectáreas cultivadas y 161,793,834.18 toneladas producidas con un rendimiento de 336,812.25 Hg/Ha (FAOSTAT, 2012).

5.2. Marchitez vascular en tomate

Los signos y síntomas de deshidratación en una planta, sin saber su causa, se conocen como Marchitez. En relación al tomate (*Solanum lycopersicum* L), existen varios agentes causales (Tabla 1) que pueden ocasionar este tipo de enfermedad.

Tabla 1. Agentes causales de Marchitez en Tomate

AGENTE CAUSAL	TIPO DE MICROORGANISMO	ENFERMEDAD	REFERENCIA
<i>Fusarium oxysporum</i>	Hongo	Marchitez vascular	(Melgar, Rivera C, Brown, & Weller, 2012).
<i>Sclerotium rolfsii</i>	Hongo	Marchitez sureña	
<i>Phytophthora infestans</i>	Hongo	Mildiu	
<i>Meloidogyne</i> spp.	Nemátodo	Marchitez de Raíces	
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Bacteria	Marchitez bacteriana	

Entre dichos agentes causales y enfermedades, la Marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* es una de las más importantes ya que ocasiona pérdidas hasta de un 60% en el rendimiento y se encuentra reportada en por lo menos 32 países (Ascencio Álvarez et al., 2008).

Comúnmente se caracteriza por amarillamiento de las hojas en la base de la planta y en un solo costado generalmente (Figura 3), posteriormente marchitez generalizada, el xilema se torna de color café oscuro, necrosis del sistema radicular y finalmente colapso total de la planta (Fernández Herrera, Guerrero Ruiz, Rueda Puentes, & Acosta Ramos, 2013).

Esta enfermedad se propaga fácilmente dentro del cultivo por medio del agua, aire y los elementos con los que se manipulan las plantas como herramientas y máquinas (Corpeño, 2004).

Figura 3. Marchitamiento unilateral de la planta de tomate



Tomado en Septiembre de 2014: http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/enfermedades/Fusarium_tomate/Marchitamiento25.jpg

5.2.1. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder & H.N. Hansen, se ubica taxonómicamente en: Reino *Fungi*, división *Deuteromycota*, clase *Sordariomycetes*, orden *Hypocreales*, familia *Tuberculariaceae*, género *Fusarium* y especie *Fusarium oxysporum* (Figura 4) (Pinto, 2012). Su forma especial *lycopersici* recibe esta denominación cuando su hospedero específico es una planta de tomate (*Solanum lycopersicum* L).

Este hongo puede permanecer en el suelo en forma de clamidosporas, resistir varias temperaturas, infectar suelos muy rápidamente, e incluso recolonizar suelos que ya han sido tratados. (Escalona C et al., 2009) Existen reportes de tres razas del hongo, con diferente nivel de virulencia. La raza 1 apareció desde 1886, la raza 2 desde 1945 y la raza 3 en 1978, cada una afecta diferentes variedades de

tomate e incluso se ha encontrado en algunas plantas resistencia a una o más razas del hongo (Ascencio Álvarez et al., 2008).

Es un saprófito facultativo. Puede crecer como parásito en la planta hospedante pero también puede vivir, crecer y multiplicarse sobre tejido muerto de esta. Además tiene la capacidad de moverse, a través de las esporas, hacia el suelo y otras plantas donde se desarrolla como un saprofito estricto. Tiene la capacidad de sobrevivir por muchos años, incluso en ausencia de su hospedero. Es un hongo endofítico que coloniza el sistema vascular, penetrando el tejido vegetal a través de la producción de unas enzimas y toxinas que le permiten abrirse paso y colonizar el xilema, donde se ubica y crece. Una vez se establece bajo las condiciones necesarias, el hongo esporula y se disemina, contaminando plantas y suelos cercanos, donde nuevamente germina y produce micelio (Agrios, 2005).

La infección inicia cuando el hongo penetra por los ápices o heridas laterales de la raíz. En el interior, el hongo se desarrolla intercelularmente hasta colonizar el sistema vascular, posteriormente asciende hacia el tallo y corona de la planta a través de la corriente de savia. Tiene suficientes mecanismos para causar enfermedad, sin embargo en algunas ocasiones se puede encontrar asociado a otros hongos patógenos del suelo (Navarro Velasco, 2013).

Figura 4. *Fusarium oxysporum*



Fusarium oxysporum A. Conidias B. Micelios y Clamidosporas C. Aspecto macroscópico.

Tomado en Septiembre de 2014: A. http://www.doctorfungus.org/imageban/images/init_images/241MIKE.JPG B. http://www.hear.org/pph/images/images/screensized/08_008.jpg C. Fotografía capturada durante la ejecución del proyecto.

5.3. Bacterias promotoras de crecimiento vegetal

En la rizósfera, encontramos un microecosistema, donde habitan infinidad de microorganismos, entre los cuales existe un grupo particular de bacterias conocidas como promotoras de crecimiento vegetal (BPCV). Son microorganismos que se asocian a otros microorganismos y a las plantas. Dichas asociaciones son mutualismos obligados y no obligados que comprenden tres grupos: las bacterias simbióticas formadoras de nódulos, las endofíticas que pueden colonizar estructuras internas de la planta, y las rizobacterias de vida libre asociadas al sistema radicular de la planta. (Criollo et al., 2012)

Las asociaciones microorganismo-planta ofrecen ventajas competitivas a la planta, pues le permiten mayor versatilidad en la captación y asimilación de nutrientes, un incremento de tolerancia al estrés ambiental, resistencia frente a patógenos y básicamente contribuyen al mantenimiento de la salud vegetal de forma directa (Promoción de crecimiento) e indirecta (Biocontrol), lo que resulta en un incremento de la tasa de desarrollo de las plantas y por lo tanto un aumento en el rendimiento de los cultivos. (Rives et al., 2007)

Las BPCV que actúan como agentes de Biocontrol ejercen su efecto a través de diferentes mecanismos (Tabla 2), tales como: Producción de antibióticos (Antibacteriales y Antifúngicos), competición por nutrientes, colonización de sitios específicos donde se establece el patógeno y activación del sistema inmunológico de las plantas (Narayananamy, 2013).

Tabla 2. Biocontrol de hongos fitopatógenos de Tomate.

BACTERIA	MECANISMO DE ACCIÓN	PATÓGENO	REFERENCIA
<i>Burkholderia cepacia</i>	Producción de enzimas líticas, Antibióticos, sideróforos y lipopéptidos.	<i>Sclerotium rolfsii</i>	(De Curtis, Lima, Vitullo, & De Cicco, 2010)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Producción de Antibióticos y sideróforos.	<i>Sclerotium rolfsii</i>	(Rakh, Raut, Dalvi, & Manwar, 2011)
<i>Serratia plymuthica</i>	Producción de Antibióticos	<i>Phytophthora infestans</i>	(Lourenço Júnior, Maffia, Romeiro, & Mizubuti, 2006)
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Producción de Antibióticos	<i>Phytophthora infestans</i>	(Lamsal, Woo Kim, Seok Kim, & Su Lee, 2013)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Producción de Quitinasas	<i>Fusarium oxysporum</i>	(Rojas, González, Rojas, & Heydrich, 2007)

<i>Pseudomona</i> sp.	Resistencia Sistémica Inducida	<i>Fusarium oxysporum</i>	(Van Peer, Niemann, & Schippers, 1991)
<i>Streptomyces</i> sp.	Producción de Quitinasas	<i>Fusarium oxysporum</i>	(Rocha & Moura, 2013)
<i>Bacillus</i> sp.	Producción de Lipasas	<i>Fusarium oxysporum</i>	(Rocha & Moura, 2013)
<i>Pseudomona fluorescens</i>	Producción de Antibióticos	<i>Fusarium oxysporum</i>	(Belgrove, 2007)
<i>Pseudomona putida</i>	Producción de sideroforos	<i>Fusarium oxysporum</i>	(Belgrove, 2007)
<i>Bacillus</i> sp.	Producción de Antibióticos	<i>Fusarium oxysporum</i>	(Belgrove, 2007)

Los agentes de biocontrol expresan características de antibiosis y degradación como: producción de metabolitos antimicrobianos (Floroglucinol, Fenazinas, Pioluterinas, Pirrolnitrinas, Ramnolipidos, entre otros), producción de enzimas (Proteasas, Lipasas, Quitinasas, Celulasas) y producción de biosurfactantes. Con respecto a la competencia que ejercen frente al patógeno por espacio y nutrientes, tienen características de movilidad, producción de sideróforos (Captación de hierro) y colonización (Grandes poblaciones microbianas). También son capaces de activar el sistema inmune de la planta de dos maneras diferentes. La primera es como Sistema de resistencia adquirida (SAR) y el segundo como Sistema de resistencia inducida (IRS), lo cual se logra aplicando a la planta una variedad de agentes bióticos y abióticos (Narayanamy, 2013).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Microorganismos

Un total de 34 BPCV candidatas provenientes de tejido vegetal de cultivos de caña de azúcar y tomate, y 1 Bacteria de referencia como control negativo (*Escherichia coli*) (Tabla 3), fueron evaluadas para la determinación de su capacidad antagónica frente a tres aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (M4N, M3MN y Combia); éstos últimos fueron aislados de plantas de tomate con signos y síntomas de Marchitez Vascular por el Grupo de Análisis en Sistemas de Producción Agropecuarios (ASPA) de la Universidad de Caldas, y seleccionadas de acuerdo a pruebas de patogenicidad en plantas de tomate susceptibles.

Tabla 3. Bacterias evaluadas como antagonistas frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN		
GIBI_000001_AG_B	GIBI_000125_AG_B	GIBI_00146A_AG_B
GIBI_000006_AG_B	GIBI_000126_AG_B	GIBI_00146B_AG_B
GIBI_000007_AG_B	GIBI_000127_AG_B	GIBI_00146C_AG_B
GIBI_000013_AG_B	GIBI_000128_AG_B	GIBI_000147_AG_B
GIBI_000014_AG_B	GIBI_000130_AG_B	GIBI_000148_AG_B
GIBI_000025_AG_B	GIBI_000131_AG_B	GIBI_000149_AG_B
GIBI_000029_AG_B	GIBI_000132_AG_B	GIBI_000151_AG_B
GIBI_000031_AG_B	GIBI_000133_AG_B	GIBI_000152_AG_B
GIBI_00120B_AG_B	GIBI_000137_AG_B	GIBI_000154_AG_B
GIBI_000121_AG_B	GIBI_000139_AG_B	GIBI_000155_AG_B
GIBI_000122_AG_B	GIBI_000140_AG_B	GIBI_000230_RF_B
GIBI_000124_AG_B	GIBI_000145_AG_B	

6.2. Reactivación de microorganismos

Las 35 cepas bacterianas fueron proporcionadas por la Colección de Microorganismos del Instituto de Investigación en Microbiología y Biotecnología Agroindustrial de la Universidad Católica de Manizales en medio líquido crioconservado. Los crioviales fueron sometidos a choque térmico a 37°C durante 5 minutos. Posteriormente las bacterias fueron inculadas en placas con agar PDA (Anexo 1) y mantenidas bajo incubación a 30°C durante 24-72 horas hasta la aparición de colonias.

Los tres aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* fueron igualmente recuperados en PDA mediante la transferencia de una porción de micelio activo e incubados durante 8 días a temperatura ambiente.

6.3. Pruebas de antagonismo

6.3.1. Antagonismo directo: cultivos duales

En medio PDA (Oxoid) se realizaron las pruebas de antagonismo entre las 35 Bacterias mencionadas anteriormente y los tres aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*, por triplicado. Se prepararon inóculos de las bacterias con una concentración aproximada de 10^8 células, desde caldo DYGS (Anexo 2) con 48 horas de incubación a 30°C y 150 RPM. Se prepararon discos de 5mm de diámetro del patógeno aislado en PDA con ayuda de sacabocados estériles.

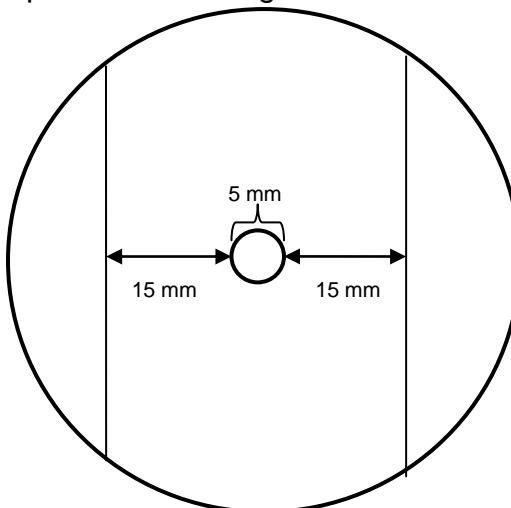
En PDA, se sembró un disco del patógeno en el centro de la caja y posteriormente se hicieron dos estrías del inóculo de Bacterias con 25 µL cada una, a 15mm de cada lado del disco (Figura 5). Los testigos fueron preparados sembrando el patógeno únicamente. Las cajas fueron incubadas por 12 días, a temperatura ambiente.

Por último se tomó la medida del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* (diámetro) y se calculó el índice de inhibición con la formula,

$$I = [(C-T)/C] \times 100$$

donde I es la inhibición (%), C es el diámetro del micelio del testigo y T es el diámetro del micelio del tratamiento. (Zamora Natera et al., 2005)

Figura 5. Plantilla para pruebas de antagonismo directo



6.4. Pruebas funcionales

6.4.1. Pruebas cualitativas de producción de quitinasas

Se preparó medio de quitina con dos fórmulas diferentes para evaluar actividad quitinolítica, donde el sustrato principal fue quitosano grado farmacéutico. Inicialmente se hizo un medio Lurea Bertani, se agarizó y se le agregó 1% de quitosano coloidal (Anexo 3). Posteriormente a esta misma fórmula, se le incorporó purpura de bromocresol como indicador de color para obtener una lectura más eficiente de las reacciones (Anexo 4).

En los dos medios, se inocularon tres puntos de bacteria, cada uno con 20ul del inóculo y se incubaron a 30°C por 96 horas.

6.4.2. Pruebas cualitativas de producción de celulasas

Para evaluar la actividad celulolítica de las Bacterias, se utilizaron dos formulaciones, CMC N° 1 (Anexo 5) y CMC N° 2 (Anexo 6). Los medios se inocularon y se incubaron bajo las mismas características mencionadas para las pruebas de actividad quitinolítica.

6.4.3. Pruebas cualitativas de producción de proteasas

La actividad proteolítica de este grupo de bacterias se hizo en medio Skim Milk y Caseinato. Ambos medios se inocularon y se incubaron bajo las mismas características mencionadas en las pruebas anteriores.

6.5. Análisis estadístico

Todas las variables fueron analizadas a través de análisis de varianza (Anexo 7) y pruebas de comparación de medias tipo Tukey (Anexo 8) a través del programa R usando el paquete agricolae (De Mendiburu, 2014).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un total de 34 Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (BPCV) y *Escherichia coli* (ATCC 10536), como control negativo, fueron evaluadas *In vitro* a través de cultivos duales para medir su capacidad antagónica frente a tres aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. A través de los análisis estadísticos, se pudo inferir diferencias significativas entre las bacterias, los patógenos y la interacción entre ellos. De este grupo, se diferenciaron 15 bacterias las cuales fueron clasificadas en cuatro grupos: Superiores $\geq 70\%$, Buenas 59 - 69%, Deficiente 10 -20% y Nulas $< 10\%$, según su porcentaje de inhibición micelial sobre el patógeno (Tabla 4).

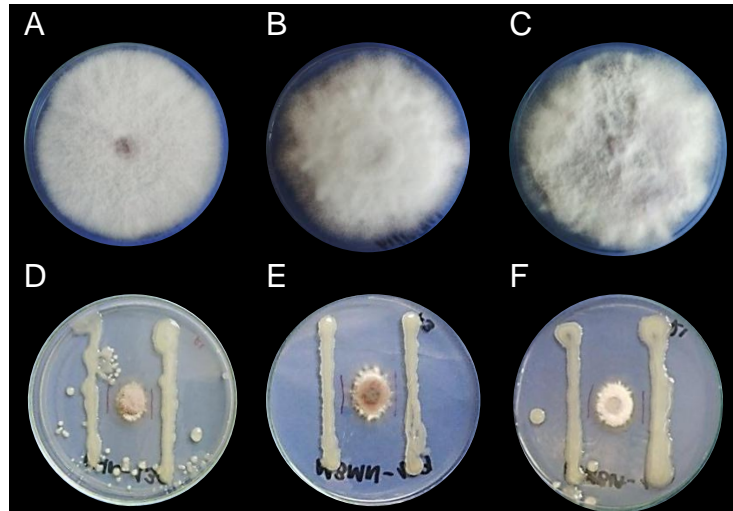
Tabla 4. Clasificación de Bacterias según su desempeño.

CÓDIGO	IDENTIFICACIÓN	MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN	% DE INHIBICIÓN	CLASIFICACIÓN
GIBI_000139_AG_B	<i>Pseudomonas luteola</i>	API 20NE, 85.7% de identidad	77.56	Superior
GIBI_000137_AG_B	<i>Serratia marcescens</i>	Identificación Molecular, 16S 99% de identidad	75.78	Superior
GIBI_00120B_AG_B	<i>Burkholderia cepacia</i>	API 20NE, 99.9% de identidad	73.11	Superior
GIBI_000014_AG_B	<i>Pasteurella multocida</i>	API 20NE, 90.5% de identidad	67.14	Buena
GIBI_000013_AG_B	<i>Burkholderia tropica</i>	Identificación Molecular, 16S 99% de identidad	65.11	Buena
GIBI_000126_AG_B	<i>Serratia marcescens</i>	Identificación Molecular, 16S 98% de identidad	63.75	Buena
GIBI_000025_AG_B	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Identificación Molecular, 16S 99% de identidad	60.56	Buena
GIBI_000029_AG_B	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Identificación Molecular, 16S 99% de identidad	60.5	Buena
GIBI_000145_AG_B	<i>Klebsiella</i> sp.	API 20E, 33.9% de identidad	60.33	Buena
GIBI_000031_AG_B	<i>Serratia marcescens</i>	Identificación Molecular, 16S 98% de identidad	59.29	Buena
GIBI_000127_AG_B	<i>Serratia marcescens</i>	Identificación Molecular, 16S 99% de identidad	18.57	Deficiente
GIBI_00146A_AG_B	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	API 20NE, 99.9% de identidad	13.33	Deficiente
GIBI_000230_RF_B	<i>Escherichia coli</i>	Cepa ATCC	10.56	Deficiente
GIBI_00146C_AG_B	<i>Pseudomonas luteola</i>	API 20NE, 95.5% de identidad	3.125	Nulas

GIBI_00146B_AG_B	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	API 20NE, 99.9% de identidad	0	Nulas
------------------	-------------------------------------	------------------------------	---	-------

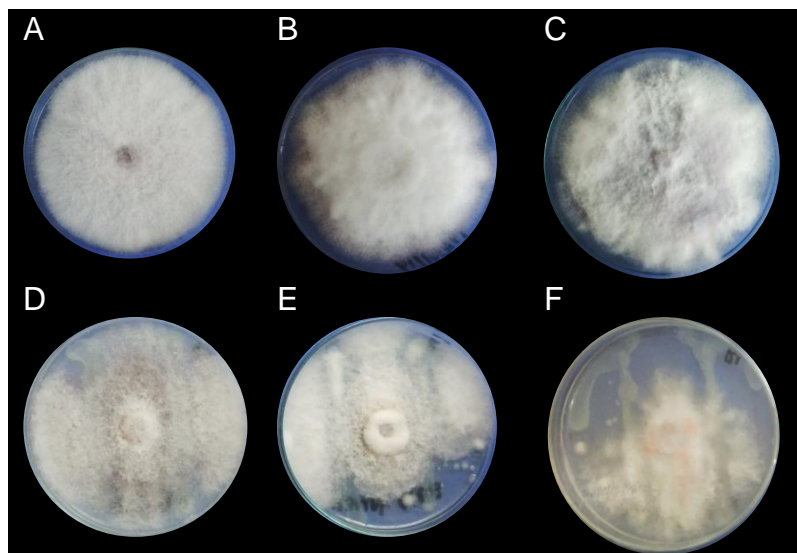
*La identificación de la cepa GIBI_000145_AG_B con API 20E arrojó un porcentaje de identidad bajo (33.9%) por tanto se tuvo en cuenta el género únicamente, para poder relacionarlo de alguna manera con los demás géneros identificados con mayor porcentaje de identidad.

Figura 6. Cepa con el mayor porcentaje de inhibición micelial (GIBI_000139_AG_B)



*A. Testigo M4N B. Testigo M3MN C. Testigo Combia D. GIBI_000139_AG_B vs M4N E. GIBI_000139_AG_B vs M3MN F. GIBI_000139_AG_B vs Combia.

Figura 7. Cepa con porcentaje nulo de inhibición micelial (GIBI_00146B_AG_B)



*A. Testigo M4N B. Testigo M3MN C. Testigo Combia D. GIBI_00146B_AG_B vs M4N E. GIBI_00146B_AG_B vs M3MN F. GIBI_00146B_AG_B vs Combia.

Existen referencias bibliográficas de los últimos cinco años que contienen una gran variedad de datos, donde los autores exponen el porcentaje de inhibición micelial máximo obtenido en sus ensayos de antagonismo entre bacterias y diferentes formas especiales de *Fusarium oxysporum* (Tabla 5). Se pudo evidenciar que en algunos casos el mejor desempeño *in vitro* alcanza un 18% de inhibición micelial del patógeno, mientras que en otros casos hubo 100% de inhibición. Las bacterias evaluadas en las diferentes investigaciones referenciadas, provienen en su mayoría de la rizósfera de la planta de interés y en algunos casos la procedencia fue de la rizósfera de otras plantas, de procesos biotecnológicos, por ejemplo, compostaje y otras indeterminadas que están en diferentes colecciones de microorganismos.

La proveniencia de las bacterias no siempre incide directamente sobre su capacidad antagónica. En esta investigación las bacterias catalogadas como superiores y buenas provenían 50% de caña y el otro 50% de tomate. Bibliográficamente, se encontraron antagonismos frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, de los géneros *Streptomyces* sp. y *Bacillus* sp. con porcentajes de inhibición de 18% aproximadamente (Rocha & Moura, 2013), de *Bacillus subtilis* con 46.04% (Ramyabharathi & Raguchander, 2014), de *Bacillus* sp con 50% y de *Pseudomonas* sp con 70% (Nandhini, Sendhilvel, & Babu, 2012). Todas estas bacterias provenían de rizósfera de tomate, excepto el *Streptomyces* sp que fue aislado de rizósfera de árboles de naranja. Se puede notar que existe gran variedad en la capacidad antagónica de los diferentes géneros de bacterias, aun cuando el patógeno es el mismo y provienen en su mayoría de la misma planta, que a su vez es la planta de interés.

En contraste, los géneros *Pseudomonas* sp, *Bacillus* sp, *Streptomyces* sp y *Burkholderia* sp que están reportados con un 100% de inhibición micelial sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (Registeri, Taghavi, & Banihashemi, 2012), no solo provienen de rizósfera de melón, la cual es su planta de interés, sino que los aislamientos los hicieron de plantas sanas y enfermas. Teniendo en cuenta que en este caso los autores tuvieron presentes las plantas enfermas específicamente, surge la idea que posiblemente la inhibición total obtenida tenga alguna relación con la interacción que se pudo presentar entre bacterias y patógeno en la rizósfera de la cual provienen. En este caso, sería indicado diferenciar las bacterias aisladas de plantas sanas, de las que fueron aisladas de plantas enfermas, para poder evaluar los mecanismos de acción antagónica de cada grupo y de esta manera determinar si el contacto previo con el patógeno, que podría activar algún mecanismo en las bacterias que las haga mejores antagonistas.

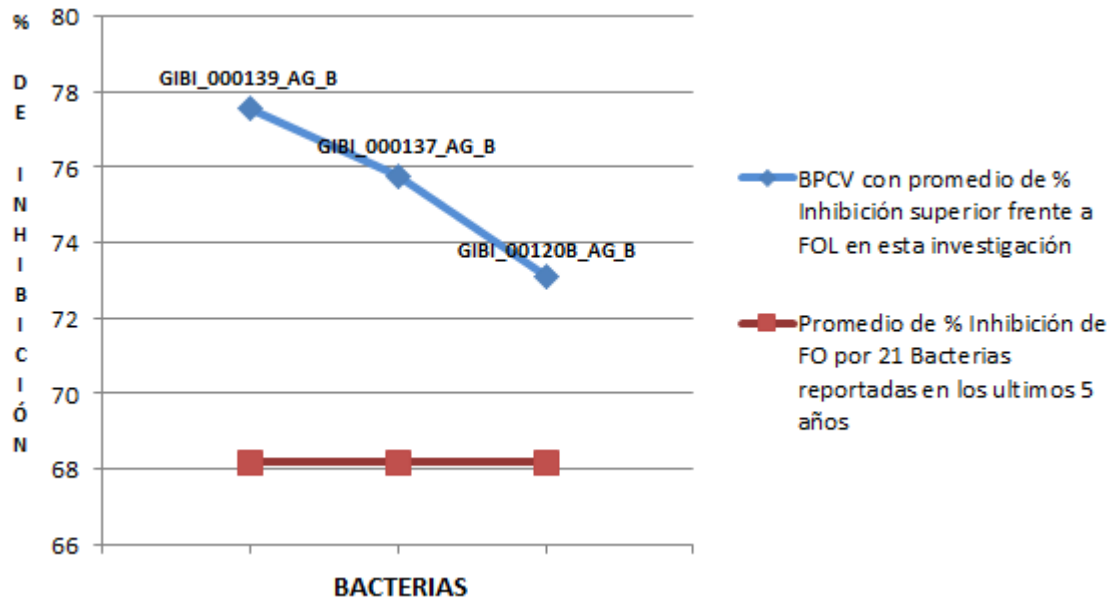
A partir de la información contenida en la tabla 5 se calculó el promedio de inhibición micelial (68.18%), teniendo en cuenta todos los datos porque representan la inhibición micelial máxima reportada en los últimos cinco años y tienen diferentes características de bacterias y patógenos. Con respecto a los porcentajes de inhibición obtenidos a través de esta investigación podemos

resaltar que las bacterias GIBI_000139_AG_B, GIBI_000137_AG_B y GIBI_00120B_AG_B (Superiores) tuvieron un porcentaje de inhibición mayor que el calculado (Figura 8), por lo cual se podrían tener en cuenta para una evaluación *In vivo*, realizando posteriormente ensayos en semillero .

Tabla 5. Reporte de bacterias antagonistas de *Fusarium oxysporum* en los últimos cinco años

ANTAGONISTA	PATÓGENO	% DE INHIBICIÓN	REFERENCIA
<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	18.13	(Rocha & Moura, 2013)
<i>Bacillus</i> sp.		17.49	
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	66.33	(Saidi et al., 2009)
<i>Bacillus sphaericus</i>		66.33	
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	90	(Karkachi, Gharbi, Kihal, & Henni, 2010)
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	41.33	(Al-Azawi, Nawar, & Abdulla, 2012)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		35.56	
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	70	(Nandhini et al., 2012)
<i>Bacillus</i> sp		50	
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	46.04	(Ramyabharathi & Raguchander, 2014)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	100	(Registeri et al., 2012)
<i>Streptomyces</i> sp		100	
<i>Bacillus</i> sp		100	
<i>Burkholderia</i> sp		100	
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>	83	(Dihazi et al., 2012)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>		75	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	82.5	(Yasmin, Hafeez, & Rasul, 2014)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		75.7	
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	64.90	(Ju et al., 2014)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vanillae</i>	76.80	(Gangadara Naik, Saifulla Nagaraja, & Basavaraja, 2010)
<i>Bacillus subtilis</i>		72.70	
Promedio de % Inhibición		68.18	

Figura 8. Comparación de los porcentajes de Inhibición superior obtenidos frente al promedio reportado en los últimos 5 años.



Por su parte, la cepa GIBI_00146B_AG_B, además de presentar un porcentaje de inhibición del 0%, tuvo otra característica particular con respecto a la interacción con *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* (M3MN, M4N y Combia). Se observó a los 6 días de incubación de la prueba de antagonismo directo, que los aislamientos del hongo tenían un desarrollo micelial mayor que los observados en el control negativo con *Escherichia coli* y los testigos (Tabla 6). Dicha cepa tiene características que favorecen el crecimiento del hongo, en vez de ejercer el efecto antagónico esperado para actuar en calidad de biocontrolador.

Tabla 6. Promedio del crecimiento micelial en mm a los 6 días de incubación.

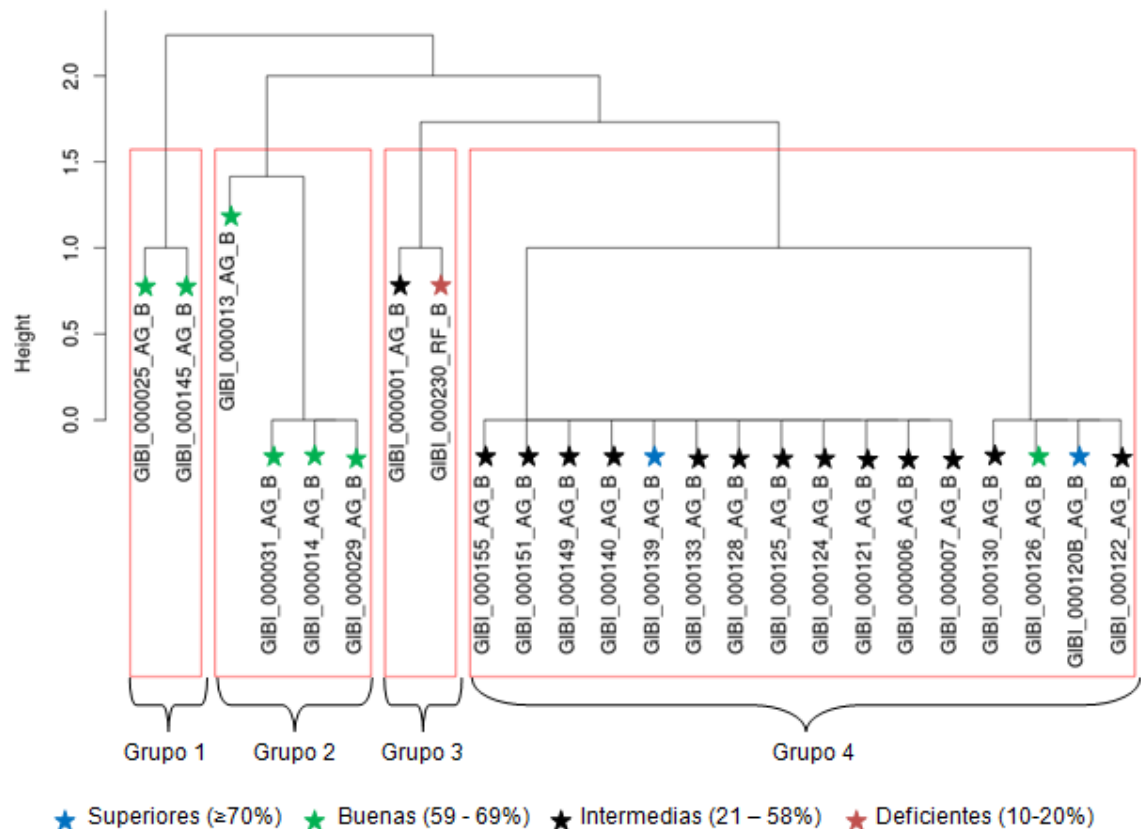
BACTERIAS	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>lycopersici</i>		
	M3MN	M4N	Combia
GIBI_00146B_AG_B	64	64	68
GIBI_000230_RF_B	45	43	43
TESTIGO*	55	57	61

*El testigo es cada uno de los aislamientos del hongo sin BPCV.

Las pruebas funcionales se eligieron a raíz de la importancia que representa la pared celular en los hongos. Esta estructura interviene directamente con su morfología y en funciones importantes para el desarrollo del mismo. Está compuesta principalmente por polisacáridos (Quitina, Glucano y Manano) y proteínas (Glicoproteínas) que le confieren rigidez. La ausencia de esta estructura puede implicar la lisis de la célula fúngica (Pontón, 2008). Se hicieron ensayos de

actividad enzimática que permitieran evaluar posibles mecanismos de acción de las BPCV frente a la pared celular de *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici*. Las pruebas para Quitinasas, Proteasas y Celulasas fueron cualitativas y se compararon gráficamente a través de un dendrograma (Figura 9) que permitió agrupar las bacterias en base a su actividad enzimática.

Figura 9. Dendrograma de pruebas enzimáticas a BPCV.



En este caso donde la información únicamente es presencia o ausencia de actividad enzimática, no se pudo agrupar las bacterias de tal manera que se pudiera relacionar directamente la actividad enzimática con el efecto antagonista sobre *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici*, puesto que en el dendrograma no se refleja una diferencia significativa entre las bacterias con desempeño superior o bueno con las bacterias deficientes o nulas, ni tampoco con aquellas que no tuvieron una clasificación, porque presentaron porcentajes de inhibición entre 21-58% (Intermedias). Por ejemplo, en el grupo 4 están reunidas todas las bacterias con porcentaje de inhibición intermedio, 2 de las superiores (GIBI_000139_AG_B y GIBI_000120B_AG_B) y GIBI_000126_AG_B catalogada como buena; en el grupo 3 esta GIBI_000001_AG_B que presentó un porcentaje de inhibición micelial intermedio de 31.37% y la cepa de referencia GIBI_000230_RF_B que tuvo un desempeño deficiente con un 10.56% y en los grupos 1 y 2 están reunidas algunas bacterias clasificadas como buenas.

Se analizó el dendrograma respecto a los géneros de las bacterias y no se evidenció alguna relación evidente entre ellos. En el grupo 3 hay *Pantoea* sp. (GIBI_000001_AG_B) y *Escherichia coli* (GIBI_000230_RF_B), en el grupo 2 se reúnen *Pasteurella* sp. (GIBI_000014_AG_B), *Burkholderia* sp. (GIBI_000013_AG_B), *Gluconacetobacter* sp. (GIBI_000029_AG_B) y *Serratia* sp. (GIBI_000031_AG_B), en el grupo 1 se encuentran *Gluconacetobacter* sp. (GIBI_000025_AG_B) y *Klebsiella* sp. (GIBI_000145_AG_B) y en el grupo 4 *Pseudomonas* sp. (GIBI_000139_AG_B), *Burkholderia* sp. (GIBI_00120B_AG_B), *Serratia* sp. (GIBI_000126_AG_B, GIBI_000151_AG_B, GIBI_000149_AG_B, GIBI_000140_AG_B, GIBI_000133_AG_B, GIBI_000128_AG_B, GIBI_000125_AG_B, GIBI_000124_AG_B, GIBI_000121_AG_B, GIBI_000130_AG_B y GIBI_000122_AG_B), *Luteibacter* sp. (GIBI_000155_AG_B) y *Stenotrophomonas* sp. (GIBI_000006_AG_B y (GIBI_000007_AG_B).

Posteriormente se hizo una comparación entre las cepas clasificadas como superiores y buenas (Tabla 7). La cepa GIBI_000137_AG_B no presentó crecimiento, por tanto no fue posible hacer la evaluación de actividad enzimática. Las nueve cepas restantes con porcentaje de inhibición superior y bueno, presentaron en su totalidad actividad quitinolítica en el medio Quitosano N° 1 con un pH entre 6.0 – 6.5, excepto GIBI_000139_AG_B. Sin embargo en el medio Quitosano N° 2 con pH de 5.0, solamente presentaron actividad cinco de estas bacterias. Posiblemente el nivel de acidez del medio Quitosano N° 2 no es adecuado para evaluar este tipo de microorganismos. Únicamente cinco de esas nueve cepas fueron positivas para proteasas. Entre estas GIBI_000139_AG_B y GIBI_00120B_AG_B que tienen inhibición superior. Y solamente dos cepas buenas (GIBI_000013_AG_B y GIBI_000025_AG_B) tuvieron actividad celulolítica.

Tabla 7. Pruebas funcionales a bacterias Superiores y Buenas.

BACTERIA	QUITOSANO N° 1	QUITOSANO N° 2	SKIM MILK	CASEINATO	CMC1	CMC2
GIBI_000139_AG_B*	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
GIBI_000137_AG_B*	No se pudo realizar pruebas funcionales. La cepa no presentó crecimiento.					
GIBI_00120B_AG_B*	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
GIBI_000014_AG_B**	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
GIBI_000013_AG_B**	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
GIBI_000126_AG_B**	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
GIBI_000025_AG_B**	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
GIBI_000029_AG_B**	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
GIBI_000145_AG_B**	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
GIBI_000031_AG_B**	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

*BPCV Superiores

**BPCV Buenas

Teniendo en cuenta las observaciones anteriores no se puede afirmar que el mecanismo utilizado por estas diez BPCV para inhibir al patógeno es la producción de enzimas que participan directamente en la degradación de la pared del hongo. Sin embargo no es adecuado descartar dicha hipótesis porque al comparar estas bacterias, pudimos evidenciar que la mayoría de ellas (superiores y buenas) tienen actividad quitinolítica y la mitad tuvo actividad proteolítica. Basados en que dichas enzimas están asociadas a la degradación de la pared celular de los hongos, es posible relacionar este tipo de actividad como uno de los mecanismos que utilizan las bacterias para ejercer su antagonismo frente al hongo patógeno.

Asimismo, se evidenció que los géneros de las bacterias antagonistas superiores y buenas, tienen un grado de cercanía en su clasificación taxonómica entre ellas y en comparación a los géneros con mayor desempeño reportados en la tabla 5, frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* específicamente. Todos estos géneros se clasifican como Proteobacterias, y a su vez se agrupan en: Gammaproteobacterias (*Pseudomonas* sp, *Serratia* sp, *Pasteurella* sp y *Klebsiella* sp) Betaproteobacterias (*Burkholderia* sp) y Alphaproteobacterias (*Gluconacetobacter* sp).

Como pauta final, reconocemos la importancia de implementar otros métodos para identificar los mecanismos que utilizan las BPCV para ejercer antagonismo frente a hongos patógenos, con el fin de hacer un análisis más profundo y poder determinar con certeza cuáles son dichos mecanismos en las bacterias evaluadas. Entre las técnicas o métodos que se pueden utilizar, se encuentra la posibilidad de evaluar *in vitro*, la capacidad de producir antibióticos. Los metabolitos secundarios producidos por las bacterias se purifican e identifican químicamente, a través de HPLC, y también a través de técnicas moleculares que permitan identificar los genes relacionados con la expresión de compuestos antibióticos (Narayanasamy, 2013).

Otra estrategia es evaluar la capacidad que tienen las BPCV para competir por espacio y nutrientes. El hierro por ejemplo, es un micronutriente esencial para el desarrollo de todos los microorganismos. En algunos suelos la cantidad de hierro es muy limitada y generalmente se encuentra en forma insoluble (férrica) la cual no es disponible para los microorganismos. Las bacterias capaces de producir sideróforos, tienen la habilidad de “secuestrar” este micronutriente del medio. Esta característica le da ventajas competitivas sobre otros microorganismos para poder colonizar tejido vegetal y desarrollarse. De esta manera es capaz de desalojar a los patógenos de ese microambiente (Narayanasamy, 2013). El método más común para evaluar la producción de sideróforos es con el medio Cromo Azurol S (CAS) (Schwyn & Neilands, 1997). Se fundamenta en una competencia por el hierro entre un complejo férrico (indicador de color), el CAS y el sideróforo producido por el microorganismo. Cuando el hierro es removido del medio se

genera una reacción positiva, evidenciada por un cambio de color que usualmente es de azul a naranja (Milagres, Machuca, & Napoleão, 1999).

Por último podrían ser medidas por pruebas semicuantitativas, moléculas tensoactivas que son sintetizadas por los microorganismos cuando la fuente de carbono es poco soluble o insoluble, utilizadas para llevar a cabo la degradación de sustratos insolubles. Dichas moléculas se denominan biosurfactantes y pueden actuar en calidad de agentes antimicrobianos. (Yañez Ocampo & Wong Villarreal, 2013). Es posible medir la actividad antifúngica de los biosurfactantes a diferentes concentraciones sobre agar PDA, partiendo de una siembra masiva del hongo. Posteriormente se hacen pozos en el medio donde se deposita el biosurfactante y se interpreta como positiva cuando se halos translucidos alrededor de los pozos. Hay reportes de biosurfactantes con actividad antimicrobiana sobre *Fusarium oxysporum* por daño en la superficie de la célula (Nalini & Parthasarathi, 2014).

Durante el desarrollo de este trabajo únicamente se pudo evaluar actividad enzimática. Con la información obtenida de esos ensayos, no se puede inferir con certeza cuál fue el mecanismo utilizado por las BPCV evaluadas, para expresar antagonismo frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Existe una idea tentativa de que el antagonismo ejercido por las diez bacterias que fueron clasificadas como superiores y buenas posiblemente este relacionado con la producción de quitinasas y proteasas, como uno de los posibles mecanismos, porque se encontró actividad enzimática en el 80% de los aislamientos para quitinasas y el 50 % para proteasas (Control negativo no presentó actividad para quitinasas). Para poder reconocer todos los mecanismos de acción de las bacterias evaluadas, es importante hacer uso de las otras metodologías mencionadas anteriormente que podrían complementar la evaluación antagónica *in vitro*, incluyendo pruebas de campo que evalúen otras variables como la respuesta de la planta de tomate en interacción con el patógeno y el biocontrolador al mismo tiempo.

8. CONCLUSIONES

Basados en los resultados obtenidos se observó que 15 bacterias se diferenciaron por su actividad de inhibición micelial, clasificándose en 4 grupos como: superiores, buenas, deficientes y nulas. Al compararse los porcentajes de inhibición micelial de las bacterias superiores con un promedio de inhibición sobre *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* obtenido de reportes literarios de los últimos cinco años, se destacó su actividad antagónica sobre dicho patógeno, al presentar actividad antagónica por encima del promedio mencionado.

A través del dendrograma donde fueron agrupadas las bacterias en base a la actividad enzimática, no fue posible relacionar directamente dicha actividad con el efecto antagónico observado sobre el patógeno. Por su parte, las 10 bacterias catalogadas como superiores y buenas fueron comparadas y se encontró una alta relación entre ellas con respecto a su actividad quitinolítica (8/10) y un 50% de actividad proteolítica (5/10), además se encontró una cercanía taxonómica en los géneros que hacen parte de estas 10 BPCV.

Para poder inferir todos los mecanismos de acción utilizados por estas bacterias para enfrentar al patógeno, es necesario recurrir a metodologías complementarias que permitan medir la capacidad de producir antibióticos, biosurfactantes y la habilidad de competir por nichos y nutrientes. Además, se debe complementar el análisis realizando ensayos tipo semillero, donde se midan otro tipo de variables *In vivo*.

9. RECOMENDACIONES

- ✓ Aislar bacterias de rizósfera de plantas de tomate que presenten signos y síntomas de la enfermedad, para medir su capacidad antagónica.
- ✓ Hacer pruebas complementarias que midan otro tipo de mecanismo de acción de las bacterias antagonistas.
- ✓ Realizar ensayos *In vivo*, tipo semillero.
- ✓ Buscar alternativas al medio Quitosano N° 2 para bacterias que no soporten pH bajo, para evitar falsos negativos.
- ✓ Utilizar caseinato preferiblemente para realizar las pruebas de actividad proteolítica.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. N. (2005). *PLANT PATHOLOGY* (Fifth ed.). Florida: ELSEVIER.
- Al-Azawi, A. Q., Nawar, H. H., & Abdulla, M. I. (2012). *Biocontrol of Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici by plant growth promoting bacteria on Tomato plant*. Paper presented at the Second Scientific Conference the Collage of Agriculture
- Ascencio Álvarez, A., López Benítez, A., Borrego Escalante, F., Rodríguez Herrera, S. A., Flores Olivas, A., Jiménez Díaz, F., & Gámez Vázquez, A. J. (2008). Marchitez vascular del tomate: I. Presencia de razas de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 26(2), 114-120.
- Belgrove, A. (2007). *Biological control of Fusarium oxysporum f. sp. cubense using non-pathogenic F. oxysporum endophytes*. (Magister Scientiae), University of Pretoria, Gauteng, Sudáfrica.
- Corpeño, B. (2004). Manual Del Cultivo De Tomate. In D. Y. E. D. A. CENTRO DE INVERSION (Ed.), (pp. 1-31). El Salvador.
- Criollo, P. J., Obando, M., Sánchez M, L., & Bonilla, R. (2012). Efecto de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) asociadas a *Pennisetum clandestinum* en el altiplano cundiboyacence. *Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 13(2), 189-195.
- Cuenca Sánchez, T. (2013). El tomate y sus variedades. *Agricultura y Jardinería*.
- DANE. (2010). OFERTA AGROPECUARIA Cifras 2010. In E. N. A. 2010 (Ed.), (pp. 39-57). Colombia: DANE.
- De Curtis, F., Lima, G., Vitullo, D., & De Cicco, V. (2010). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* on tomato by delivering antagonistic bacteria through a drip irrigation system. *Crop Protection*, 29, 663-670.
- De Mendiburu, F. (Producer). (2014, Septiembre de 2014). Statistical Procedures for Agricultural Research. Retrieved from <http://tarwi.lamolina.edu.pe/~fmendiburu>
- Dihazi, A., Jaiti, F., WafaTaktak, kilani-Feki, O., Jaoua, S., Driouich, A., . . . Serghini, M. A. (2012). Use of two bacteria for biological control of bayoud disease caused by *Fusarium oxysporum* in date palm (*Phoenix dactylifera* L) seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 55(0), 7-15. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.03.003>
- Escalona C, V., Alvarado V, P., Monardes, H., Urbina Z, C., & Martin B, A. (2009). MANUAL DE CULTIVO DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill.). In U. d. Chile (Ed.), (pp. 1-60). Chile.
- FAOSTAT. (2012). Producción de Cultivos. Retrieved Marzo, 2014, from <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/S>
- Fernández Herrera, E., Guerrero Ruiz, J. C., Rueda Puente, E. O., & Acosta Ramos, M. (2013). Patógenos y síntomas asociados a la marchitez del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Texcoco México. *Biotecnia*, XV(3), 46-50.

- Gangadara Naik, B., Saifulla Nagaraja, R., & Basavaraja, M. K. (2010). Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*, the causal agent of stem rot of vanilla *in vitro*. *International Journal of Science and Nature*, 1(2), 259-261.
- Greuter, W., & Rankin Rodríguez, R. (2012). *Código Internacional de Nomenclatura para algas, hongos y plantas: código de Melbourne CSIC* (Ed.) (pp. 213). Retrieved from <http://site.ebrary.com/lib/biblioucmansp/docDetail.action?docID=10680154>
- ITIS. (2014, Miércoles, 05/Marzo/2014). *Solanum lycopersicum* L. Taxonomic Hierarchy. Retrieved Marzo, 2014, from http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=521671
- Jaramillo N, J. E., Rodríguez, V. P., Guzman A, M., Zapata, M., & Rengifo M, T. (2007). *Manual Técnico: Buenas Prácticas Agrícolas en la Producción de Tomate Bajo Condiciones Protegidas*. Antioquia, Colombia.
- Jaramillo Noreña, J., Rodríguez, V. P., Guzmán A, M., & Zapata, M. A. (2006). *EL CULTIVO DE TOMATE BAJO INVERNADERO (Lycopersicon esculentum. Mill)*. Rionegro, Colombia.
- Ju, R., Zhao, Y., Li, J., Jiang, H., Liu, P., Yang, T., . . . Liu, X. (2014). Identification and evaluation of a potential biocontrol agent, *Bacillus subtilis*, against *Fusarium* sp. in apple seedlings. *Annals of Microbiology*, 64(1), 377-383. doi: 10.1007/s13213-013-0672-3
- Karkachi, N. E., Gharbi, S., Kihal, M., & Henni, J. E. (2010). Biological Control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* Isolated from Algerian Tomato by *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens* and *Trichoderma harzianum*. *Research Journal of Agronomy*, 4(2), 31-34.
- Lamsal, K., Woo Kim, S., Seok Kim, Y., & Su Lee, Y. (2013). Biocontrol of Late Blight and Plant Growth Promotion in Tomato Using Rhizobacterial Isolates. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(7), 885-892.
- Lourenço Júnior, V., Maffia, L. A., Romeiro, R. d. S., & Mizubuti, E. S. G. (2006). Biocontrol of tomato late blight with the combination of epiphytic antagonists and rhizobacteria. *Biological Control*, 38(3), 331-340. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2006.04.005>
- Melgar, J. C., Rivera C, J. M., Brown, J., & Weller, S. (2012). Marchitez Bacteriana en solanáceas: Su reconocimiento y manejo integrado. *Fundación Hondureña de Investigación Agrícola*, 1-19.
- Milagres, A. M. F., Machuca, A., & Napoleão, D. (1999). Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *Journal of Microbiological Methods*, 37(1), 1-6. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012\(99\)00028-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012(99)00028-7)
- Nalini, S., & Parthasarathi, R. (2014). Production and characterization of rhamnolipids produced by *Serratia rubidaea* SNAU02 under solid-state fermentation and its application as biocontrol agent. *Bioresource Technology*, 173(0), 231-238. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.051>

- Nandhini, S., Sendhilvel, V., & Babu, S. (2012). Endophytic bacteria from tomato and their efficacy against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, the wilt pathogen. *Journal of Biopesticides*, 5(2), 178-185.
- Narayanasamy, P. (2013). Mechanisms of action of bacterial biological control agents *Biological Management of Diseases of Crops* (Vol. 1, pp. 295-429): Springer.
- Navarro Velasco, G. Y. (2013). *Identificación de nuevos componentes de la ruta TOR de Fusarium oxysporum y determinación de su papel en la patogénesis*. (Doctora en Biología), Universidad de Córdoba, Córdoba.
- Ongley, E. D. (1997). Efectos de la agricultura en la calidad del agua *Lucha Contra la Contaminación Agrícola de los Recursos Hídricos*. Burlington, Canadá: FAO.
- Peralta, I. E., Knapp, S., & Spooner, D. M. (2006). Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. *Tomato Genetics Cooperative Report*, 56, 6-12.
- Pinto, E. A. (2012, Octubre 30 de 2012). Marchitez Vascular en Tomate. Retrieved Marzo, 2014, from http://edgarpinto2100108fitopatologiaii.blogspot.com/2012/10/marchitez-vascular-en-tomate_30.html
- Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25, 78-82.
- Rakh, R. R., Raut, L. S., Dalvi, S. M., & Manwar, A. V. (2011). BIOLOGICAL CONTROL OF *Sclerotium rolfsii*, CAUSING STEM ROT OF GROUNDNUT BY *Pseudomonas* cf. *monteilii* 9. *Recent Research in Science and Technology*, 3(3), 26-34.
- Ramyabharathi, S. A., & Raguchander, T. (2014). MODE OF ACTION OF BACILLUS SUBTILIS EPCO16 AGAINST TOMATO FUSARIUM WILT. *Biochemical and Cellular Archives*, 14(1), 47-50.
- Registeri, R., Taghavi, S. M., & Banihashemi, Z. (2012). Effect of Root Colonizing Bacteria on Plant Growth and *Fusarium* Wilt in *Cucumis melo*. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 14, 1121-1131.
- Rives, N., Acebo, Y., & Hernández, A. (2007). BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN EL CULTIVO DEL ARROZ (*Oryza sativa* L.). PERSPECTIVAS DE SU USO EN CUBA. *Cultivos Tropicales*, 28(2), 29-38.
- Rocha, D., & Moura, A. (2013). Controle biológico da murcha do tomateiro causada por *Ralstonia solanacearum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por rizobactérias. *Tropical Plant Pathology*, 38(5), 423-430.
- Rojas, M. M., González, O., Rojas, N., & Heydrich, M. (2007). INTERACCIONES ENTRE *Gluconacetobacter diazotrophicus* Y LA COMUNIDAD BACTERIANA ENDÓFITA DE LA CAÑA DE AZÚCAR. *Cultivos Tropicales*, 28(3), 11-16.
- Saccardo, P. A. (1886). Sylloge Hyphomycetum. In Patavii (Ed.), *Sylloge fungorum omnium hucusque cognitorum* (Vol. 4, pp. 1-807).
- Saidi, N., Kouki, S., M'Hiri, F., Hajlaoui, M., Mahrouk, M., Ouzari, H., . . . Hassen, A. (2009). Characterization and selection of *Bacillus* sp. strains, effective biocontrol agents against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, the

- causal agent of Fusarium crown and root rot in tomato. *Annals of Microbiology*, 59(2), 191-198. doi: 10.1007/BF03178317
- Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1997). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160, 46-56.
- Snyder, W. C., & Hansen, H. N. (1940). The Species Concept in Fusarium. *American Journal of Botany*, 27(2), 64-67.
- Tamayo M, P. J., & Jaramillo N, J. E. (2006). *Enfermedades del Tomate, Pimentón, Ají y Berenjena en Colombia Guía para su Diagnóstico y Manejo*. Antioquia, Colombia.
- Torres, D., & Capote, T. (2004). Agroquímicos un problema ambiental global: uso del análisis químico como herramienta para el monitoreo ambiental *Ecosistemas*, 13(3), 2-6.
- Van Peer, R., Niemann, G. J., & Schippers, B. (1991). Induced Resistance and Phytoalexin Accumulation in Biological Control of *Fusarium* Wilt of Carnation by *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r. *Phytopathology*, 81(7), 728-734.
- Villa, P. M., Frías, A., & González, G. (2005). Evaluación de cepas de *Pseudomonas* sp para el control de hongos fitopatógenos que afectan cultivos de interés económico. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, XXXIX(3), 40-44.
- Yañez Ocampo, G., & Wong Villarreal, A. (2013). Biosurfactantes Microbianos, Producción Potencial con Residuos Agroindustriales de Chiapas. *BioTecnología*, 17(3), 12-28.
- Yasmin, S., Hafeez, F. Y., & Rasul, G. (2014). Evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* Z5 for biocontrol of cotton seedling disease caused by *Fusarium oxysporum*. *Biocontrol Science & Technology*, 24(11), 1227.
- Zamora Natera, J. F., Bernal Alcocer, A., Ruiz López, M., Soto Hernández, M., Escalante Estrada, A., & Vibrans Lindemann, H. (2005). Perfil de Alcaloides de Semillas de *Lupinus exaltatus* Zucc. (Fabaceae) y la Evaluación Antifúngica del Extracto Alcaloideo y Lupanina contra Fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(2), 124-129.

ANEXOS

Anexo 1. Agar PDA

Fórmula	gr/L
Extracto de papa	4.0
Glucosa	20.0
Agar	15.0

Anexo 2. Caldo DYGS

Fórmula	gr/L
Glucosa	2.0
Ácido Málico	2.0
Peptona Bacteriológica	1.5
Extracto de Levadura	2.0
Fosfato Dipotásico	0.5
Sulfato de Magnesio Heptahidratado	0.5
Ácido Glutámico	1.5

* pH 5.8 – 6.0

Anexo 3. Medio Quitosano N° 1

Fórmula	gr/L
Triptona	10.0
Extracto de Levadura	5.0
Cloruro de Sodio	5.0
Agar bacteriológico	10.0
Quitosano Coloidal	10.0

* pH 6.0 – 6.5

Anexo 4. Medio Quitosano N° 2

Fórmula	gr/L
Triptona	10.0
Extracto de Levadura	5.0

Cloruro de Sodio	5.0
Agar bacteriológico	10.0
Quitosano Coloidal	10.0
Púrpura de Bromocresol	0.15

* pH 5.0

Anexo 5. Medio CMC N° 1

Fórmula	gr/L
Carboximetil Celulosa	10.0
Fosfato Dipotásico	1.0
Sulfato de Magnesio	0.5
Sulfato de Hierro	0.01
Sulfato de Manganeso	0.01
Nitrato de Amonio	0.3
Agar Bacteriológico	12.0

* pH 7.0

Anexo 6. Medio CMC N° 2

Fórmula	gr/L
Carboximetil Celulosa	10.0
Extracto de Levadura	2.0
Sulfato de Amonio	0.4
Fosfato Monopotásico	0.08
Fosfato Dipotásico	0.08
Cloruro de Calcio	0.4
Peptona Bacteriológica	2.0
Agar Bacteriológico	12.0

* pH 7.0

Anexo 7. ANDEVA

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F Value	Pr(>F)
Bacterias	34	100015	2941.6	341.380	<2e-16 ***
Patógenos	2	1537	768.3	89.160	<2e-16 ***
Bacterias:Patógenos	68	5848	86.0	9.981	<2e-16 ***
Residuales	174	1499	8.6		

Códigos

0 '***'

0.001 '***'

0.01 '*'

0.05 '!

0.1 ''

1

Anexo 8. Medias del porcentaje de inhibición micelial

CÓDIGO BACTERIA	<i>Fusarium Oxysporum f. sp lycopersici</i>		
	COMBIA	M3MN	M4N
GIBI_000001_AG_B	35	24	38
GIBI_000006_AG_B	41	26	37
GIBI_000007_AG_B	46	46	51
GIBI_000013_AG_B	67	61	67
GIBI_000014_AG_B	66	68	68
GIBI_000025_AG_B	45	67	69
GIBI_000029_AG_B	43	66	67
GIBI_000031_AG_B	50	52	70
GIBI_00120B_AG_B	76	72	71
GIBI_000121_AG_B	49	35	50
GIBI_000122_AG_B	45	42	43
GIBI_000124_AG_B	49	49	51
GIBI_000125_AG_B	47	54	53
GIBI_000126_AG_B	63	65	63
GIBI_000127_AG_B	19	15	22
GIBI_000128_AG_B	50	51	54
GIBI_000130_AG_B	43	50	62
GIBI_000131_AG_B	35	48	43
GIBI_000132_AG_B	39	49	48
GIBI_000133_AG_B	43	50	50
GIBI_000137_AG_B	79	71	77
GIBI_000139_AG_B	76	79	78
GIBI_000140_AG_B	43	51	51
GIBI_000145_AG_B	51	64	66
GIBI_00146A_AG_B	2	6	33
GIBI_00146B_AG_B	0	0	0
GIBI_00146C_AG_B	0	8	0
GIBI_000147_AG_B	46	50	46
GIBI_000148_AG_B	45	43	46
GIBI_000149_AG_B	39	52	49
GIBI_000151_AG_B	47	50	60
GIBI_000152_AG_B	39	38	47
GIBI_000154_AG_B	43	42	46
GIBI_000155_AG_B	50	54	47
GIBI_000230_RF_B	12	6	14