

**EVALUACIÓN *IN VIVO* E *IN VITRO* DE BACTERIAS AISLADAS DE LA
RIZÓSFERA DE UCHUVA (*Physalis peruviana*) COMO
BIOCONTROLADORAS DE *Fusarium oxysporum***

REYNEL URREA CASTELLANOS

PROYECTO DE GRADO PARA OPTAR A TÍTULO DE BIÓLOGO

DIRECTOR

DR. PEDRO A. JIMÉNEZ MORALES

UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

PROGRAMA DE BIOLOGÍA APLICADA

BOGOTÁ D.C.

2010

INTRODUCCIÓN	1
1. OBJETIVOS	4
1.1. OBJETIVO GENERAL.....	4
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1. UCHUVA (<i>Physalis peruviana</i>).....	5
2.2. RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL.....	7
2.2.1. Promoción Crecimiento Directo.....	8
2.2.2. Promoción Crecimiento Indirecto.....	10
2.2.2.1. Control Biológico.....	11
2.2.2.1.1. Antagonismo Mediado.....	12
2.2.2.1.1.1. Antibióticos.....	12
2.2.2.1.1.2. Parasitismo y Lisis.....	15
2.2.2.1.1.3. Interferencia Química.....	16
2.2.2.1.2. Antagonismo Indirecto.....	17
2.2.2.1.2.1. Competencia.....	17
2.2.2.1.2.2. Inducción Respuesta Sistémica.....	19
2.3. GENERALIDADES HONGOS FTOPATÓGENOS DEL SUELO.....	21
2.3.1. <i>Fusarium oxysporum</i>	22
2.3.1.1. Generalidades.....	22
2.3.1.2. Morfología.....	24
2.3.1.3. Control.....	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1. LUGAR DE ESTUDIO.....	28
3.2. FASE DE CAMPO.....	28
3.3. FASE DE LABORATORIO.....	29
3.3.1. Obtención y Aislamiento de las Rizobacterias.....	29
3.3.2. Activación Hongos y Bacterias.....	30
3.3.3. Obtención Inoculo Bacteriano.....	30
3.3.4. Determinación Actividad Antagonismo <i>In Vitro</i>	31

3.3.4.1. Pruebas de Antagonismo <i>In Vitro</i> Tipo I.....	31
3.3.4.2. Pruebas de Antagonismo <i>In Vitro</i> Tipo II.....	32
3.3.5. Ensayos de Germinación.....	34
3.4. FASE DE INVERNADÉRO.....	36
3.4.1. Pruebas de Antagonismo <i>In Vivo</i>	36
3.4.1.1. Preparación Inoculo <i>Fusarium oxysporum</i>	37
3.4.2. Registro Crecimiento.....	38
3.5. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	40
3.5.1. Extracción de ADN, PCR y Secuenciamiento.....	40
3.5.2. Análisis de Secuencias.....	41
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	41
4. RESULTADOS.....	42
4.1. PRUEBAS DE ANTAGONISMO <i>IN VITRO</i>	42
4.1.1. Prueba de Antagonismo <i>In Vitro</i> Tipo I.....	42
4.1.2. Prueba de Antagonismo <i>In Vitro</i> Tipo II.....	44
4.2. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	53
4.3. ENSAYOS DE GERMINACIÓN.....	53
4.4. PRUEBAS DE ANTAGONISMO <i>IN VIVO</i>	55
4.4.1. Incidencia.....	56
4.4.2. Severidad.....	60
4.5. PREOMOCIÓN CRECIMIENTO.....	65
4.5.1. Área Foliar y Longitud del Tallo.....	65
4.5.2. Peso Seco.....	67
5. DISCUSIÓN.....	70
5.1. ANTAGONISMO <i>IN VITRO</i>	70
5.2. ANTAGONISMO <i>IN VIVO</i>	73
5.3. PROMOCIÓN CRECIMIENTO Y GERMINACIÓN.....	76
6. CONCLUSIONES.....	79
7. RECOMENDACIONES.....	80
8. BIBLIOGRAFÍA.....	81

9. CONSULTA VIRTUAL.....90
10. ANEXOS.....91

INTRODUCCIÓN

La uchuva (*Physalis peruviana*) se ha convertido, en los últimos años, en un producto de alto consumo a nivel nacional y se ha posicionado como el segundo producto frutícola de exportación de Colombia después del banano, con exportaciones que crecieron de US\$ 3 millones FOB en 1994 a US\$ 23 millones FOB con 6200 toneladas exportadas en el 2005, dirigidas principalmente a Holanda y Alemania, convirtiendo a la uchuva en uno de los frutales más promisorios del país (Florez *et al.*, 2000; Zapata *et al.*, 2002; CCI, 2005). Como en cualquier cultivo de importancia económica, el control de enfermedades causadas por hongos, bacterias y/o virus, es de vital importancia para obtener una buena rentabilidad y evitar las pérdidas durante la cosecha. Para lograr lo anterior, en la mayoría de los casos se emplean agroquímicos, los cuales se aplican en gran cantidad y en combinaciones para el manejo de las diferentes enfermedades que se puedan presentar (Raaijmakers *et al.*, 2009). Esta dependencia en el empleo de sustancias químicas, genera efectos negativos, como el aumento de patógenos resistentes a los agentes aplicados, la contaminación del medio ambiente y un incremento progresivo en los costos de producción a causa de gastos adicionales en dichos insumos (Compant *et al.*, 2005).

Por otro lado, la demanda mundial de productos libres de pesticidas se ha incrementado, creando una presión sobre la producción considerada como no limpia. De este modo, durante las últimas dos décadas, se han buscado alternativas biológicas de control basadas en microorganismos asociados a las plantas. Se reportan un gran número de estudios que demuestran las capacidad de estos para actuar como antagonistas de patógenos, inductores de respuestas fisiológicas de defensa en las plantas e incluso como promotores de crecimiento de las mismas (Compant *et al.*, 2005). Entre estos microorganismos se destacan las denominadas PGPBs (Plant Growth Promoting Bacteria), las cuales se pueden

encontrar en diferentes órganos de la planta y en el suelo cercano a las raíces (rizósfera), denominadas estas últimas como PGPRs (Promoting Growth Plant Rhizobacteria) (Compant *et al.*, 2005).

El género *Fusarium.*, es uno de los géneros más importantes de hongos patógenos de plantas, con un historial de infecciones devastadoras en varios cultivos alrededor del mundo (Laitila *et al.*, 2002). En Colombia, se ha reportado *Fusarium sp.*, junto con *Pythium sp.*, *Rhizoctonia sp.*, *Botrytis sp* y *Sclerotinia sp.*, como causante de la enfermedad denominada “Mal de Semilleros” o “Damping off” en plántulas de uchuva, que puede llegar a afectar hasta un 100% de estas en fase de semillero (Florez *et al.*, 2000; Zapata *et al.*, 2002; Angulo, 2005). Otra de las enfermedades conocidas que es producida por este género es la marchitez vascular, la cual es inducida en muchas especies vegetales por *Fusarium oxysporum* (Nelson *et al.*, 1981). Según Angulo (2005), esta enfermedad es actualmente en Colombia, la más limitante del cultivo de uchuva, siendo favorecida por la siembra continua en un mismo terreno y/o por lotes mal drenados.

Aunque en general para el control de *F. oxysporum* en otros cultivos se lleva a cabo una esterilización del suelo, empleando MES (Metham-Sodium) y/o BM (Bromuro de Metilo), (Reauven *et al.*, 2005), estas prácticas no son ambientalmente aconsejables, ya que en el primer caso el compuesto usado es carcinógeno (Kegley *et al.*, 2008) y en el segundo es reportado como sustancia que destruye la capa de ozono (EPA, 2008). Por lo cual, la búsqueda e implementación de alternativas biológicas de control para este patógeno son necesarias y urgentes.

Al presente, existe un gran número de estudios, donde se reporta la capacidad de diferentes cepas de PGPBs, pertenecientes al grupo de las PGPRs, de los géneros *Bacillus*, *Paenobacillus* y *Pseudomonas*, para controlar enfermedades ocasionadas por *F. oxysporum* en varias especies cultivadas, principalmente bajo

condiciones de laboratorio e invernadero (Chung *et al.*, 1998; Ramamoorthy *et al.*, 2000; González *et al.*, 2004; Dutta *et al.*, 2007; Srivastava & Shalini, 2008; Upadhyay & Srivastava, 2008). Estos trabajos permiten plantear la posibilidad de usar estos microorganismos, como una herramienta ambientalmente amigable, para el control de *F. oxysporum* en *P. peruviana*. La concreción de su uso en este patosistema particular exige su exploración desde condiciones *in vitro* hasta condiciones de campo. En este trabajo pretendemos el aislamiento de bacterias a partir de muestras de raíz de plantas de uchuva, y el suelo cercano a estas, así como su evaluación *in vitro* e *in vivo* (bajo invernadero) frente a *F. oxysporum*, y dar el primer paso en la selección de PGPRs con potencial antagonista de este hongo.

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de bacterias asociadas a la rizósfera de *Physalis peruviana* con actividad antagonista frente a *Fusarium oxysporum*.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer una colección de cepas de la rizósfera de *Physalis peruviana* con potencial para ser evaluadas *in vitro* y *in vivo* en el patosistema Uchuva- *Fusarium oxysporum*.
- Evaluar la actividad antagonista *in vitro* de rizobacterias de uchuva sobre *Fusarium oxysporum*.
- Evaluar la capacidad biocontroladora de rizobacterias sobre *Fusarium oxysporum* en plantas de uchuva
- Identificar aquellas rizobacterias que presenten actividad antagonista frente a *F. oxysporum*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. UCHUVA (*Physalis peruviana*)

La uchuva es una solanácea originaria de Los Andes, más específicamente del Perú, pero ocurre desde Venezuela hasta Chile. En Colombia, se cultiva en los departamentos de Antioquia, Boyacá, Cauca, Cundinamarca, Huila y Nariño, en alturas comprendidas entre los 1800 y 2800 m.s.n.m (Zapata *et al.*, 2002).

Con un aumento en la altitud, el porte de la planta se hace más bajo, las hojas se hacen más pequeñas y gruesas, adaptaciones características a bajas temperaturas y alta incidencia de radiación ultravioleta (Larcher, 2003). Se ha reportado que la uchuva prospera mejor a temperaturas que oscilan entre 13°C y 18°C. Las temperaturas muy altas pueden afectar negativamente la floración y la fructificación. Es muy susceptible a las heladas, necesita de humedad relativa del 70% al 80% y la precipitación anual debe oscilar entre 1000 a 1800 mm, en caso contrario se pueden presentar plantas exuberantes pero con fructificación atrasada (Florez *et al.*, 2000). Una buena radiación favorece la fructificación, aunque el cultivo puede desarrollarse bien bajo cierto porcentaje de sombra. Respecto a este factor, cabe anotar que la uchuva es considerada como una planta de día corto (Florez *et al.*, 2000).

La uchuva exhibe un crecimiento indeterminado, caracterizado por presentar las fases reproductiva y generativa simultáneamente, sin necesidad de entrar en receso. Esta planta puede alcanzar alturas entre 1 y 1,5 m cuando no se realizan podas, y con podas formativas puede alcanzar los 2,5 m. Presenta raíces poco profundas que pueden llegar a crecer hasta un metro y hojas simples, alternas, pecioladas cuyo tamaño es de 5 a 15 cm de largo y de 4 a 10 cm de ancho aproximadamente. En la parte basal del tallo principal, antes de la primera bifurcación (entre los nudos 8 y 12), se desarrolla solamente una hoja por nudo,

mientras que en las ramas laterales y en las productivas, cada nudo normalmente lleva dos hojas (Florez *et al.*, 2000).

La floración se inicia aproximadamente a los 70-80 días después de la siembra. A medida que el fruto se va formando, el cáliz empieza a crecer hasta que envuelve el fruto, cambiando progresivamente la coloración de verde a pergamino debido a la pérdida de clorofila. El fruto producido puede tener un diámetro entre 1.25 y 2.5 cm, y un peso entre 4 y 10 g, conteniendo entre 100 y 300 semillas (Florez *et al.*, 2005). El crecimiento de los frutos se caracteriza por presentar tres periodos: un primer ciclo de crecimiento lento, un segundo ciclo de crecimiento rápido, que se extiende hasta el inicio de la maduración, hacia la mitad de este periodo la velocidad de crecimiento es máxima, y al final del mismo el fruto alcanza prácticamente su máximo desarrollo. El último periodo, es lento, siendo bajo el aumento del crecimiento del fruto, pero se producen importantes cambios metabólicos característicos de la maduración (Flores *et al.*, 2000).

Florez *et al.* (2000) sostienen que la propagación de la uchuva generalmente es realizada mediante reproducción sexual. En este caso, según los autores, se emplea la pregerminación en soluciones nutritivas para garantizar un mayor porcentaje de germinación (85 – 90%). Sin embargo, también ocurre la reproducción asexual, mediante esquejes de tallo y de hoja, por medio de injertos, y cultivos *in vitro* (Florez *et al.*, 2000).

El cultivo de la uchuva puede tener un ciclo de producción de hasta 2 años, con la primera cosecha entre 6 y 7 meses, contados a partir del semillero, alcanzando un tiempo total desde la propagación hasta cosecha de 9,5 meses (Florez *et al.*, 2000). El período útil de producción de la planta comprende los 9 meses desde la primera cosecha, pero la productividad como la calidad de la fruta va disminuyendo. Sin embargo, esta producción es continua durante el año (Cedeño & Montenegro, 2004).

2.2. RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL

Actualmente un gran número de trabajos científicos describen el uso potencial de bacterias asociadas a las plantas como agentes que estimulan el crecimiento e intervienen en la salud de las mismas. Las denominadas, por su nombre en inglés Plant Growth Promoting Bacteria (PGPBs) están asociadas con casi todas las especies de plantas y se encuentran comúnmente en muchos tipos de ambientes (Compant *et al.*, 2005). Estas, se ubican en diferentes órganos de la planta ya sea de forma endofítica o epifíticas sobre la superficie de las hojas, tallos, semillas y /o raíces. Las bacterias que se ubican en la última zona son conocidas como Plant Growth Promoting Rizhobacteria, (PGPRs) (Haas & Défago, 2005). A pesar de que las PGPBs utilizan diferentes nichos ecológicos, estas emplean mecanismos similares tanto de promoción de crecimiento como de control sobre patógenos. En el último caso, los principales mecanismos de biocontrol mediados por estos microorganismos son competencia por espacio y/o sustrato, producción de aleloquímicos inhibitorios del crecimiento e inducción de resistencia sistémica (Induced Systemic Resistance: ISR) en la planta hospedera (Compant *et al.*, 2005).

Debido a que las PGPRs ejercen su efecto sobre las plantas a través de la zona radicular, es importante definir previamente, el hábitat donde estas se encuentran, denominado rizósfera. La rizósfera, es el volumen del suelo afectado por la presencia de las raíces de la planta en crecimiento, donde los múltiples compuestos (Azúcares, polisacáridos, amino ácidos, ácidos orgánicos, ácidos grasos, factores de crecimiento, entre otros) son liberados como consecuencia de procesos metabólicos de la planta (Uren, 2007). Las sumas relativas y absolutas de estos exudados varían con la especie vegetal, cultivo, edad de la planta, y condiciones ambientales, incluyendo propiedades del suelo, particularmente, a nivel químico, físico y biológico (Uren, 2007).

Respecto a las PGPRs, este grupo fue definido por Kloepper en 1979 como bacterias de vida libre asociadas a la zona radicular, las cuales estimulan el crecimiento de las plantas significativamente. Estas bacterias presentan características particulares que les permiten tener una relación estrecha con la planta hospedera, y que a su vez les confieren una buena capacidad de control sobre diferentes patógenos, siendo las PGPBs que mejores resultados han mostrado respecto a la promoción de crecimiento y control de enfermedades en diferentes plantas de cultivo (Ramamoorthy *et al.*, 2001; Compant *et al.*, 2005; Haas & Défago, 2005). Adicionalmente, otra característica importante que debe tener una rizobacteria para ser catalogada como PGPR, es una buena capacidad de colonización de la rizósfera y/o rizoplasma sin invadir el tejido interno de la raíz (como es el caso de las micorrizas), de manera tal que les permita mantener una alta densidad poblacional respecto a otros microorganismos y no deben ser perjudiciales para el hombre ni otros microorganismos benéficos para la planta (Jiménez, *et al.*, 2001).

2.2.1. PROMOCIÓN CRECIMIENTO DIRECTO

Los reguladores de crecimiento de las plantas participan en el desarrollo de células tejidos órganos y demás estructuras; estos compuestos se activan en las plantas en cantidades muy pequeñas y su síntesis es altamente regulada (Ramírez & Mellado, 2006). No solo las plantas producen estas hormonas sino también numerosas bacterias asociadas a estas, ya sean benéficas o patógenas, las cuales sintetizan una o más de estas sustancias, tales como: *Azospirillum*, *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Pseudomonas*, entre otras (Ramírez & Mellado, 2006). Estas bacterias secretan hormonas como giberelinas, citoquininas y auxinas, las cuales ejercen efectos directos, como la promoción del crecimiento o indirectos por medio del mejoramiento de la nutrición de la planta vía un mejor desarrollo de las raíces (Ramírez & Mellado, 2006).

Otros mecanismos de promoción de crecimiento de las plantas incluyen degradación de compuestos de fosfato orgánicos, reducción mineral por medio de las phenazinas y producción de compuestos volátiles (Banerjee *et al.*, 2006).

En el primer caso, es bien conocido que bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces*, solubilizan fosfato lo cual puede aumentar la disponibilidad de fósforo en suelos deficientes, a través de la producción de ácidos y otros mecanismos, permitiendo así que la planta lo tome fácilmente (Banerjee *et al.*, 2006).

En el segundo caso, las phenazinas producidas por las rizobacterias, son conocidas por su capacidad antifúngica y recientemente se ha demostrado que estas pueden reducir minerales aumentando la disponibilidad de diversos nutrientes, como el hierro, para las plantas con las cuales se asocia (Banerjee *et al.*, 2006; Ramirez & Mellado, 2006).

En el caso de los compuestos volátiles, metabolitos bacterianos como el 2-3, butanediol, y la acetoina, son producidos por *Bacillus sp*, los cuales son capaces de promover el crecimiento en *Arabidopsis thaliana*, posiblemente influenciando la vía de señalización de citoquinina (Banerjee *et al.*, 2006).

Además de lo mencionado anteriormente las rizobacterias pueden promover asociaciones benéficas entre las plantas y otros microorganismos (Duponnois, 2006; Ramirez & Mellado, 2006). Por ejemplo *Azospirillum brasilense*, promueve la formación de nódulos por parte del género *Rizobium* en plantas de frijol, al mejorar su relación simbiótica con la planta (Ramirez & Mellado, 2006). Otro ejemplo, es la capacidad que tienen diferentes PGPR para promover asociaciones micorrízicas, como es el caso del incremento de la micorrización arbuscular en el trébol rojo (*Trifolium pratense L.*) por parte de *Glomus mosseae* al aplicarse en conjunto con la rizobacteria *Paenobacillus brasilensis* (Duponnois, 2006). Este

mejoramiento se debe a que las bacterias son capaces de mejorar el crecimiento de las hifas del hongo e influenciar la fisiología de la planta para mejorar esta relación (Duponnois, 2006; Ramirez & Mellado, 2006).

Por último, las rizobacterias pueden proteger a la planta en contra de condiciones ambientales adversas y suelos desfavorables, a través de la liberación de sustancias que mejoran la estructura del suelo y/o la inducción de mecanismos de respuesta al estrés en la planta (Ramirez & Mellado, 2006).

2.2.2. PROMOCIÓN CRECIMIENTO INDIRECTO

La promoción de crecimiento en una especie vegetal por parte de las PGPRs, no solo se da como consecuencia de un efecto directo sobre la misma, como se mostró en la sección anterior, sino también de manera indirecta al influir en factores bióticos y abióticos que mejoren o permitan un buen desarrollo de la planta (Antoun & Prévost, 2006). En el caso de los factores bióticos, microorganismos patogénicos y deletéreos, insectos y nemátodos, por ejemplo, afectan el crecimiento normal de la planta durante el establecimiento de su interacción con el hospedero, generando estrés en el mismo y en algunos casos produciendo la muerte de la especie vegetal (Raaijmakers *et al.*, 2009). Por lo tanto, si estos organismos perjudiciales para determinado cultivo, pueden ser controlados, de manera tal que sus efectos se vean eliminados o disminuidos, esto beneficiará a la planta de interés, evitando un estrés y gasto de energía innecesario, pudiéndose utilizar esta última en el desarrollo y crecimiento de la planta. De esta forma, el control biológico de fitopatógenos (principalmente bacterias y hongos) por medio de las PGPRs, ha sido durante los últimos 20 años un campo de estudio álgido, que ha dado como resultado la elucidación de los mecanismos de control por parte de estas, así como la creación, producción y comercialización de productos que pueden ser empleados en la agricultura orgánica y comercial (Glick, 1995; Sturz *et al.*, 2000; Compant *et al.*, 2005;

Ramirez & Mellado, 2006), aclarando, sin embargo, que su implementación a gran escala y nivel mundial ha sido lenta y difícil (Ramirez & Mellado, 2006).

2.2.2.1. CONTROL BIOLÓGICO

En la bibliografía, se encuentran diferentes definiciones de control biológico, las cuales se acomodan generalmente al marco conceptual de un campo de estudio específico. En el caso de la fitopatología, el término “Control Biológico”, aplica principalmente al uso de antagonistas microbianos para suprimir enfermedades, así también como el uso de patógenos específicos para controlar poblaciones de especies vegetales consideradas como malezas en el cultivo (Pal & McSpadden, 2006). En este contexto una definición adecuada sería “la utilización consciente y propositiva de organismos vivos introducidos o residentes, diferentes a plantas hospederas resistentes, para suprimir las actividades y poblaciones de uno o más patógenos de plantas” (Pal & McSpadden, 2006). De esta manera, los organismos que sean capaces de suprimir al patógeno y la enfermedad, son denominados como Agentes de Control Biológico (BCAs, por sus siglas en ingles) (Pal & McSpadden, 2006).

Debido a que los antagonistas y patógenos deben interactuar para mostrar un efecto, los organismos tienen que tener alguna forma de contacto, ya sea directa o indirectamente. Las interacciones ecológicas que son útiles para el control son principalmente antagonismo, competencia, parasitismo y predación, las cuales son todas referidas como antagonismo, debido a que en todos los casos, los patógenos son antagonizados por la presencia y actividades de otros organismos (Pal & McSpadden, 2006).

2.2.2.1.1. ANTAGONISMO MEDIADO

Las PGPRs con el fin de lograr una buena colonización y persistencia efectiva en los nichos de la rizósfera, producen aleloquímicos que les confieren la capacidad de reducir poblaciones de otros microorganismos que habitan el suelo (Compant *et al.*, 2005), que en el caso de ser patógenos para la planta de interés, pueden ser usados como BCAs. Estos compuestos han demostrado su actividad antagónica principalmente en ensayos *in vitro* mediante cultivos duales entre la bacteria controladora y el patógeno, siendo seleccionados aquellos que presenta inhibición de crecimiento de este último (Raaijmakers *et al.*, 1999; Montealegre *et al.*, 2003; Swain & Ray, 2006), aunque también se han aislados en estudios *in situ*, por medio de técnicas de cromatografía (Raaijmakers *et al.*, 1999). Estos cultivos duales consisten en enfrentar en un mismo medio de cultivo, ya sea sólido o líquido, al patógeno (hongo) y el agente potencial controlador (rizobacteria), tomando como indicador de inhibición, el crecimiento en diámetro del micelio del hongo en el primer caso y el peso seco del micelio en el segundo (Montealegre *et al.*, 2003).

2.2.2.1.1.1. ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos comprenden un grupo heterogéneo de compuestos orgánicos de bajo peso molecular producidos por microorganismos, los cuales a bajas concentraciones son deletéreos para el crecimiento o actividades metabólicas de otros microorganismos (Raaijmakers *et al.*, 2002). Numerosos antibióticos han sido aislados de varias cepas biocontroladoras, representando diferentes géneros de bacterias (Raaijmakers *et al.*, 2002), siendo el género *Pseudomonas sp.* el más estudiado, debido a que este es un habitante común no solo del suelo si no también de las partes aéreas de la planta, es aislado fácilmente de ambientes naturales, utiliza un amplio rango de substratos y es sencillo de cultivar y manipular genéticamente (Whipps, 1997). La síntesis de antibióticos está estrechamente relacionada con el estatus metabólico general de la célula, lo cual

a su vez, está dictado por la disponibilidad de nutrientes y otros estímulos ambientales, como los minerales, fuentes de carbono, pH, temperatura y otros parámetros (Compant *et al.*, 2005). Los principales antibióticos que juegan un papel importante en la supresión de patógenos de plantas son agrupados en no-volátiles y volátiles (Fernando *et al.*, 2006).

Entre los antibióticos no-volátiles encontramos una gran variedad representados por: 1) Policétidos, 2) compuestos heterocíclicos nitrogenados (derivados de Fenazinas), 3) Fenilpirroles (Pirrolnitrina), 4) Lipopéptidos ciclicos, 5) Lipopéptidos y 6) Aminopolioles (Fernando *et al.*, 2006).

- 1) El 2,4 diacetyl-phloroglucinol (DAPG), pioluteorina y mupirosina, son policétidos producidos por bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*, y resultan altamente efectivos en la supresión de fitopatógenos, siendo el primero, el más estudiado gracias a su amplio espectro, el cual incluye hongos fitopatógenos importantes como *Gaeumannomyces graminis* (Raaijmakers *et al.*, 2002; Haas & Défago, 2005).
- 2) Más de 50 compuestos de fenazinas que ocurren naturalmente han sido descritos, siendo reportados para los géneros *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Brevibacterium* y *Streptomyces* (Fernando *et al.*, 2006). Tenemos así que piocianina, PCA (phenazine-1-carboxylic acid) e hidroxifenazinas son compuestos antimicrobianos de este tipo producidos por *Pseudomonas sp.*, con actividad reportada en contra de hongos fitopatógenos del suelo, como *Fusarium oxysporum*, *Pythium sp.*, entre otros (Dwivedi & Johri, 2003; Haas & Défago, 2005; Upadhyay & Srivastava, 2008).
- 3) Para el caso de las fenilpirroles, la pirrolnitrina (PRN, por sus siglas en inglés), producida por los géneros *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Myxococcus* y *Serratia*, es conocida por su amplio rango de actividad contra basidiomicetes, deuteromicetes y ascomicetes, incluyendo

patógenos económicamente importantes como *R. solani*, *B. cinerea*, *V. dahliae*, *S. sclerotiorum*, *F. sambucinum*, *P. ultimum*, entre otros (Raaijmakers *et al.*, 2002; Fernando *et al.*, 2006).

- 4) Los lipopéptidos cíclicos (CLPs, por sus siglas en inglés), son otro tipo de antibióticos sintetizados tanto por bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, los cuales también están involucrados en el metabolismo y proliferación celular, reportándose actividad controladora de cepas de *P. fluorescens* por medio de este tipo de antibiótico sobre *P. ultimum* y *R. solani* (Andersen *et al.*, 2003).
- 5) El penúltimo grupo de los compuestos no-volátiles, son los lipopéptidos, estos agrupan las iturinas, la bacillomycina y surfactina, compuestos conocidos por su actividad antifúngica contra *P. ultimum*, *R. solani*, *F. oxysporum* y *A. flavus*. Cepas del género *Bacillus* son conocidas por su amplia producción de péptidos bioactivos pertenecientes a esta clase y, principalmente, la especie *B. subtilis*, reportándose esta como agente de control de las especies fitopatógenas mencionadas (Fernando *et al.*, 2006).
- 6) Por último, la zwittermicina, un tipo de aminopoliol, es una molécula bioactiva novedosa producida por *Bacillus* sp., con amplio espectro de acción en contra de varios microbios. La actividad biológica diversa de este antibiótico incluye la supresión de enfermedades de plantas causadas por oomicetes y es responsable por la actividad insecticida de *B. thuringiensis* (Raaijmakers *et al.*, 2002; Emmert *et al.*, 2004; Fernando *et al.*, 2006).

Con respecto a los antibióticos volátiles producidos por cepas de PGPRs, el más conocido es la cianida de hidrógeno (HCN, por sus siglas en inglés), el cual es un metabolito secundario sintetizado por las bacterias Gram-negativas *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* y *Chromobacterium violaceum*, que actúa sobre la citocromo oxidasa de muchos organismos (Podile & Kishore, 2007). La cepa CHAO de *P. fluorescens* es conocida ampliamente por su actividad biocontroladora y diversa

producción de compuestos antimicrobianos sobre hongos fitopatógenos del suelo, reportándose el HCN como el responsable del control de *Thielaviopsis basicola* en plantas de tabaco (Sacherer *et al.*, 1994). Otros compuestos volátiles producidos por las PGPRs, son los aldehídos, alcoholes, cetonas y sulfidos, todos producidos por *P. chlororaphis* (cepa PA23) y que inhibieron todos los estados de *S. sclerotiorum*, afectando el crecimiento micelial, germinación de las ascosporas y sobrevivencia del esclerocio (Fernando *et al.*, 2004).

2.2.2.1.1.2. PARASITISMO Y LISIS

Muchos microorganismos producen y liberan enzimas líticas que pueden hidrolizar una amplia variedad de polímeros, incluyendo quitina, proteínas, celulosa, hemicelulosa y ADN (Pal & McSpadden, 2006). Aunque estas enzimas pueden alterar y/o lisar paredes celulares de organismos, generalmente actúan para descomponer residuos de plantas y materia orgánica no viva (Pal & McSpadden, 2006). Sin embargo, sí estas enzimas tienen un efecto sobre algún patógeno de interés, el microorganismo que lo produzca puede ser considerado como agente de control biológico. Las quitinasas, son de gran importancia en el parasitismo y/o lisis de hongos por parte de las PGPRs, ya que la quitina es el mayor constituyente de la pared celular en un gran número de hongos fitopatógenos (Podile & Kishore, 2007). Estas enzimas han sido reportadas como agente causal de control por *Serratia marcescens* contra *Sclerotium rolfsii*, *Paenibacillus sp.* y *Streptomyces sp.* contra *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* y *Pseudomonas stutzeri* contra *F. solani* (Chung, 1999).

Otro grupo importante de enzimas hidrolíticas son las glucanasas, las cuales degradan β -1,3 glucano, componente de las paredes celulares de los hongos. Estas enzimas, están involucradas en el control de *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* por parte de *Paenibacillus sp.* y *Streptomyces sp.*, así como en la actividad biocontroladora de *P. cepacia* sobre varios hongos fitopatógenos,

incluyendo *R. solani*, *S. rolfsii* y *P. ultimum*, al inhibir su proliferación en la rizósfera (Compant *et al.*, 2005; Podile & Kishore, 2007).

2.2.2.1.1.3. INTERFERENCIA QUÍMICA

Los hongos fitopatógenos producen una gran variedad de enzimas y toxinas, las cuales están implicadas en el proceso de infección, por lo cual una interferencia o degradación de las mismas resultará en una reducción de la virulencia del patógeno. En el caso de las enzimas, éstas pueden degradar la pared celular de las células de la planta, e incluyen enzimas pectolíticas (exo y endo poligalacturonasas y pectina liasas) celulasas y cutinasas. Se ha demostrado por ejemplo, que *Bacillus megaterium*, inhibe la actividad de este tipo de enzimas producidas por *R. solani* al secretar una endoproteinasa extracelular que las degrada (Podile & Kishore, 2007). En el caso de las toxinas, como el ácido fusárico producido por varias especies del género *Fusarium*, pueden ser hidrolizadas por enzimas secretadas por las rizobacterias, como se ha demostrado para *B. cepacia* y *R. solanacearum*, o también pueden ser intervenidas por proteínas que se unen a la toxina impidiendo su efecto, como ocurre con la albicina mediado por una esterasa sintetizada por *Pantoea dispersa* (Zhang & Birch, 1997).

Un campo novedoso de investigación, y futura explotación, es la interferencia de la comunicación entre los microorganismos patogénicos, la cual es necesaria para atacar e infectar la planta. En general, los microorganismos se comunican inter e intra específicamente a través de un sistema conocido como Quórum Sensing (QS), que les permite reconocer su alrededor respecto a poblaciones de la misma o diferente especie, coordinando así, la expresión génica a nivel poblacional y de comunidad (Faure *et al.*, 2009). Esta comunicación es mediada principalmente por los AHLs (N-acil-homoserina lactonas) en bacterias, y es conocido enzimas capaces de hidrolizar o inactivar dichos compuestos, como la AHL-lactonasa,

producida por *Bacillus sp.* Hasta la fecha se conocen varios géneros de bacterias que inactivan las AHLs como *Agrobacterium*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, entre otras, convirtiéndose estas en agentes potenciales de biocontrol a través de este mecanismo (Faure *et al.*, 2009).

2.2.2.1.2. ANTAGONISMO INDIRECTO

El antagonismo indirecto, resulta de actividades que no involucran un reconocimiento u objetivo directo hacia el patógeno por el agente de control. De este modo la estimulación de las vías de defensa de la planta por BCAs no patogénicos, es la forma más indirecta de antagonismo. Así mismo, la competición por nichos de la rizósfera a través de una colonización agresiva, y la utilización eficiente de los exudados de las raíces como fuente de nutrientes, hace parte de este mecanismo, aunque en ocasiones la producción de aleloquímicos es una parte importante de este proceso (Pal & McSpadden, 2006).

2.2.2.1.2.1. COMPETENCIA

Una característica importante de las PGPR es su gran capacidad de colonización de la rizósfera, compitiendo por espacio y nutrientes con los microorganismos patógenos. Este proceso es complejo pues está influenciado por parámetros bióticos y abióticos, que determinan y caracterizan la ocupación de este hábitat. En la colonización de las raíces, un factor importante es la migración de las bacterias desde el punto de inoculación hasta la raíz, que se da de forma activa (movilidad de la bacteria) y pasiva (percolación del agua y vectores) (Lugtenberg & Dekkers, 1999).

El rol de la primera en la colonización de las raíces ha sido demostrado para *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus sp.* en plantas de tomate y papa (Lugtenberg

& Dekkers, 1999), donde la fuerte quimiotaxis de la bacteria hacia los exudados de las raíces y semillas es la principal característica para que ocurra este proceso (Bais *et al.*, 2006). La movilidad pasiva a través del flujo de agua y el transporte por parte de nematodos, anélidos y artrópodos, juegan un papel importante en la dispersión y primeras fases de la colonización (Lugtenberg & Dekkers, 1999).

Una vez la bacteria ha alcanzado la rizósfera, su capacidad de mantenerse y proliferar allí, dependerá del tipo de suelo (densidad y nutrientes disponibles en él), la temperatura, prácticas agrícolas y de su habilidad de utilizar ciertos exudados secretados por la planta, la cual determina en gran medida la composición de la rizósfera (Garbeva *et al.*, 2004; Bais *et al.*, 2005). Estos exudados juegan un papel importante como atrayentes a través de un gradiente y como nutrientes para las PGPRs. Estos compuestos se pueden separar, de manera general, en compuestos de bajo peso, como amino-ácidos, ácidos orgánicos, azúcares, fenoles, entre otros metabolitos secundarios, los cuales promueven la diversidad microbiana y compuestos de alto peso molecular como el mucílago (polisacáridos) y proteínas, que componen la mayor proporción de las sustancias secretadas por las raíces (Garbeva *et al.*, 2004; Compant *et al.*, 2005; Bais *et al.*, 2006).

La competencia por hierro, ha sido demostrada como un mecanismo importante de control, ya que este es un elemento esencial para los microorganismos, lo cual se ve reflejado en los mecanismos y procesos que han desarrollado estos para su obtención, pues la falta de este elemento reduce la cantidad de ácidos nucleicos, inhibe la esporulación y cambia la morfología de las células (Mathiyazhagan *et al.*, 2004).

Los sideróforos, son moléculas de bajo peso molecular secretadas por los microorganismos que atrapan y forman un complejo con el hierro que se encuentre en el medio, este complejo es tomado y transportado al interior del microorganismo, a través de receptores en la membrana, para su posterior

utilización (Haas & D efago, 2005). Muchas bacterias aeróbicas y aeróbicas facultativas, como *Pseudomonas* y *Bacillus* respectivamente, poseen una alta afinidad por el hierro gracias a sus sideróforos, permitiéndoles ser más competentes en la captura de este elemento frente a microorganismos perjudiciales para la planta (Jurkevitch *et al.*, 1992), los cuales así se ven excluidos de la rizósfera. Un ejemplo, es la supresión del marchitamiento causado por *Fusarium sp.* en rábano, por la cepa WCS358 de *Pseudomonas*, que a través de la competición mediada por sideróforos redujo la severidad e incidencia de esta enfermedad (Podile & Kishore, 2007).

2.2.2.1.2.2. INDUCCIÓN DE RESISTENCIA

Otro modo de control, es la capacidad de las PGPR para activar o inducir mecanismos de defensa en las plantas, proceso conocido como resistencia sistémica inducida (Induced Systemic Resistance: ISR), que aunque es fenotípicamente similar a la resistencia sistémica adquirida (Systemic Acquired Resistance: SAR), la cual ocurre cuando un patógeno es detectado por la planta), no genera la acumulación de proteínas de resistencia ni es dependiente del ácido salicílico (Ramamoorthy *et al.*, 2001; Dutta *et al.*, 2008). Esta característica de las PGPR presenta una gran ventaja frente al uso de agroquímicos, ya que esta resistencia en la planta la protege frente a un amplio espectro de patógenos, que incluyen bacterias, hongos, nematodos y virus, mientras que los agroquímicos son más específicos, haciendo necesario la aplicación de más de uno a la vez para un control integral (Ramamoorthy *et al.*, 2001).

Rizobacterias benéficas que disparan la ISR, no causan daño o necrosis localizada al hospedero, por lo cual, los factores producidos que estimulan esta respuesta en la planta deben ser diferentes de los producidos por los patógenos (Van Loon & Bakker, 2006). Los determinantes involucrados en este mecanismo, se asocian generalmente a componentes comunes que están presentes en los

microorganismos, como los lipopolisacáridos (presentes en la membrana exterior de las bacterias) y la flagelina (proteína constituyente de los flagelos de las bacterias) (Corné *et al.*, 2001; Ramamoorthy *et al.*, 2001; Van Loon & Bakker, 2006). En los dos casos, su efectividad se ha comprobado al aplicar estos componentes purificados provenientes de rizobacterias del género *Pseudomonas* en las raíces de plantas como *Arabidopsis*, tomate y tabaco (Van Loon & Bakker, 2006).

Otro tipo de determinantes que han mostrado la capacidad de disparar la respuesta sistémica inducida en la planta, son compuestos producidos por los microorganismos, como los sideróforos, principalmente los de la especie *P. fluorescens*, y diferentes clases de antibióticos como el 2,4 DAPG y 2,3-butanediol, sintetizados por especies del género *Pseudomonas* y *Bacillus* respectivamente (Van Loon & Bakker, 2006). También, se ha reportado como agente inductor el ácido salicílico y enzimas como la β -1,3 glucanasa, quitinasa y peroxidasa, producidos en el primer caso por *P. aeruginosa* y en el segundo por las especies *B. mycoides* y *B. pumilis* (Pal & McSpadden, 2006).

Estos inductores, generan una cascada de reacciones en la planta, que en el caso del ISR son mediadas primordialmente por el ácido jasmónico (JA, por sus siglas en inglés) y etileno, a diferencia del SAR, donde la respuesta es mediada únicamente por el ácido salicílico (Pieterse *et al.*, 2001; Pieterse *et al.*, 2002). Aunque los tres compuestos utilizan el mismo receptor de membrana NPR1 (por sus siglas en inglés) en las células de la planta, la respuesta metabólica es diferente, generando en el caso del SAR, una acumulación de proteínas de resistencia y necrosis localizada (Pieterse *et al.*, 2001; Pieterse *et al.*, 2002). En el caso de ISR, se da un aumento en la sensibilidad por parte de la planta al ácido jasmónico y etileno sistemáticamente, conocido como “priming”, que permite una expresión rápida posterior de los genes de resistencia inducidos por estas hormonas, generando una mejor reacción por parte de la planta a la infección posterior del patógeno (Pieterse *et al.*, 2001; Pieterse *et al.*, 2002).

Cambios fisiológicos y metabólicos en la plantas, se observan como consecuencia de la activación de la resistencia inducida por diferentes rizobacterias, incrementando la síntesis de compuestos defensivos, como fenoles, quitinasas, peroxidasa y aumentando el grosor y fortaleza de las paredes celulares (Ramamoorthy *et al.*, 2001; Compant *et al.*, 2005). En estudios bajo invernadero en plantas de *Cucumis sativus* (Pepino), *Pisum sativum* (Arveja), *Raphanus sativus* (Rábano), *Solanum lycopersicum* (Tomate), *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* (Arroz), entre otras, se comprobó un aumento en la producción de enzimas hidrolíticas como quitinasas y β -1,3 glucanasas, y enzimas defensivas como PAL (L-fenilalanina amonio-liasa), POX (peroxidasa) y PPO (polifenol oxidasa), las cuales se acumulan en los sitios de penetración del hongo, al tratarse las semillas y sustrato de estas plantas con *P. fluorescens*. (Ramamoorthy *et al.*, 2001; Dutta *et al.*, 2008).

2.3. GENERALIDADES HONGOS FITOPATÓGENOS DEL SUELO

En muchos ecosistemas de explotación agrícola, los patógenos del suelo pueden ser una gran limitación de los cultivos (Weller *et al.*, 2002). Estos, están adaptados a crecer y sobrevivir en el suelo, pero cuando entran en contacto con la rizósfera, establecen la relación parasítica con la planta (Koike *et al.*, 2009). Existen cuatro grupos principales de fitopatógenos (hongos, bacterias, nemátodos y virus), de los cuales los hongos verdaderos y los oomicetes, son los más importantes (Raaijmakers *et al.*, 2009). La gran mayoría de hongos fitopatógenos son necrotróficos, lo cual significa que destruyen el tejido del hospedero con enzimas y toxinas a medida que avanza la hifa y no requieren de células vivas para obtener nutrientes (Raaijmakers *et al.*, 2009). Una característica importante de los patógenos necrotróficos del suelo, es que son generalistas, con un amplio rango de hospederos, por lo cual no es usual encontrar resistencia de un único gen (single-gen resistance) en las plantas (Raaijmakers *et al.*, 2009).

Los hongos fitopatógenos del suelo, pueden sobrevivir en este medio en forma de propágulos resistentes, así como clamidiosporas, esclerocios, hifas y conidios con paredes gruesas, o también sobrevivir en las raíces de las plantas y/o residuos de cosecha (Koike *et al.*, 2009; Raaijmakers *et al.*, 2009). En la mayoría de los casos, estos atacan preferiblemente raíces juveniles, las cuales mueren, permitiendo que el hongo se ramifique a través del córtex, reproduciéndose y formando esporas dentro del tejido radicular (Raaijmakers *et al.*, 2009). El micelio de dicho patógeno, puede avanzar raíz arriba, interna o externamente, que en el caso de grupos especializados que causan marchitamiento (como *F. oxysporum* y *Verticillium dahliae*) penetran por la endodermis en el tejido vascular y se desplazan hacia partes aéreas de la planta por el xilema (Alabouvette *et al.*, 2009; Raaijmakers *et al.*, 2009).

2.3.1. FUSARIUM OXYSPORUM

2.3.1.1. GENERALIDADES

Fusarium oxysporum, pertenece a la familia Nectriaceae, en a la división Ascomycota. Esta especie, hace parte de las comunidades de hongos habitantes del suelo, y se puede encontrar en cualquier tipo alrededor del mundo, por lo cual es un constituyente normal en la rizósfera de plantas, aislándose incluso de raíces asintomáticas en diferentes especies de cultivo (Gordon & Martyn, 1997). Todas las cepas de *F. oxysporum* son saprofíticas y capaces de sobrevivir y crecer por largos periodos de tiempo en el material orgánico del suelo y en la rizósfera, encontrándose por ejemplo que las praderas y sabanas sustentan y albergan altas poblaciones de esta especie (Fravel *et al.*, 2003). Sin embargo, las cepas que pueden invadir determinadas plantas, como una alternativa a la fase saprofíticas, y que son de importancia económica y alimenticia para el hombre, son responsables de daños severos en varios cultivos, causando grandes pérdidas y bajas en la productividad de los mismos (Laitila *et al.*, 2002).

Las cepas patogénicas de *F. oxysporum* exhiben complejos patrones de especificidad frente al hospedero, por lo cual a menudo se clasifican en *formas especiales* y razas fisiológicas (Alabouvette *et al.*, 2009). Aunque actualmente se estudian enzimas, factores de transcripción y proteínas involucradas en la transducción de señales, los factores genéticos que regulan la especificidad del hospedero permanecen desconocidos, y el descubrimiento de aislados de diferentes orígenes evolutivos que infectan el mismo hospedero, soportan la hipótesis de que esta especificidad puede haber aparecido convergentemente (Gordon & Martyn, 1997; Alabouvette *et al.*, 2009).

Las cepas patogénicas de *F. oxysporum* presentan un patrón de colonización de las raíces diferente a las no patogénicas, dándoles la capacidad de penetrar capas más profundas de la raíz, alcanzando de este modo la estela y vasos del xilema, lo cual no ocurre con las no patogénicas, las cuales aunque penetran la raíz, permanecen en capas externas como la epidermis e hipodermis (Fravel *et al.*, 2003; Alabouvette *et al.*, 2009). Esta invasión empieza con la colonización de la superficie radicular por los tubos germinales, creando una red de micelio, cuyas ramificaciones penetran la raíz. Siguiendo la penetración, las hifas del hongo son observadas inter e intracelularmente y no generan ni desorganización del cortex, ni destrucción evidente de la estructura celular y, aunque las células del hospedero muestran reacciones de defensa como la creación de barreras estructurales, engrosamiento y deposición de calosa, estas no son suficientes para detener el avance del patógeno (Alabouvette *et al.*, 2009).

Cepas patogénicas de *F. oxysporum* son responsables de diferentes tipos de enfermedad, como la podredumbre de raíz y corona en tomate (Van Loon & Bakker, 2009). Sin embargo, la más común es la marchitez o decaimiento, que se produce como consecuencia de una invasión de los haces vasculares de la planta a través del transporte de microconidias o de la colonización micelial, lo cual impide el transporte normal de nutrientes y agua dentro de esta (Baayen & Förch, 2001), generando pérdida de turgencia en la planta, amarillamiento y posterior

muerte. Además de la invasión del sistema vascular, se conocen un gran número de fitotoxinas como el ácido fusárico, que afectan no solo la fisiología y metabolismo de la planta, sino también a otros microorganismos que pueden ser benéficos para estas (Raaijmakers *et al.*, 2009).

2.3.1.2. MORFOLOGÍA

La bibliografía reporta a *F. oxysporum*, como un grupo que reúne un complejo de especies que por medio de la invasión del sistema vascular, causan la enfermedad conocida comúnmente como marchitamiento (Desjardins & Proctor, 2001; Kistler, 2001) y que a raíz de su complejidad genética en cuanto a la recombinación regular, variación genética y acumulación de mutaciones, su caracterización taxonómica hoy en día no está definida completamente (Jiménez *et al.*, 2004).

Las características morfológicas críticas para la identificación de esta especie, se evidencian en medios de cultivo como Papa Dextrosa Agar (PDA), y Agar Agua (AA), e incluyen la producción de microconidias en falsas cabezas sobre fialides cortas en la hifa, la producción de clamidiosporas y la forma tanto de las micro como macroconidia (Leslie & Summerell, 2006).

Las microconidias, son esporas generalmente unicelulares, sin septas, hialinas, elipsoidales a cilíndricas, rectas o curvas; con 5 a 12 μm de largo por 2,5 a 3,5 μm de ancho. Por otra parte, las macroconidias, presentan formas fusiformes, largas, moderadamente curvas, con varias células y de 3 a 5 septas transversales; presentando tamaños de 27 a 46 μm de largo por 3 a 4,5 μm . Por último, las clamidiosporas se forman simples o en pares, terminales o intercalares, poseen un tamaño de 5 a 15 μm de diámetro (Leslie & Summerell, 2006).

2.3.1.3. CONTROL

En general, el control de hongos fitopatógenos del suelo es difícil (Weller *et al.*, 2002), y aun más el de *F. oxysporum*, debido a como se mencionó anteriormente, este posee la habilidad de colonizar y vivir saprofiticamente en residuos de cosechas no hospedantes, por lo cual el inóculo se mantiene relativamente alto y por un tiempo considerable en los campos de cultivo (Gordon & Okamoto, 1990). Para el control de este hongo, se han empleado plantas resistentes, fungicidas, desinfección química de los residuos, entre otras, las cuales sin embargo no han tenido la eficacia esperada, debido a la aparición de nuevas variantes del patógeno en el caso de plantas resistentes, generación de resistencia a los diferentes agroquímicos, y a la contaminación que estos materiales producen en el medioambiente, que en algunos casos han sido reportados como cancerígenos para el hombre (Beckman, 1987; Zapata *et al.*, 2002; Jiménez *et al.*, 2004).

Otras formas de control más amables con el medio ambiente, son diferentes prácticas agrícolas que sirven para disminuir el inóculo de varios fitopatógenos del suelo, incluyendo *F. oxysporum*. Una de estas es la solarización, la cual consiste en el incremento de la temperatura del suelo por medio de la energía solar a niveles en los cuales muchos patógenos mueren, o son debilitados, para obtener un control significativo de las enfermedades. Adicionalmente, aunque también modifica el balance microbiano para favorecer microorganismos benéficos, como *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.* y *Talaromyces flavos* (Raaijmakers *et al.*, 2009).

La biofumigación o biodesinfección, es otra práctica agrícola mejor adaptada a regiones frías del planeta, que se basa en el cubrimiento plástico del suelo después de la incorporación de materia orgánica fresca. Esta al fermentarse, genera condiciones anaeróbicas y producción de metabolitos tóxicos (dependiendo de las especies vegetales empleadas) en el suelo, contribuyendo a la inactivación o destrucción de hongos patogénicos (Raaijmakers *et al.*, 2009). La rotación de cultivos con plantas no hospedantes, es una medida de manejo que

evita el incremento de poblaciones específicas de patógenos, lo cual resulta en una disminución de la incidencia y severidad de la enfermedad; de igual modo esta práctica puede estimular poblaciones de microorganismos antagonistas que afecte el crecimiento o actividad del patógeno (Weller, *et al.*, 2002). Por último, el manejo de residuos dejados sobre o cerca a la superficie del suelo es perjudicial, al preservar los patógenos y prevenir un decrecimiento en el inóculo de este, como es el caso de las especies del género *Fusarium sp.* Sin embargo, en otros casos, dejar residuos de cosecha de otras especies e incorporarlos al suelo, pueden promuevan la descomposición rápida y liberación de carbono en el suelo, favoreciendo un incremento en la actividad microbiana y mejorando el nivel de supresión (Raaijmakers *et al.*, 2009)

El control biológico de *F. oxysporum* en numerosos cultivos por la aplicación de bacterias y hongos antagonistas aislados a partir de suelos supresivos se ha investigado durante las últimas dos décadas (Chung *et al.*, 1999; Weller *et al.*, 2002). Actualmente, existen varios estudios que reportan diferentes cepas de PGPRs, principalmente del género *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Paenibacillus* como controladoras de este hongo, después de obtener resultados inhibitorios en experimentos tanto *in vitro* como en la aplicación de estos biocontroladores a semillas de las plantas y sustrato donde se siembran (Liu *et al.*, 1995; Hoffland *et al.*, 1996; Chan *et al.*, 2003; González *et al.*, 2004; Upadhyay & Srivastava, 2008).

Diferentes mecanismos de control, empleados tanto por rizobacterias como por especies no patogénicas de *F. oxysporum*, han sido reportados para suprimir la enfermedad causada por este hongo fitopatógeno. Por ejemplo, la producción de antibióticos por rizobacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*, tales como 2,4 diacetyl-phloroglucinol y phenazine-1-carboxylic acid (PCA) han mostrado ser inhibitorios del crecimiento de este hongo tanto *in vitro* como en ensayos bajo invernadero (Mazurier *et al.*, 2007).

La competencia, es otro mecanismo que se ha reportado como medio de control contra este hongo fitopatógeno, donde la secreción de sideróforos para captar hierro del medio por parte de *Pseudomonas fluorescens* (cepa CHA0) es el principal modo de acción contra *F. oxysporum* (Cook *et al.*, 1995). De manera similar, cepas no patogénicas de la misma especie, compiten por exudados provenientes de las raíces, así como por sitios de infección y proliferación en la raíz, con las cepas patogénicas, mecanismo de control empleado por la cepa no virulenta *F. oxysporum* Fo47 que suprime al hongo y disminuye la severidad de la enfermedad (Fravel *et al.*, 2003; Alabouvette *et al.*, 2009).

Por último, la inducción de la respuesta sistémica es otra posibilidad, demostrándose que el control de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* por *P. fluorescens* WCS417 generó disminución en la enfermedad, como consecuencia del engrosamiento de la pared en las células corticales (Van Loon & Bakker, 2007).

Así, debido a los modos de acción de este hongo para invadir a la planta por la raíz y permanecer en los suelos durante un tiempo prolongado, las PGPRs se han constituido en controladores biológicos importantes en la actualidad gracias a sus características metabólicas y biológicas particulares, donde incluso ya se tienen formulas comerciales desarrolladas a base de este tipo de bacterias para el manejo y control de la marchitez causada por *Fusarium* y otros patógenos (Haas & Défago, 2005). Las especies *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *P. auruginosa*, *Bacillus subtilis* y otras especies de *Bacillus*, han resultado las de más amplio potencial de comercialización (Nakkeeran *et al.*, 2006). Sin embargo, es importante aclarar que su implementación a nivel mundial, con el fin de reemplazar productos de síntesis química, ha sido un proceso lento, debido principalmente a que los niveles de supresión de enfermedades no siempre alcanzan a los obtenidos por fungicidas y bactericidas, al alto costo y menor viabilidad de los productos, y en gran parte a la falta de conocimiento e implementación de los mismos por parte de los agricultores (Nakkeeran *et al.*, 2006).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE ESTUDIO

La fase de campo, se llevó a cabo en cultivos de *Physalis peruviana* ubicados en los departamentos de Cundinamarca y Boyacá, Colombia. El procesamiento de las muestras, aislamiento y conservación de bacterias, así como los ensayos de antagonismo *in vitro* e *in vivo*, se llevaron a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Fitopatología e invernaderos de la Universidad Militar Nueva Granada, sede Cajicá (Cundinamarca, Colombia).

3.2. FASE DE CAMPO

Recolección de Muestras: En las salidas de campo, se tomaron muestras de plantas silvestres y cultivadas. Respecto a estas últimas, en cada cultivo de uchuva visitado, se seleccionaron aproximadamente de 6 a 12 plantas separadas entre sí 50 m, teniendo en cuenta un buen estado fitosanitario de las mismas. A las plantas elegidas, se les extrajo tanto raíces principales como secundarias, las cuales eran divididas en secciones pequeñas, para ser empacadas en bolsas plásticas y dispuestas en una nevera de icopor. El material recolectado, era transportado y almacenado a 4 °C el mismo día, en el laboratorio de Fitopatología de la Universidad Militar Nueva Granda. En el departamento de Cundinamarca, se muestrearon los municipios Silvania, Granada, Fuquene, Cajicá y Gacheta, y en el caso del departamento de Boyacá, se recolectó material en los municipios de Ventaquemada y Arcabuco. Para más información respecto a las características climáticas y del material recolectado en cada municipio, ver anexo 1.

3.3. FASE DE LABORATORIO

3.3.1. OBTENCIÓN Y AISLAMIENTO DE LAS RIZOBACTERIAS

A partir de las muestras preservadas de cada planta, se tomaban trozos de raíces junto con el suelo adherido a estas, hasta completar 10 gramos de muestra. Estos 10g, se disponían en 9 ml de Agua Destilada Estéril (ADE) agitándose por media hora en un agitador orbital a 120 rpm.

Para seleccionar rizobacterias del género *Bacillus*, la mitad de la suspensión se sometió a un choque térmico durante 10 minutos a 80°C, con el fin de causar la muerte de bacterias no formadoras de esporas. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-4} sembrando por duplicado en superficie 100 µL de cada una en Agar Nutritivo (AN). Las siembras se incubaron a una temperatura de 25°C por 48 horas.

Para la otra mitad de la suspensión original, se llevó a cabo diluciones seriadas hasta 10^{-4} sembrando 100 µL de cada dilución por duplicado en medio Agar Nutritivo (AN), con el fin de obtener bacterias de otros géneros como *Pseudomonas* (Cuyas densidades poblacionales son generalmente altas en el suelo). Las siembras al igual que para el género *Bacillus* fueron incubadas a 25°C por 48 horas.

Para los dos casos, las colonias de bacterias obtenidas en las siembras de las diluciones, eran purificadas mediante la técnica de aislamiento por agotamiento, sembrándolas en Agar Nutritivo, a fin de establecer cultivos axénicos.

Con el propósito de conservar por un tiempo prolongado las bacterias, colonias aisladas eran dispuestas en tubos eppendorf de 1 ml con caldo nutritivo (Contiene: Peptona carne y Extracto carne) más glicerol (Relación 70:30, respectivamente) almacenándolas a -20 °C.

3.3.2. ACTIVACIÓN HONGOS Y BACTERIAS

El material biológico (hongo y bacterias) utilizado en este trabajo, se encontraba conservado a -20°C en el cepario del Laboratorio de Fitopatología de la UMNG, por lo cual, previo a su utilización en las diferentes pruebas, se debía activar.

En el caso de *Fusarium oxysporum*, se empleó para este estudio, el aislado G1. Este aislado demostró, en estudios anteriores, ser el más patogénico y uno de los más rápidos en causar síntomas de marchitez en plantas de uchuva de los que se encuentran preservados en el cepario del laboratorio (Sánchez & Forero, 2009). Para su recuperación, se cortó un trozo del papel de filtro del monospórico de este aislado y se colocó en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) durante 6 a 7 días a 25°C.

En el caso de las bacterias, estas eran activadas individualmente al raspar y sembrar por agotamiento, un poco del medio líquido de conservación congelado en los tubos eppendorf sobre Agar Nutritivo, dejando crecer la bacteria por 48 horas.

3.3.3. OBTENCIÓN INÓCULO BACTERIANO

Para las pruebas de antagonismo *in vitro* tipo II, ensayos de germinación y pruebas de antagonismo *in vivo*, era necesario obtener una suspensión bacteriana de 1×10^8 UFC.ml⁻¹, para lo cual se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

Cada bacteria, era activada a partir del cepario como se mencionó en la sección anterior. Una colonia de la bacteria en AN, se sembraba previamente en caldo nutritivo (Contiene: Peptona carne y Extracto carne), dejándola crecer toda la noche (overnight) en agitación, a 120 rpm y temperatura ambiente. Al día siguiente, la suspensión se centrifugaba a 5500 rpm por 20 minutos, resuspendiendo el pellet (bacteria) en ADE (para el caso de las pruebas de antagonismo *in vitro* tipo II) ó PBS (para el caso de los ensayos de germinación y

pruebas de antagonismo *in vivo*) y ajustando la concentración a 1×10^8 CFU/ml, por medio de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 625 nm.

3.3.4. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTAGONISTA *IN VITRO*

3.3.4.1. PRUEBAS ANTAGONISMO TIPO I

Para determinar de manera rápida que cepas presentaban actividad antagónica *in vitro* contra *F. oxysporum* (G1), se realizaron pruebas de antagonismo tipo I para 123 rizobacterias presentes en la colección del laboratorio de Fitopatología de la Universidad Militar Nueva Granada.

Las pruebas de antagonismo tipo I, consistieron en realizar un cultivo dual en PDA del hongo y la bacteria simultáneamente. De este modo se tomaron dos discos de la zona activa de crecimiento del hongo en PDA, de 4 mm de diámetro por 2 mm de altura, y se situaron en dos extremos opuestos de una caja de Petri. Posteriormente, se inoculó la bacteria, a partir de una colonia aislada en Agar Nutritivo (AN), en forma de una línea central, equidistante a los discos del hongo sembrados (Figura 1).

Como control negativo se utilizó agua destilada estéril en substitución de la bacteria. Este experimento se repitió 2 veces, tomando la mitad de la caja como una réplica. Estos sistemas fueron incubados durante 12 días a temperatura ambiente, y al término se midió la distancia del borde del micelio al borde posterior del disco del hongo sembrado.

Estos valores se utilizaron posteriormente para determinar el porcentaje de inhibición, empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = (1 - (\text{Crecimiento del hongo en el tratamiento} / \text{Crecimiento del hongo en el Control})) \times 100$$

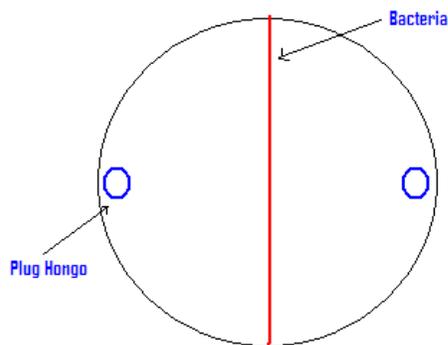


Figura 1. Esquema de cultivo dual para prueba de antagonismo *in vitro* tipo I. Línea roja, inóculo bacteriano. Círculos azules son los discos del hongo.

3.3.4.2. PRUEBAS DE ANTAGONISMO TIPO II

Para confirmar y determinar de forma más adecuada la actividad antagónica de las rizobacterias aisladas, se estableció que las cepas que presentaran porcentajes de inhibición iguales o superiores al 27% en las pruebas tipo I, se sometieran a pruebas de antagonismo tipo II por medio de cultivos duales simultáneos de las bacterias con *F. oxysporum* (G1), como se describe en Montealegre y colaboradores (2003).

Para cada cepa se realizó el siguiente procedimiento: en el centro de una caja de Petri con medio PDA, fue colocado un disco, de 4 mm de diámetro por 2 mm de altura, obtenido de la zona activa de crecimiento del hongo en PDA.

La bacteria se inoculó describiendo una circunferencia en el lugar de inoculación del hongo, con un diámetro de 6 mm, esto se logró haciendo una impronta al sumergir la tapa de una caja de Petri de 6 mm de diámetro en la suspensión bacteriana, 1×10^8 UFC/ml, e inoculando con ella al medio. (Figura 2).

Como control negativo se utilizó agua destilada estéril en substitución de la suspensión bacteriana. Este experimento se repitió 8 veces. Estos sistemas fueron

incubados durante 12 días a temperatura ambiente, y al término se midió el diámetro de la colonia de cada hongo, obtenido a partir del promedio de cuatro medidas, de manera tal que cubrieran toda la circunferencia de crecimiento.

Estos valores se utilizaron posteriormente para determinar el porcentaje de inhibición, empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = (1 - (\text{Crecimiento del hongo en el tratamiento} / \text{Crecimiento del hongo en el Control})) \times 100$$

Adicionalmente, se llevo a cabo un conteo de conidias por cada caja, con el fin de determinar un posible efecto de las bacterias sobre la producción de las mismas por parte de *F. oxysporum* (G1). Para ello, una vez finalizada la medición del diámetro de la colonia de los hongos, se colectó el micelio y se le añadieron 10 ml de ADE, procediendo a desprender las conidias mecánicamente con una asa bacteriológica estéril.

Las conidias se colectaron en un tubo de ensayo, junto con los 10 ml de ADE esta suspensión fue sometida a la acción de un vórtex durante 10 segundos para homogenizarla, luego se tomaron 3 muestras para realizar el conteo de conidias en la cámara de Neubauer. Se determinó el número de conidias por mL⁻¹ y el número de conidias por cm⁻² de micelio.

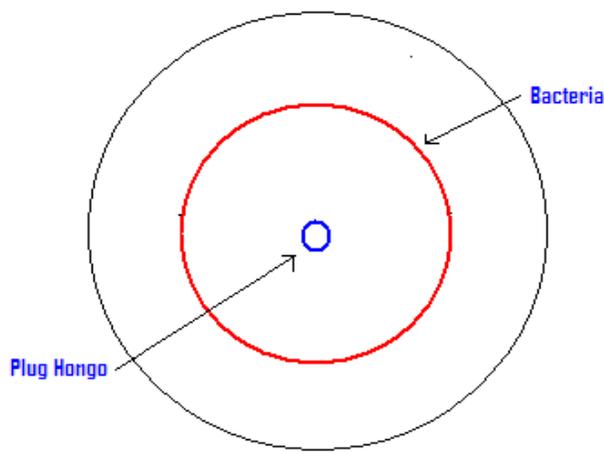


Figura 2. Esquema de cultivo dual para prueba de antagonismo *in vitro* tipo II. Círculo rojo, inóculo bacteriano. Círculo azul, disco hongo.

3.3.5. ENSAYOS DE GERMINACIÓN

Con el fin de observar un posible efecto de las rizobacterias sobre la germinación de semillas de uchuva, en términos de emergencia de la radícula, se seleccionaron las cepas que presentaron los mayores niveles de porcentaje de inhibición sobre el crecimiento de *F. oxysporum* en las pruebas de antagonismo *in vitro* tipo II.

Para estos ensayos, se dispusieron 40 semillas de uchuva por 3 réplicas para cada tratamiento (cepa). Las semillas fueron embebidas por 24 horas en las suspensiones bacterianas respectivas, a una concentración de 1×10^8 UFC.ml⁻¹, previo al montaje; mientras que en el caso del control, la suspensión fue reemplazada por buffer de fosfatos salino (PBS, por sus siglas en inglés).

Posteriormente, las semillas fueron dispuestas en cámaras de germinación (con papel toalla húmedo), y ubicadas dentro del laboratorio en una zona que pudieran ser alcanzadas por la luz natural (Figura 3).

Con el fin de determinar el efecto de las rizobacterias sobre la germinación de las semillas de uchuva, durante 30 días, se tomaron dos variables a medir: porcentaje de germinación y el Valor de Germinación (ó GV, por sus siglas en ingles: Germination Value). El Valor de Germinación, toma en cuenta la tasa de germinación y el porcentaje de germinación a través de la siguiente fórmula:

$$GV = PV \times MDG$$

Donde GV (Germination Value), es el producto de PV (Peak Value: porcentaje de germinación a la cual la curva de germinación empieza a disminuir dividido por los días en alcanzar ese valor) y MDG (Mean Daily Germination: Porcentaje de germinación final dividido entre los días en alcanzar dicho valor) (Hartmann *et al.*, 2002).

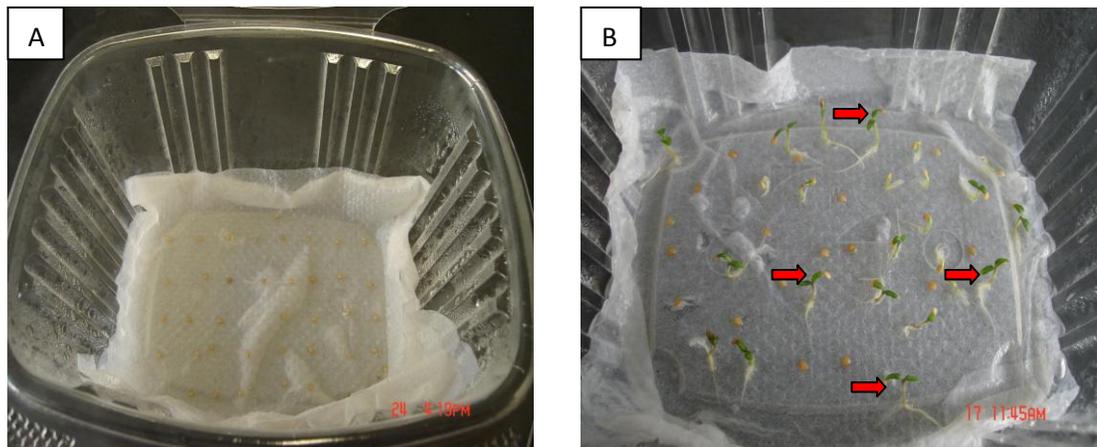


Figura 3. Cámaras de germinación empleadas para las pruebas. **A.** Se disponían 40 semillas por cámara para los diferentes tratamientos y control. **B.** Proceso de germinación de las semillas, flechas rojas señalan algunas plántulas con dos hojas cotidelonares.

3.4. FASE DE INVERNADERO

3.4.1. PRUEBAS ANTAGONISMO *IN VIVO*

Las bacterias que presentaron un mayor porcentaje de inhibición del crecimiento y esporulación del hongo, en las pruebas de antagonismo *in vitro* tipo II, fueron seleccionadas para ser probadas en fase de invernadero en plantas de uchuva con suelo infestado de *F. oxysporum* (G1).

De manera general, los ensayos consistieron, en pregerminar las semillas de *P. peruviana* en presencia de las rizobacterias seleccionadas, e inocular dichas bacterias durante la fase de semillero, antes de enfrentar las plantas con *F. oxysporum*. Procedimiento que se describe a continuación:

- Plántulas con hojas cotidelonares extendidas obtenidas de los ensayos de germinación en presencia de las bacterias, fueron pasadas a semilleros con turba estéril, donde se mantuvieron por 2 meses y 15 días. Durante el tiempo en semillero, las plántulas fueron inoculadas 3 veces (a los 4, 38 y 68 días de trasplantadas) con las cepas respectivas, a una concentración de 1×10^8 UFC.ml⁻¹. En el caso del control positivo y negativo, la suspensión bacteriana fue reemplazada por PBS únicamente. Las suspensiones bacterianas fueron aplicadas a capacidad de campo del alvéolo del semillero (Aprox. 10 ml). Durante esta fase, las plántulas se irrigaron por aspersion, con un periodo de 10 segundos cada hora, fertilizándolas una vez por semana con triple 15, a partir de los 35 días de trasplantadas.
- Después de la fase de semillero, las plántulas fueron trasplantadas a materas con suelo (consiste en tierra con cascarilla, en proporción 2:1 respectivamente) que tenía incorporado *Fusarium oxysporum* (G1); previamente preparado empleando la metodología Chaff-Grain para

producción de inóculo para patógenos del suelo (Ver sección 3.4.1.1.). Las plantas se mantuvieron bajo invernadero, durante 23 días, regándolas manualmente día de por medio y fertilizándolas semanalmente con triple 15 a lo largo del mismo.

Por cada cepa evaluada y controles positivo (Sin bacteria, con hongo) y negativo (Sin bacteria, sin hongo), se llevaron a cabo tres réplicas con 8 plantas cada una, distribuyéndose las materas en el invernadero en bloques completos al azar.

Para determinar el efecto de las rizobacterias inoculadas sobre la patogenicidad de *F. oxysporum* (G1) y el avance de la enfermedad en plantas de uchuva, se registró diariamente la incidencia y la severidad durante 23 días, esta última en términos de porcentaje, mediante la fórmula $S = (\sum nv/3N) * 100$:

Donde severidad (S), es igual a la sumatoria de los productos entre el número de plantas (n) en cada grado de severidad (v) por réplica, dividido entre el producto del número total de plantas (N) en cada réplica por tres (3).

Las áreas bajo la curva (calculado por medio del programa estadístico R) para el progreso de la severidad e incidencia, sirvió como medida de comparación entre los tratamientos y control (+).

3.4.1.1. PREPARACIÓN INÓCULO *F. OXYSPORUM* (G1)

Para infectar el suelo de las materas con el hongo fitopatógeno, se empleó el medio Chaff- Grain de preparación de inóculo de patógenos del suelo, descrito en Leslie & Summerell (2006). Este consiste en poner a crecer el hongo en un medio natural previamente estéril, para este caso se emplearon semillas de Trigo, inoculadas con una suspensión de conidias de 1×10^5 Conid.ml⁻¹, a una proporción

de 2 ml de suspensión por 250 ml de Trigo. El material inoculado se incubó a temperatura ambiente durante 18 días, tiempo al cual, micelio había colonizado gran parte del sustrato natural.

Posteriormente, el material se sacó de los containers y se dejó secar durante 24 horas, para ser molido y almacenado a 4 °C. Previo al trasplante en materas, el suelo estéril se mezcló con el medio Chaff- Grain molido, a una tasa de 4% del volumen final, que para el caso de las materas empleadas, las cuales se llenaron con un volumen total de suelo de 1,165 Litros, fue de aproximadamente 46.6 ml de medio Chaff-Grain por matera.

3.4.2. REGISTRO CRECIMIENTO

Otra media de la salud de la planta, son los parámetros de crecimiento, por lo cual, en primer lugar se registró el área foliar y longitud del tallo a los 8 días del trasplante previo al proceso de infección, con el fin de evidenciar algún efecto de las rizobacterias seleccionadas, sobre el desarrollo de las plantas.

Para lo anterior, por tratamiento y control, se tomaron tres plantas al azar por repetición, a las cuales, se les midió la longitud del tallo y área foliar. En el caso específico de esta última, se midió el largo y ancho en dos hojas extendidas (una superior y otra inferior), calculando el área mediante una aproximación geométrica a la superficie de la hoja (Figura 4)

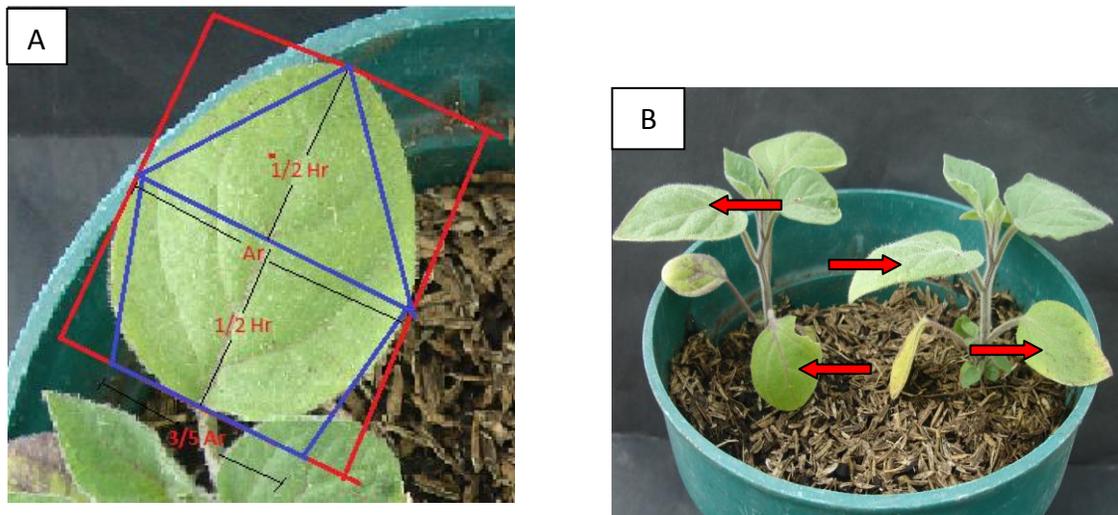


Figura 4. Esquema de la toma de datos para el área foliar. **A.** Aproximación geométrica para el cálculo del área foliar, a partir del largo (Hr) y ancho (Ar) de cada hoja. **B.** Se señalan por medio de las flechas rojas, las hojas utilizadas para el cálculo del área foliar en cada planta muestreada.

En segundo lugar, al final del experimento, se llevó a cabo un muestreo destructivo para obtener el peso seco de las plantas, tanto de las enfermas como de las sanas, como una medida de crecimiento y desarrollo bajo condiciones de enfermedad.

Para este caso, se tomaron la totalidad de las plantas en los tratamientos con las rizobacterias y los controles, las cuales se extrajeron de las materas, se les eliminó el exceso de suelo de las raíces por medio de un lavado con agua y se prensaron en hojas de papel periódico, para un secado posterior a 60°C en un horno. Cuando las plantas estaban totalmente secas, se pesó por separado la parte aérea de la planta y la raíz.

3.5. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

Para el caso de las cepas que mejores resultados mostraron en las pruebas de antagonismo *in vitro* tipo II, y que fueron probadas en los ensayos *in vivo* en plantas de uchuva, se les llevó a cabo una identificación molecular hasta género. Este procedimiento se realizó en el laboratorio LAMFU de la Universidad de los Andes, con la colaboración de la bióloga e investigadora Luisa Fernanda Cabezas.

3.5.1. EXTRACCIÓN DE ADN, PCR Y SECUENCIAMIENTO

Para las cepas seleccionadas, el ADN total fue obtenido al diluir una colonia aislada en 100µL de ADE. La sección 16S del ADN ribosomal (rDNA, por sus siglas en inglés), fue amplificado por PCR del ADN total usando los primers con la secuencia 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3'). La amplificación por PCR fue llevada a cabo en un volumen final de 25µl de reacción, con unas condiciones de 1X flexi buffer 2.5 Mm de Flexi buffer, 10mM de dNTP, 0,2µm de primers forward y reverse, y 1.25U de GoTaq® DNA Polymerase (Promega, Madison, WI), empleando 1µl de ADN total. Los productos de PCR, fueron secuenciados en un secuenciador automatizado ABI Prism 3730XL.

3.5.2. ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Las secuencias obtenidas de la región 16S rDNA, fueron ensambladas con el software (Workbench) CLC Genomics Workbench v.3.6.1 (CLC bio, Denmark) y fueron comparadas con secuencias conocidas en GenBank (Benson, *et al.*, 2000) con el algoritmo de BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.* 1997). Las secuencias de genes de la región 16S rRNA, fueron asignadas también al consistente filogenético de alto-orden para taxonomía, usando la versión clasificadora 2.0 de Naive Bayesian rRNA, Julio 2007 del Proyecto de Base de Datos Ribosomal (RDP, por sus siglas en inglés) (Wang *et al.*, 2007). El grupo de secuencias de la región 16S rDNA fueron alineadas empleando NAST (DeSantis

et al. 2006) para clasificación taxonómica con la base de datos Greengenes (DeSantis *et al.* 2006; Schloss & Handelsman 2006).

3.6. ANALISIS ESTADÍSTICO

Los datos en su conjunto, provenientes de las pruebas de antagonismo *in vitro* tipo II, antagonismo *in vivo* y de crecimiento, fueron analizados en el programa estadístico R, llevando a cabo primero un ANOVA con una probabilidad de 0.05, y posteriormente una prueba de Tukey de comparación múltiple HSD (Honestly Significant Difference) con una probabilidad de 0.05. Como unidades experimentales a comparar, se tomó, para las pruebas *in vitro*, cada caja de cultivo dual, mientras que en los ensayos de antagonismo *in vivo* así como para el crecimiento las unidades experimentales fueron cada réplica.

4. RESULTADOS

Del material recolectado en campo, se obtuvo a partir de la rizósfera de plantas de uchuva, un total de 242 aislamientos de rizobacterias, las cuales fueron conservadas a -20°C en el cepario del laboratorio de fitopatología de la Universidad Militar Nueva Granada (UMNG).

4.1. PRUEBAS DE ANTAGONISMO *IN VITRO*

4.1.1. PRUEBAS DE ANTAGONISMO *IN VITRO* TIPO I

A 123 cepas aisladas de la rizósfera de uchuva, se les llevó a cabo pruebas de antagonismo tipo I, con el fin realizar una selección inicial de rizobacterias con actividad antagónica frente a *F. oxysporum* (G1). De manera general, se obtuvieron diferentes niveles de inhibición (Figura 6, Anexo 2), los cuales se agruparon en 12 clases (Figura 5). Se observa una tendencia en cuanto al menor número de cepas conforme aumenta el porcentaje de inhibición, por lo cual se presenta una mayor cantidad de rizobacterias en las primeras clases y un menor número en las últimas.

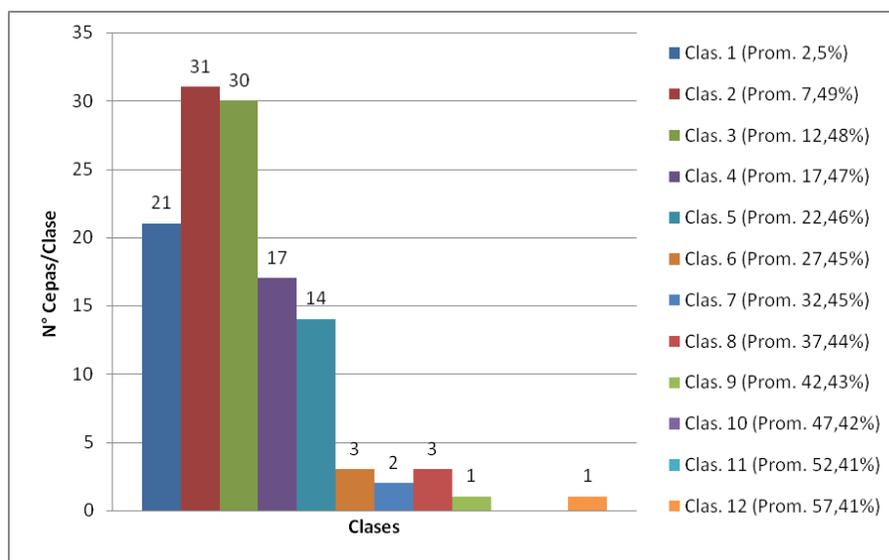


Figura 5. Distribución de 123 rizobacterias de uchuva respecto al porcentaje de inhibición contra *F. oxysporum* (G1), en 12 clases. **Prom.**, promedio del % de inhibición para cada clase. Para ver los porcentajes de inhibición de cada cepa, ver anexo 2.

Como consecuencia de la distribución, se determinó un porcentaje de 27% (calculado con base en el promedio de la clase 6), como umbral mínimo de selección de las rizobacterias para posteriores pruebas. De este modo, 9 cepas, igualaron o superaron dicho porcentaje (Tabla 1).

Tabla 1. Rizobacterias de uchuva elegidas para posteriores pruebas, al superar el umbral mínimo de selección (27%).

Cepa	%Inhibición*
B-1.4	43,023
B-2.1.3	55,813
B-2.8	37,209
B-3.4	38,372
B-3.5	36,046
B-2.13 E	32,558
B-3.10 E	29,069
A-19	30,232
A-51	27,906

*Porcentaje de inhibición, es el resultado del promedio de 4 réplicas

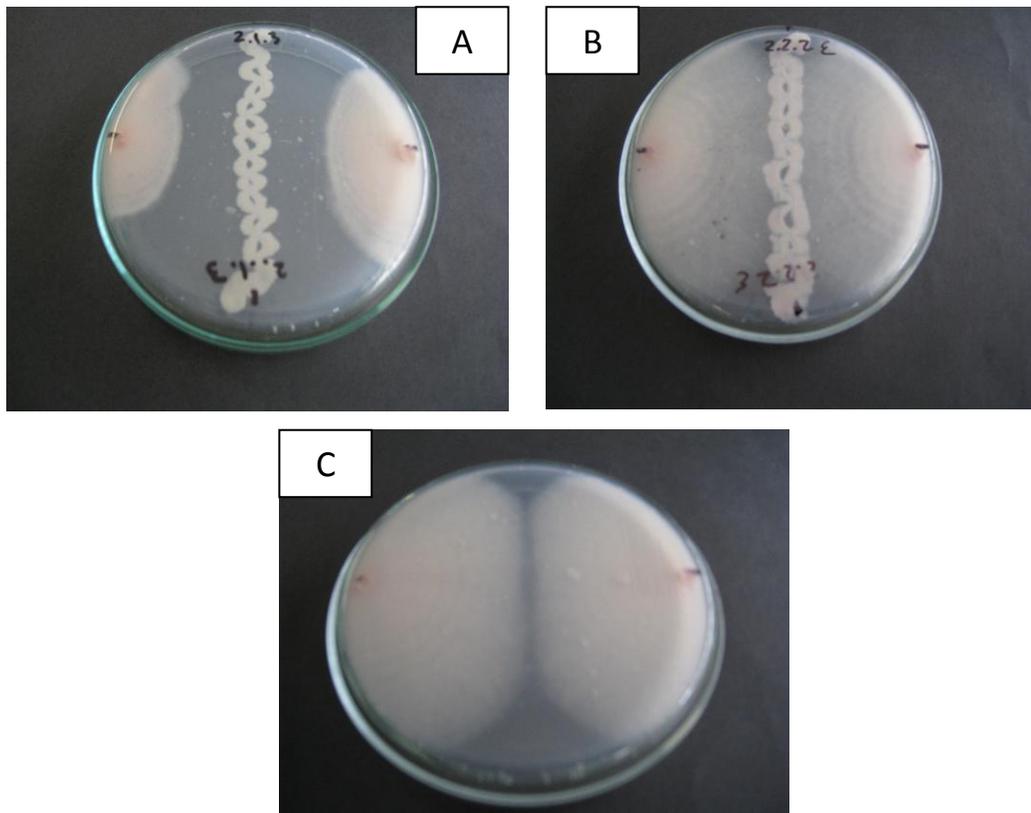


Figura. 6. Ejemplo de dos pruebas de antagonismo tipo I, para las cepas B-2.1.3 **(A)** y B-2.2.2E **(B)**, con porcentajes de inhibición de 55.8 % y 9,302 % respectivamente, más el control **(C)**.

4.1.2. PRUEBAS DE ANTAGONISMO *IN VITRO* TIPO II

Las cepas seleccionadas B-3.10E, B-2.1.3, B-1.4, B-3.4, B-3.5, B-2.13E, B-2.8, A-51 y A-19 (Tabla 2), se sometieron a las pruebas de antagonismo tipo II, con el fin de determinar de manera más precisa el efecto de estas sobre el crecimiento y esporulación de *F. oxysporum* (G1).

Tabla. 2. Origen de las cepas seleccionadas para las pruebas de antagonismo *in vitro* tipo II.

Cepa	A-19	A-51	B-3.4	B-3.5	B-2.1.3	B-1.4	B-2.13E	B-3.10E	B-2.8
Departamento	Cundi*	Boyacá	Cundi*	Cundin*	Cundi*	Cundi*	Cundi*	Cundi*	Cundi*
Municipio	Gacheta	Ventaquemada	Silvania	Silvania	Granada	Granada	Granada	Silvania	Granada
Finca	Silvestre**	“La Playa”	“La Esperanza”	“La Esperanza”	“La Palmera”	“El Rodeo”	“La Palmera”	“La Esperanza”	“La Palmera”

*Cundinamarca

**Cepa proveniente de una planta no perteneciente a un cultivo.

La tabla 3 y la figura 7 muestran que, las rizobacterias seleccionadas para la prueba, la inhibición resultó variable, más sin embargo, todas presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto al control. Un primer grupo conformado por las cepas A-51, B-2.8 y B-3.10E, mostraron el menor nivel de inhibición, oscilando entre 15,529% y 31,453%, como se evidencia visualmente en la figura 8. Un segundo conjunto, compuesto por las cepas B-2.1.3, B-2.13E, B-1.4 y A-19, presentaron porcentajes de inhibición entre 41,467% y 46,791%. Por último, las rizobacterias B-3.4 y B-3.5, mostraron el mayor grado de inhibición, con valores entre 56,530 % y 58,688 %, hecho que se observa en la figura 8.

Tabla. 3. Efecto de 10 rizobacterias sobre el crecimiento y esporulación *in vitro* de *F oxysporum* (G1), después de 12 días de cultivo dual.

Tratamiento	Diámetro*** (cm)	% Inhibición*	N°Conid.ml ⁻¹ *	N°Conid.cm ⁻² *
B-3.10 E	7,486	15,529 ^d	4573750 ^{bc}	1039204,329 ^e
B-2.1.3	4,716	46,791 ^b	2831250 ^{cde}	1624425,13 ^{de}
B-1.4	4,812	45,698 ^b	1791875 ^e	1040085,16 ^e
B-3.4	3,6612	58,688 ^a	2543750 ^{de}	2432118,628 ^{bc}
B-3.5	3,852	56,530 ^a	2328750 ^{de}	2010683,897 ^{bcd}
A-08**	8,487	4,231 ^e	5839062,5 ^b	1032466,188 ^e
A-51	6,075	31,453 ^c	3234375 ^{cde}	1117114,135 ^e
A-19	5,187	41,467 ^b	3809375 ^{cd}	1802289,496 ^{cd}
B. 2.13 E	4,7193	46,749 ^b	4416562,5 ^{bc}	2540358,954 ^{bc}
B. 2.8	7,325	17,348 ^d	12973437,5 ^a	3098545,744 ^a
Control	8,862	0 ^e	13131250 ^a	2134029,765 ^{bcd}

*Diferentes letras representan diferencias significativas de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de Tukey HSD (Honestly Significant Difference) con una probabilidad de 0.05.

**Rizobacteria de uchuva, que presento un % de inhibición de 0%, en las pruebas de antagonismo tipo I. Se toma como control (+), para los otros tratamientos.

***Diámetro de la circunferencia del micelio crecido sobre el medio, calculado a partir de 8 réplicas.

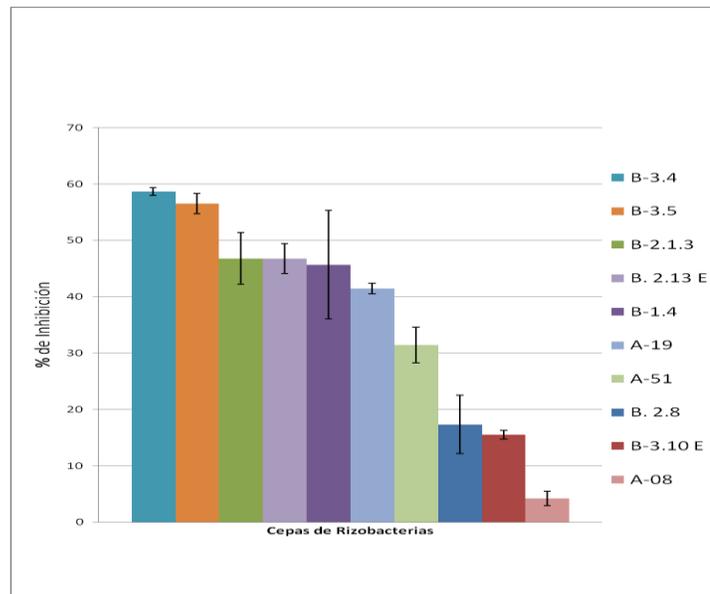


Figura 7. Porcentajes de inhibición obtenidos para las pruebas de antagonismo *in vitro* tipo II, de las cepas evaluadas, después de 12 días de cultivo. Se muestra el control con bacteria (A-08), el cual no presento diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) respecto al control sin bacteria.



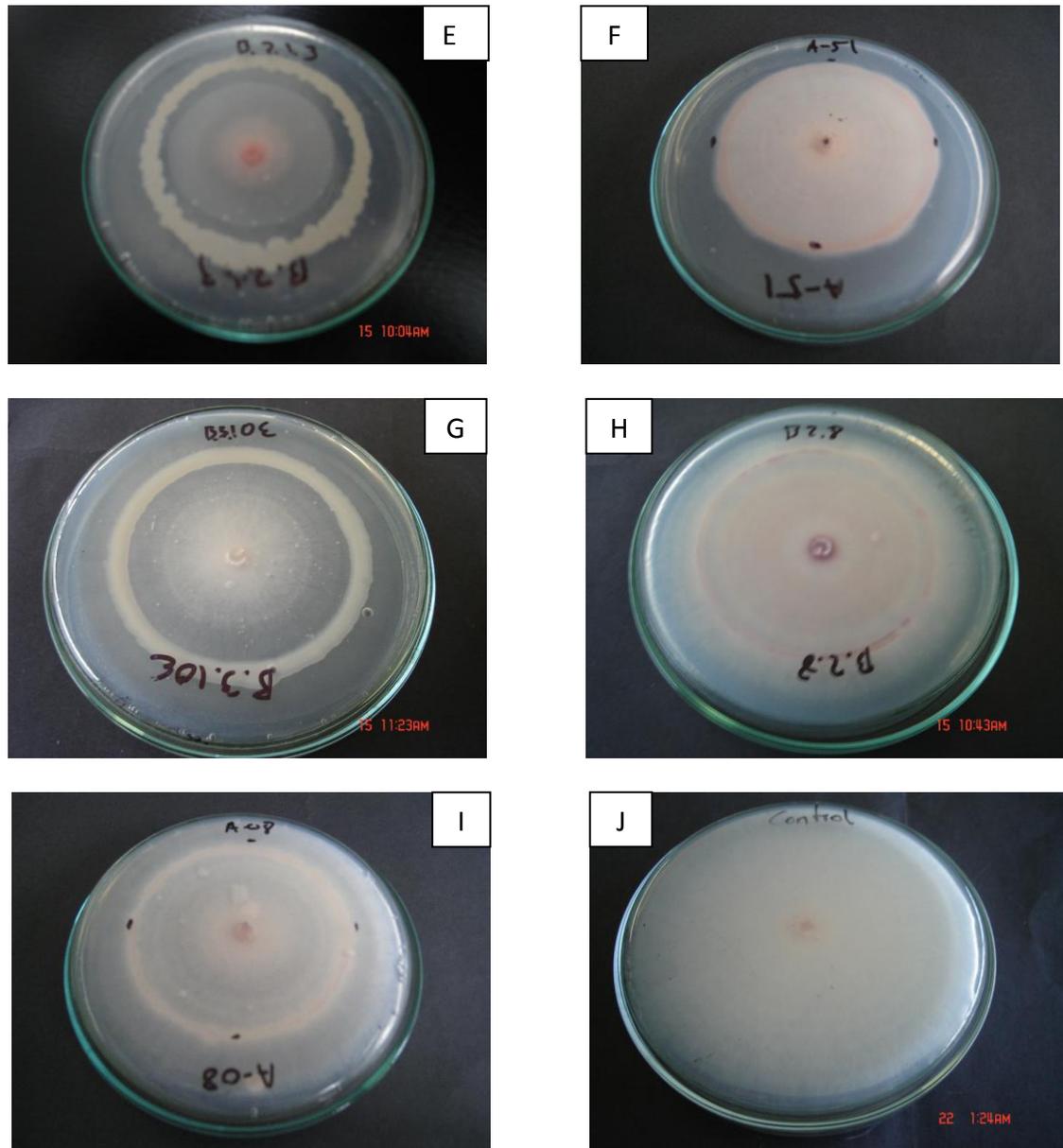
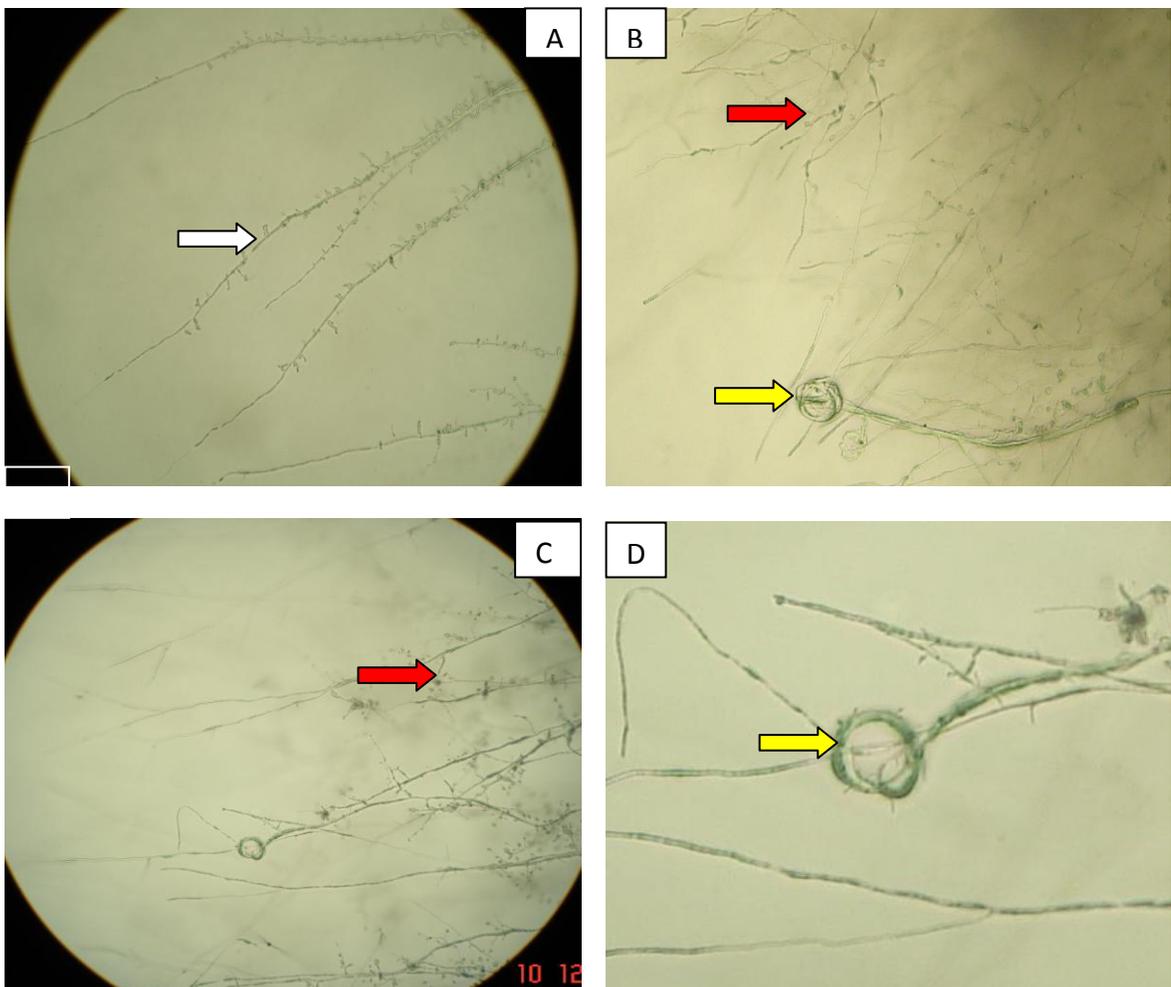


Figura. 8. Cultivos duales para las pruebas de antagonismo *in vitro* tipo II, después de 12 días de cultivo dual. Se muestran los tratamientos con las cepas B-3.4 (A), B-3.5 (B), B-1.4 (C), B-2.13E (D), B-2.1.3 (E), A-51 (F), B-3.10E (G), B-2.8 (H), A-08 (I) y el control (J).

El efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *F. oxysporum*, se evidenció también en la periferia o bordes de crecimiento activo del hongo, donde los metabolitos difusibles secretados por las bacterias entraban en contacto con el micelio. En el caso de las cepas que presentaron los mayores niveles de inhibición, como B-3.4, B-3.5, B-2.13E, B-1.4, A-19 y B-2.1.3, se observó que las hifas del hongo mostraban mayor ramificación en los bordes, pérdida de la orientación del crecimiento, y en algunos casos enrollamiento de las mismas (para el caso de las cepas B-3.4, B-3.5 y B-2.13E) (Figura 9). Contrario a lo anterior, cuando se observan los bordes del micelio del control y las bacterias con poco o ningún efecto inhibitorio bajo microscopio, las hifas se veían alargadas y derechas, con pocas ramificaciones y sin enrollamientos (Figura 9).



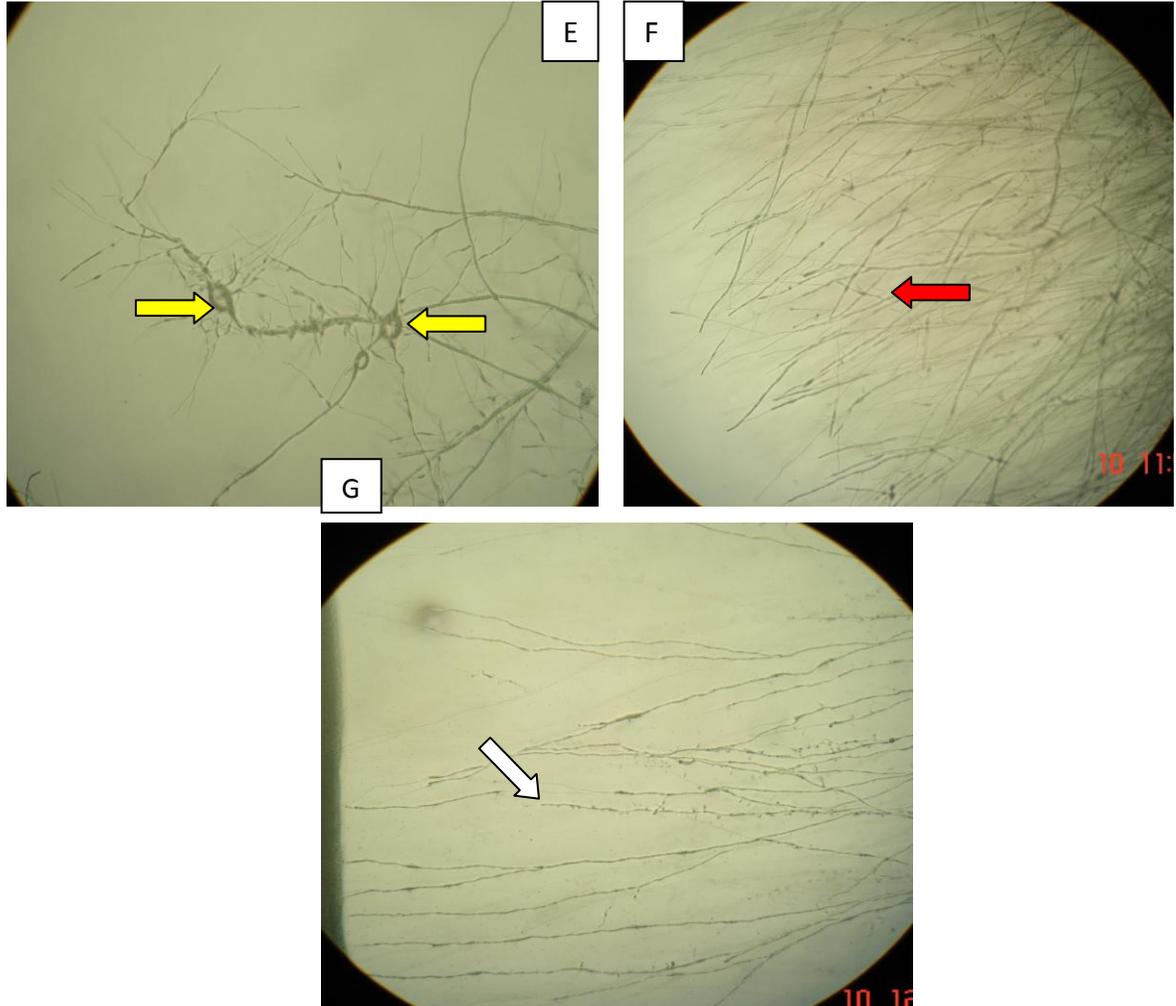


Figura 9. Análisis microscópico del efecto de las rizobacterias sobre el crecimiento *in vitro* de *F. oxysporum* (G1). Fotos tomadas en la periferia del micelio de algunos de los cultivos duales, con un aumento de 100X. **A**, Control. **B**, Cepa B-3.4, se observa enrollamiento y alta ramificación hifal. **C-D**, Cepa B-2.13E, se observa ramificación del micelio y una ampliación de una hifa enrollada. **E**, Cepa B-3.5, se observa dos enrollamientos de la hifa. **F**, Cepa B-2.1.3, se distingue alta densidad y ramificación de hifas, sin ningún enrollamiento de la misma. **G**, Cepa B-3.10E, no se distingue enrollamiento, y las hifas crecen derechas sin una gran ramificación de las mismas. Flechas rojas (Alta ramificación de las hifas), amarillas (enrollamiento de la hifa) y blancas (hifas alargadas con pocas ramificaciones).

Además de la influencia de las rizobacterias, sobre el crecimiento vegetativo de *F. oxysporum*, se evaluó también su efecto sobre la esporulación *in vitro* de este hongo fitopatógeno.

En primer lugar, se determinó el número de conidias por mililitro, como una medida aproximada de la producción total de microconidias por parte del micelio crecido en cada cultivo dual (Tabla 3 y Figura 10). En general, se obtuvo una disminución significativa ($P < 0.05$) en la producción de conidias por parte de los tratamientos que inhibieron el crecimiento del hongo, que para el caso de las cepas B-1.4, B-3.4, B-3.5, B-2.1.3 y A-51, fue aproximadamente de 5 veces respecto al control, siendo estos tratamientos los que mejores resultados mostraron para este parámetro. Se puede establecer otro grupo con valores cercanos, conformado por las cepas A-19, B-2.13E y B-3.10E, las cuales redujeron la producción de microconidias alrededor de 3 veces. La cepa B-2.8, no mostró diferencias significativas en la producción de conidias frente al control.

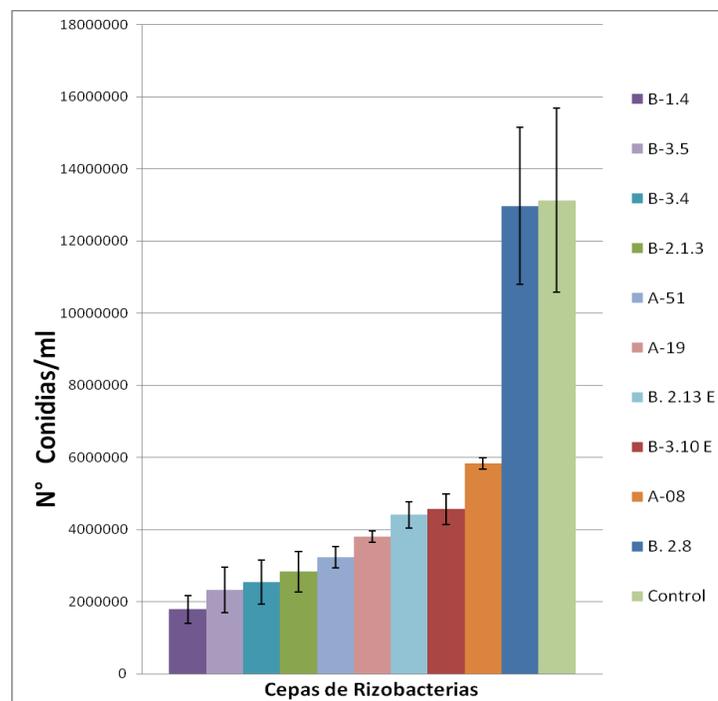


Fig.10. Efecto de 10 rizobacterias sobre la producción de esporas. ml^{-1} , *in vitro*, de *F. oxysporum* (G1), después de 12 días de cultivo dual.

En segundo lugar, a fin de ver el efecto de las cepas seleccionadas sobre la producción de conidias con respecto al área crecida de micelio sobre el medio, se calculó el número de conidias por cm^{-2} (Tabla 3 y figura 11). Las cepas A-08, B-3.10E, A-51 y B-1.4, presentaron los menores valores para este parámetro. En el caso de las cepas A-19, B-3.5, B-3.4, B-2.1.3 y B-2.13E, estas no presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto al control. La cepa B-2.8, mostró el mayor valor ($3098545,744 \text{ Conid.cm}^{-2}$), indicando un aumento en la producción de esporas. cm^{-2} de micelio.

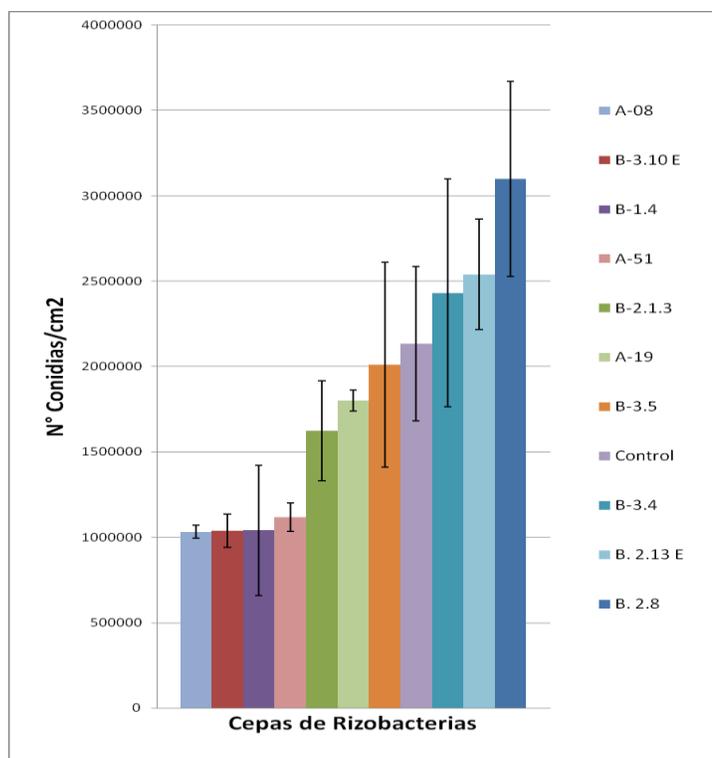


Figura 11. Efecto de 10 rizobacterias sobre la producción de conidias. cm^{-2} , *in vitro*, de *F. oxysporum* (G1), después de 12 días de cultivo dual.

4.2. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

De las rizobacterias que mostraron los niveles más altos de inhibición del crecimiento y esporulación de *F. oxysporum* (G1) *in vitro*, se escogieron cinco (A-19, B-2.1.3, B-1.4, B-3.4 y B-3.5), para realizar la identificación molecular y llevar a cabo los ensayos posteriores de germinación y antagonismo *in vivo* (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados de la identificación molecular para las cepas seleccionadas.

Cepa	A-19*	B-3.4**	B-3.5*	B-2.1.3*	B-1.4*
Género	<i>Bacillus</i> ó <i>Arthtobacter</i>	No identificada aún.	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>
NAST***	94,70	-----	98,50	97,56	97,49

*En el anexo 3, se muestran las secuencias de la región 16S del rADN con las que se llevaron a cabo los alineamientos e identificación molecular.

**No se obtuvieron secuencias.

***Resultado de los alineamientos. Se muestran los porcentajes de identidad con la secuencia patrón respectiva.

4.3. ENSAYOS DE GERMINACIÓN

Para establecer un efecto de las cepas seleccionadas (A-19, B-2.1.3, B-1.4, B-3.4 y B-3.5) y una combinación (A-19+B-2.1.3), sobre la germinación de las semillas de uchuva, se determinó y comparó el Valor de Germinación (GV, por sus siglas en inglés) y % de germinación final (Tabla 5).

Tabla 5. Efecto de cinco rizobacterias y una combinación, sobre la germinación de semillas de uchuva, durante un mes de seguimiento.

Tratamientos	GV ^y	% Germinación ^y	Coef. Variación. ^y (%) ^x
Control	6,145 ^a	60 ^a	7,21
A-19	4,890 ^a	55 ^a	22,72
B. 2.1.3	5,289 ^a	55 ^a	18,18
B.1.4	7,010 ^a	56,666 ^a	14,18
B.3.4	5,684 ^a	56,666 ^a	6,73
B.3.5	6,035 ^a	60,833 ^a	25,11
A-19+B.2.1.3	6,856 ^a	58,333 ^a	4,94

^x Se presenta el coeficiente de variación en términos de porcentaje para el porcentaje de germinación, indicando una alta variabilidad en los datos para este parámetro.

^y Diferentes letras representan diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey de comparación múltiple HSD (Honestly Significant Difference) con una probabilidad de 0.05.

Se encontró, que no se afectó ni mejoró ningún parámetro evaluado significativamente ($P < 0.05$), por parte de los diferentes tratamientos al compararlos contra el control (Tabla 5), obteniéndose a su vez, curvas de germinación similares (Figura 12). Sin embargo, es importante resaltar la alta variabilidad en los resultados, lo cual se evidencia con el coeficiente de variación de los datos tanto en los tratamientos como control, lo cual puede enmascarar algún efecto.

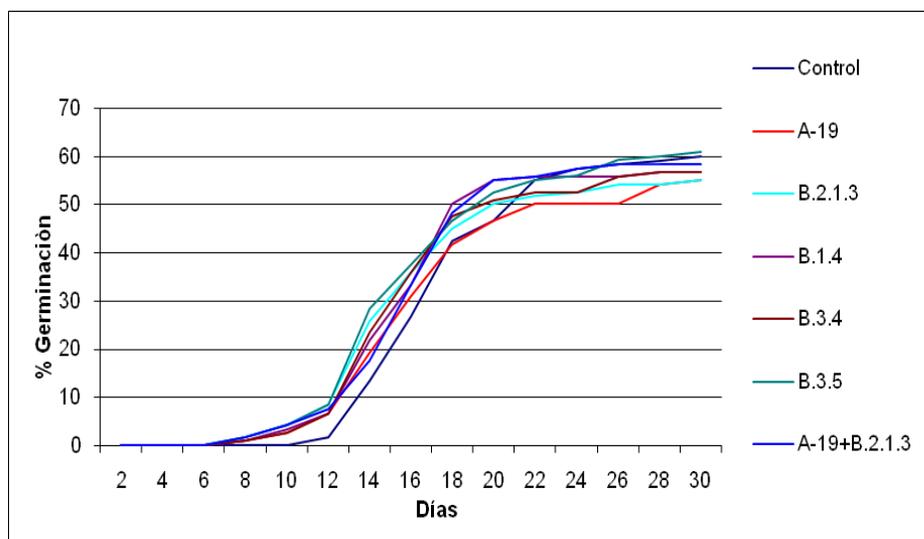


Fig. 12. Curvas de germinación de semillas de uchuva inoculadas con las rizobacterias seleccionadas y una combinación, durante 30 días de seguimiento.

4.4. PRUEBAS DE ANTAGONISMO *IN VIVO*

Para evaluar la capacidad biocontroladora de las rizobacterias seleccionadas (A-19, B-2.1.3, B-1.4, B-3.4 y B-3.5) y la combinación (A-19+B-2.1.3), plántulas de uchuva pregerminadas en presencia de las rizobacterias, e inoculadas en la etapa de semillero, se trasplantaron a materas (dispuestas bajo invernadero) que contenían suelo infestado con *F. oxysporum* (G1).

Después de 13 días, síntomas de marchitamiento vascular, como encopamiento foliar y epinastia, eran evidentes en el control (+) y en los tratamientos con las cepas B-3.5, B-2.1.3 y B-1.4. A los 16 días, los tratamientos A-19 y A-19+B-2.1.3, presentaron plantas con los primeros síntomas de marchitez. Por último, las plantas inoculadas con la cepa B-3.4, fueron las más demoradas en evidenciar los primeros síntomas, asociados a *F. oxysporum*, apareciendo estos, a los 18 días después del trasplante (Figura 13, anexo 4).

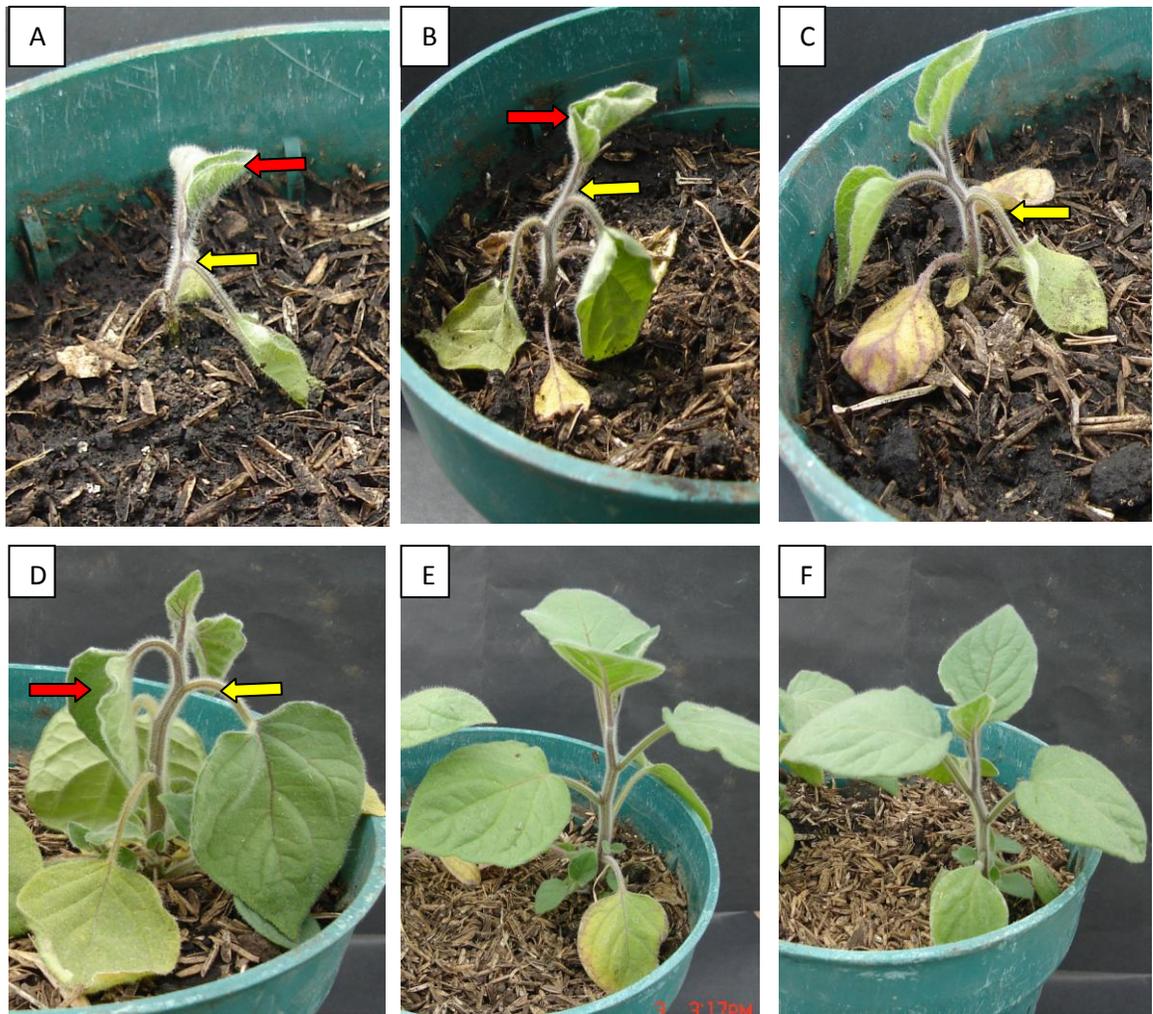


Figura 13. Comparación de plantas sanas y plantas con síntomas de marchitez vascular. **A-C**, Plantas enfermas del control (+), y los tratamientos con las cepas B-3.5 y B-1.4, respectivamente; a los 13 días de trasplante. **D**, Planta marchita inoculada con la cepa A-19, a los 16 días de trasplante. **E-F**, Plantas sanas inoculadas con la cepa B-3.4 y el control (-), respectivamente, a los 16 días de trasplantadas. Síntomas de marchitez vascular: encopamiento foliar (Flechas rojas), epinastia (Flechas amarillas).

4.4.1. INCIDENCIA

Durante 23 días, se registró el número de plantas enfermas (plantas con epinastia en los peciolo basales y/o apicales, así como encopamiento foliar), tiempo al cual, el total de las plantas del control (+) se habían enfermado en su totalidad.

Las curvas de progreso obtenidas, fueron de tipo logístico, evidenciándose diferencias entre los tratamientos y el control (+) (Figura 14, Anexo 4). El modelo de línea de tendencia que más se ajustó a las curvas, fue el polinómico.

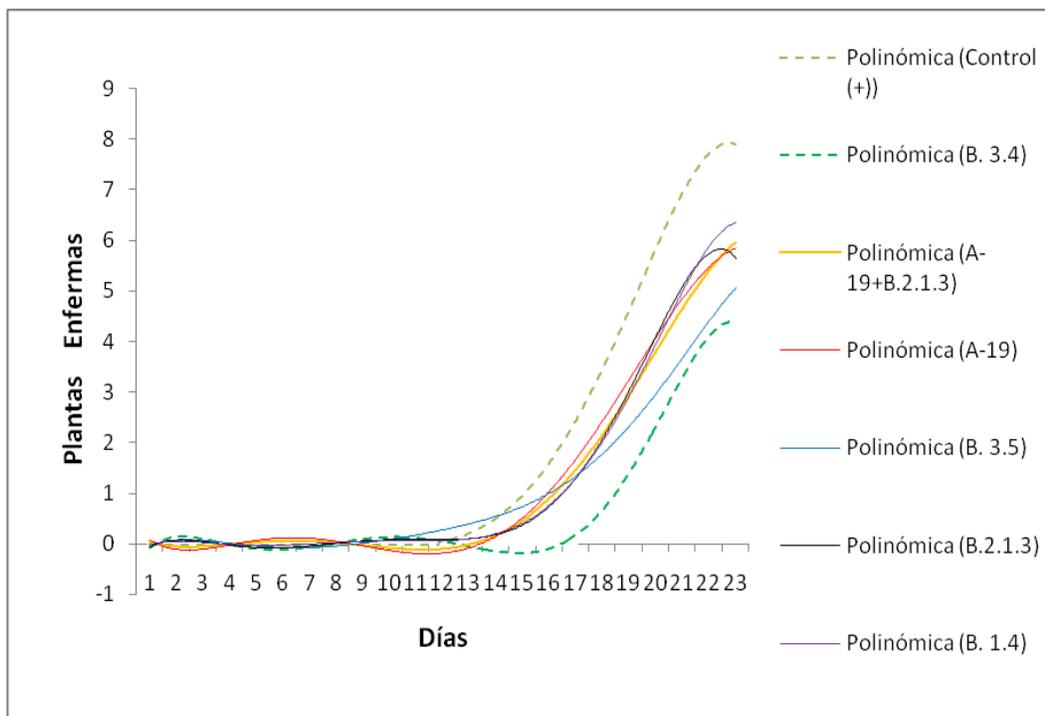


Figura 14. Curvas del progreso de la enfermedad para los 6 tratamientos con rizobacterias (B-3.4, B-3.5, B-1.4, B-2.1.3, A-19 y la combinación (A-19+ B-2.1.3) y el control (+). Las curvas representan la línea de tendencia con mejor ajuste a la curva de avance de enfermedad promedio (de tres repeticiones) para cada tratamiento y control.

Con el objetivo de comparar el efecto de las rizobacterias sobre la dinámica de la enfermedad causada por *F. oxysporum* en plantas de *P. peruviana*, se determinó, por medio del programa estadístico R, el área bajo la curva para el progreso de la incidencia, en los tratamientos con las cepas y el control (+). En términos generales, se presentó una disminución significativa ($P < 0.05$) para este parámetro, en todos los tratamientos respecto a este último (Tabla 6), indicando que la propagación de la enfermedad fue menor en los tratamientos con las rizobacterias

La cepa B-3.4, fue la más efectiva en contrarrestar el avance de la enfermedad, presentando el menor valor de área bajo la curva (13,833), siendo este, significativamente inferior ($P < 0.05$) al control (+) y demás tratamientos, retardando no solo la aparición de los primeros síntomas, si no también, la incidencia al final del experimento (en promedio 4 plantas enfermas de 8, por réplica) (Tabla 6, Figura 15, Anexo 4.).

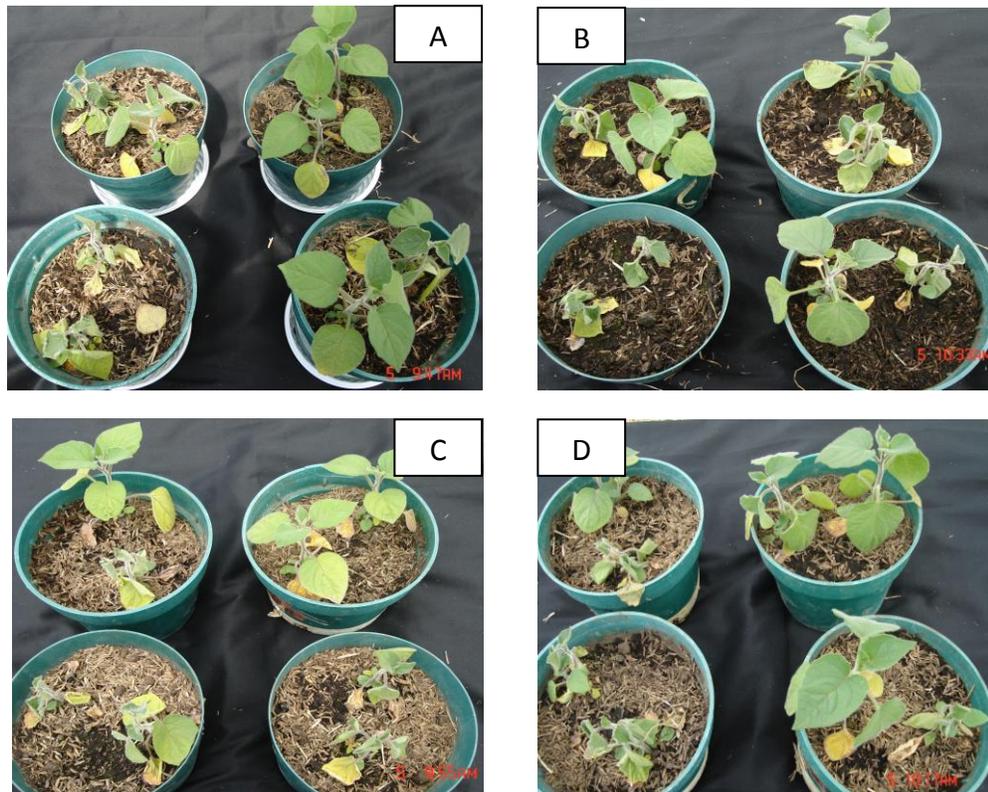
Las cepas B-1.4, B-3.5, B-2.1.3, A-19, y la combinación de estas dos últimas, conforman un grupo que no presentó diferencias significativas ($P < 0.05$) entre sí para el área bajo la curva, con valores que oscilaron entre 22,166 y 25,833, sin embargo presentan valores inferiores a los del control (+) (Tabla 6). Estas últimas cepas, en general, fueron menos eficientes en retrasar la aparición de los primeros síntomas en las plantas, encontrándose incluso, algunas que concordaron con las del control (+) (como fue el caso de B-1.4, B-3.5 y B-2.1.3); así mismo, la incidencia al final del experimento fue mayor, comparado con las tratadas con la cepa B-3.4, observándose en promedio de 5 a 6 plantas con síntomas de marchitez vascular (Figura 15 y Anexo 4).

Todas las plantas del control (+), al final de los 23 días, se enfermaron, presentando a su vez el mayor grado de enfermedad, con un valor promedio de área bajo la curva de 38, manifestándose además del mal estado fitosanitario por parte de las plantas, poco desarrollo vegetativo de las mismas (Figura 15, tabla 6.).

Tabla 6. Áreas bajo la curva para el progreso de la incidencia (ABCPI) de los tratamientos con las rizobacterias y control (+), después 23 días bajo invernadero.

Cepas	ABCPI*
Control (+)	38 ^a
B-3,4	13,833 ^c
A-19+B. 2.1.3	24,666 ^b
A-19	26 ^b
B. 3.5	22,166 ^b
B. 2.1.3	25,833 ^b
B. 1.4	25,833 ^b

* Diferentes letras representan diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey de comparación múltiple HSD (Honestly Significant Difference) con una probabilidad de 0.05.



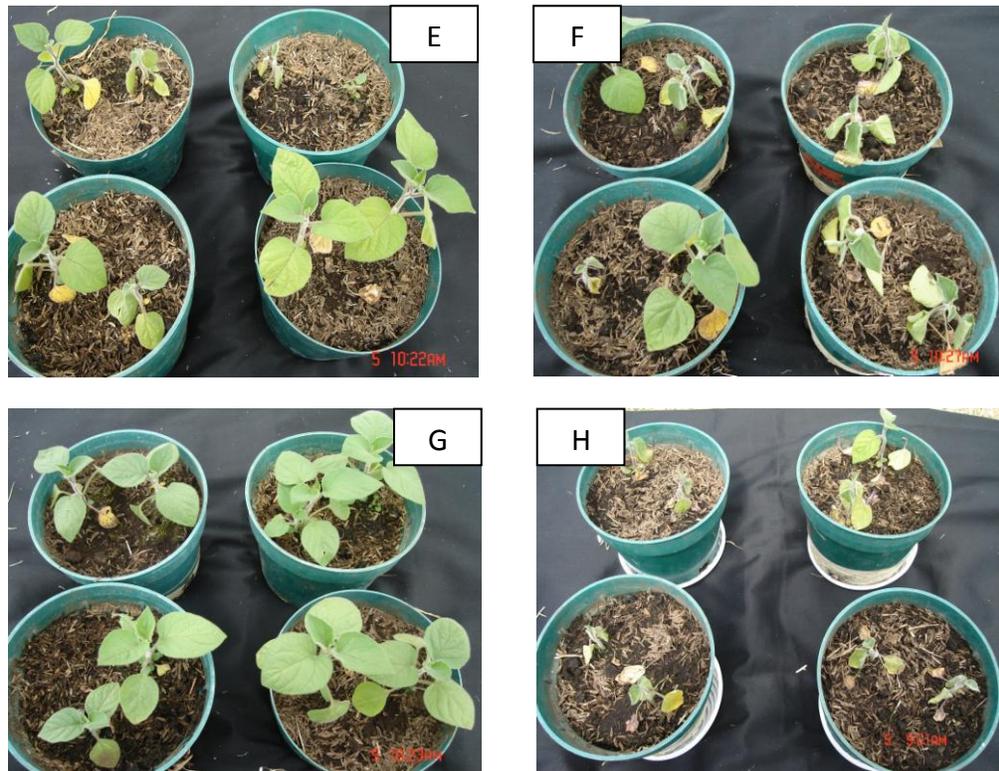


Figura 15. Plantas de *P. peruviana*, al final del experimento. Se muestra una réplica tomada al azar por tratamiento y control. Plantas inoculadas con las rizobacterias B-3.4 (A), B-1.4 (B), A-19+B-2.1.3 (C), A-19 (D), B-3.5 (E), B-2.1.3 (F) y los controles negativo (G) y positivo (H).

4.4.2. SEVERIDAD

Además del registro del número de plantas enfermas a través del tiempo, se quiso determinar el grado de afectación de la enfermedad sobre las mismas, teniendo en cuenta las plantas sanas y diferentes niveles de marchitez. De este modo, se realizó una escala simple de severidad de 3 grados, teniendo en cuenta las observaciones realizadas y la dinámica de la enfermedad que se presentó bajo invernadero:

GRADO (0): No se observan síntomas de marchitamiento. Plantas turgentes con hojas verdes extendidas,



Figura 16. Plantas de uchuva en grado cero de la escala de severidad.

GRADO (1): Plantas enfermas, con síntomas evidentes pero no tan acentuados de marchitez. Se presenta epinastia en los peciolos de las hojas en la parte basal y en ocasiones apical. Algunas hojas presentan encopamiento



Figura 17. Plantas de uchuva en grado 1 de la escala de severidad.

GRADO (2): Plantas con un grado de marchitez media. Se puede presentar abscisión de hojas. Encopamiento y epinastia en casi toda la planta, algunas hojas completamente caídas sobre el sustrato. Leve pérdida de turgencia en el tallo principal.



Figura 18. Plantas de uchuva en grado 2 de la escala de severidad

Grado (3): Pérdida completa de la turgencia. Amarillamiento presente en algunas hojas. Tallo principal inclinado y posterior muerte de la planta



Figura 19. Plantas de uchuva en grado 3 de la escala de severidad

Durante 23 días, posterior al trasplante, se registró la severidad (en términos de %) del ataque de *F. oxysporum* sobre las plantas de uchuva, observándose diferencias significativas ($P < 0.05$) en cuanto al progreso de esta, entre los tratamientos con las rizobacterias y el control (+) (Figura 20, Tabla 7).

Las plantas tratadas con la cepa B-3.4 fueron las menos afectadas por la enfermedad respecto a los demás tratamientos y control (+), presentando el menor porcentaje de severidad final (27.77%), así como el menor valor de área bajo la curva para el progreso de la misma (72.22) (Tabla 7, Anexo 5).

En el caso de los tratamientos con las rizobacterias B-1.4, B-3.5, B-2.1.3, A-19 y la combinación de estas dos últimas, estos no presentaron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre sí para el área bajo la curva de la severidad (valores entre 137.499 y 167.372), obteniéndose a su vez, curvas de progreso de la severidad similares (Tabla 7, Anexo 5).

Por otro lado, el control (+) presentó los valores más altos tanto para el porcentaje de severidad final (63.8%), como para el área bajo la curva (241,583), indicando que las plantas sin rizobacterias, fueron las más afectadas por la enfermedad. Lo anterior, se puede evidenciar visualmente en la figura 15, donde al término del experimento, se observa la mayoría de las plantas en grados altos de la escala (encontrándose algunas muertas, Anexo 5) en el control (+), frente a las plantas de los tratamientos con rizobacterias.

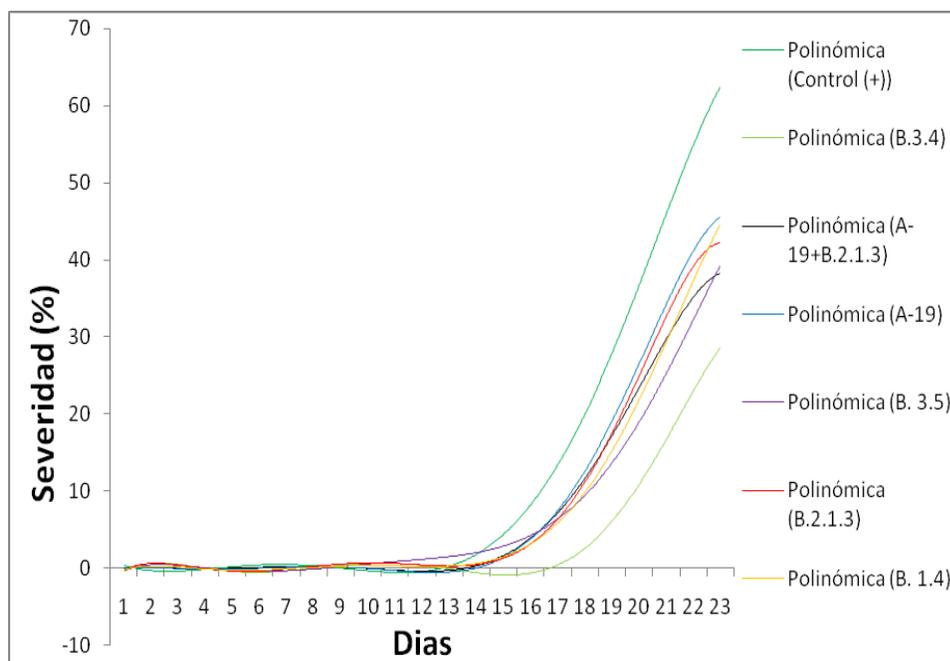


Figura 20. Curvas de progreso de la severidad, para los 6 tratamientos con rizobacterias (B-3.4, B-3.5, B-1.4, B-2.1.3, A-19 y la combinación B-2.1.3+A-19) y el control (+). Las curvas representan la línea de tendencia con mejor ajuste a la curva de progreso de la severidad promedio (de tres repeticiones) para cada tratamiento y control.

Tabla 7. Áreas bajo la curva del progreso de la severidad (ABCPS), de los tratamientos con las rizobacterias y control (+), durante 23 días bajo invernadero.

Tratamiento	ABCPS*
Control (+)	241,583 ^a
B-3,4	72,222 ^c
A-19+B-2.1.3	147,222 ^b
A-19	167,372 ^b
B-3.5	137,499 ^b
B-2.1.3	157,638 ^b
B-1.4	143,749 ^b

* Diferentes letras representan diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey de comparación múltiple HSD (Honestly Significant Difference) con una probabilidad de 0.05.

4.5. PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO

4.5.1. ÁREA FOLIAR Y LONGITUD DEL TALLO

Durante la fase de semillero y posterior al trasplante, se observó que las plantas tratadas con las rizobacterias seleccionadas (B-3.4, B-3.5, B-1.4, B-2.1.3, A-19 y la combinación B-2.1.3+A-19), presentaban un mejor porte, en cuanto a la altura y tamaño de las hojas, respecto a las plantas control (Figura 21). Por lo cual, se llevó a cabo una medición, del área foliar y longitud del tallo durante la fase bajo invernadero, a los 8 días de trasplantadas, con el fin de documentar el efecto de las rizobacterias sobre el crecimiento de las plantas previo al proceso de infección (Tabla 8).

Tabla 8. Efecto de 5 rizobacterias y una combinación, sobre el crecimiento de plantas de uchuva (*P. peruviana*), ubicadas bajo invernadero, a los 8 días de trasplante. AF, área foliar. LT, longitud del tallo.

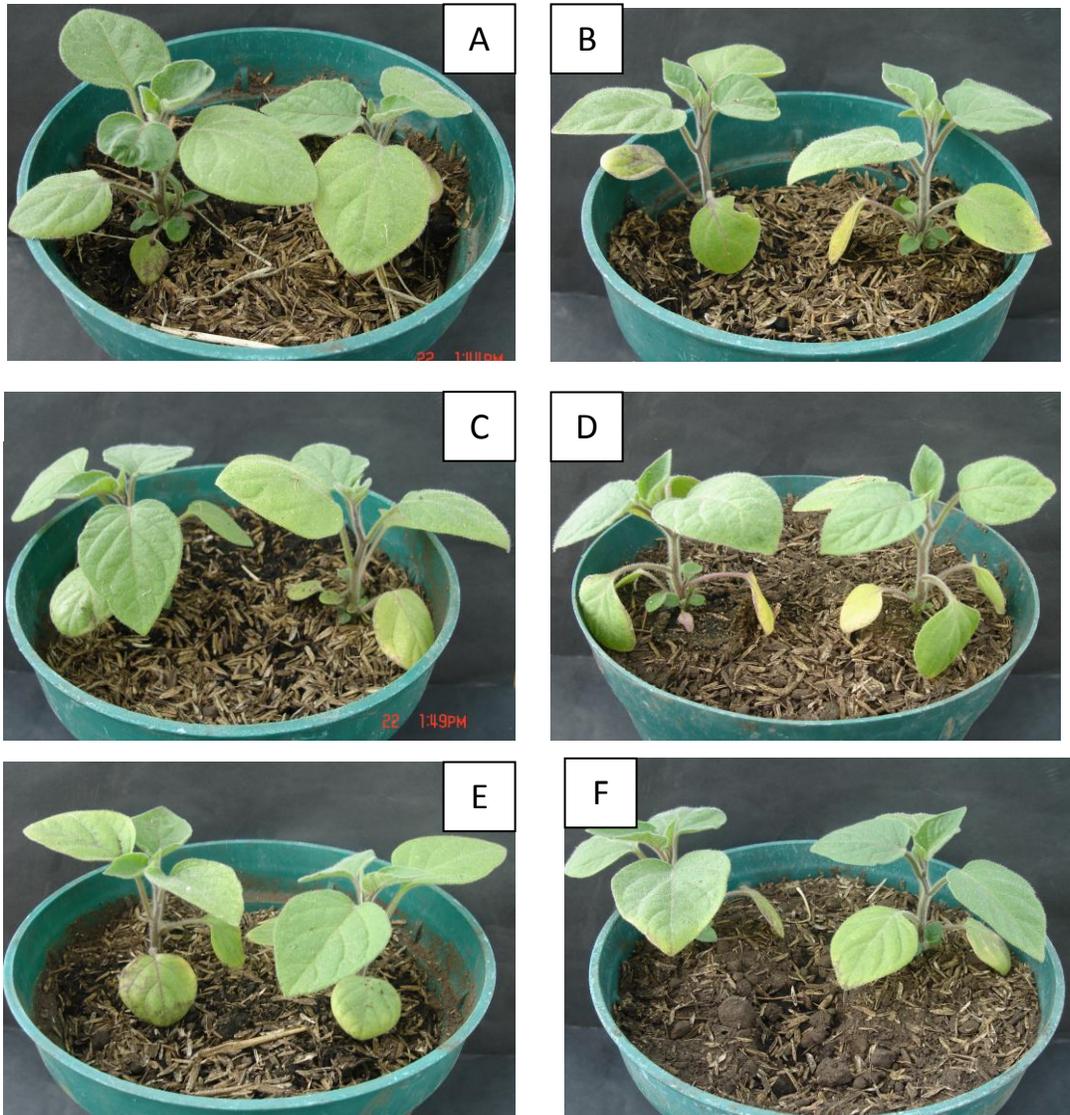
Tratamiento	AF(cm ²)*	LT(cm)*
Control (+)	4,255 ^b	2,651 ^{bc}
B-3.4	7,127 ^a	4,057 ^{abc}
A-19+B-2.1.3	6,903 ^a	4,421 ^{ab}
A-19	7,279 ^a	5,034 ^a
B-3.5	4,494 ^b	3,168 ^{abc}
Control (-)	4,012 ^b	2,224 ^c
B-2.1.3	6,026 ^{ab}	4,281 ^{ab}
B-1.4	5,332 ^{ab}	3,216 ^{abc}

* Diferentes letras representan diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey de comparación múltiple HSD (Honestly Significant Difference) con una probabilidad de 0.05.

Respecto al área foliar, se presentó un incremento significativo ($P < 0.05$) para las plantas tratadas con las cepas B-3.4, A-19, y la combinación A-19+B-2.1.3 (Prom. 7,127cm², 7,279 cm² y 6, 903 cm² respectivamente) al compararlas con los controles tanto negativo (-) como positivo (+) (Prom. 4,012 cm² y 4,255 cm² respectivamente) (Tabla 8), lo cual se a su vez, se evidencia visualmente en la

figura 15. Sin embargo, para los otros tratamientos B-3.5, B-2.1.3 y B-1.4, las plantas no presentaron diferencias significativas en cuanto al área foliar ($P < 0.05$) frente a los controles (Tabla 8, Figura 15).

Para la longitud del tallo, solo las plantas tratadas con la rizobacteria A-19, presentaron un incremento significativo ($P < 0.05$) en este parámetro de crecimiento respecto a los controles, logrando un promedio de 5,034 cm frente a 2,651 cm y 2,224 cm para el control (+) y (-) respectivamente (Tabla 8).



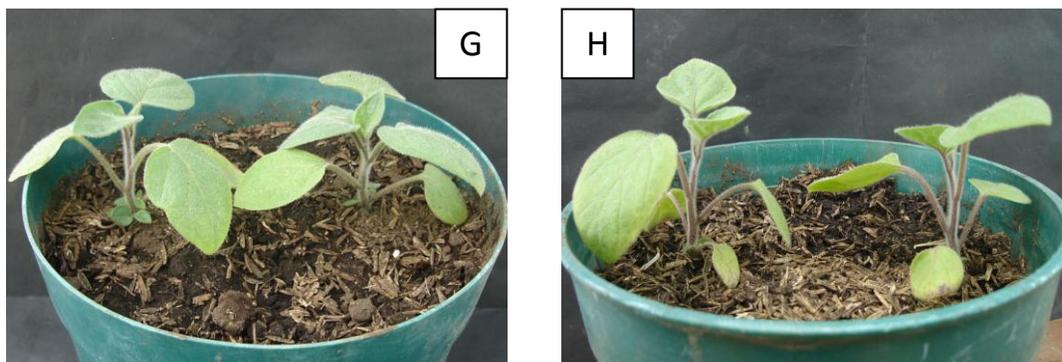


Figura 21. Plantas de uchuva (*Physalis peruviana*) inoculadas con las rizobacterias B-3.4 (A), A-19+B-2.1.3 (B), A-19 (C), B-3.5 (D), B-2.1.3 (E), B-1.4 (F), y los controles negativo (G) y positivo (H), a los 8 días de trasplante.

4.5.2. PESO SECO

Al final de los 23 días de experimentación, se determinó el peso seco de la parte aérea y raíz de las plantas, con el fin de evidenciar la influencia de las rizobacterias aplicadas, sobre el desarrollo de estas bajo condiciones de enfermedad.

Respecto a la parte aérea, las plantas tratadas con las cepas B-3.4, B-1.4, B-2.1.3, A-19 y la combinación de estas dos últimas, así como el control (-), presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto al control (+), obteniéndose pesos superiores de los primeros frente a este último (Tabla 9), hecho que se evidencia visualmente en la figura 22, donde las plantas inoculadas con las rizobacterias mencionadas, presentan hojas más grandes y tallos más largos. Por parte de las plantas inoculadas con la rizobacteria B-3.5, estas tuvieron un desarrollo similar a las del control (+) en cuanto a la parte aérea, pues no presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre si, para este parámetro de crecimiento.

Para el caso del desarrollo radicular, se observó un comportamiento diferente, ya que únicamente las plantas inoculadas con las cepas B-3.4, A-19 y la combinación

A-19+B-2.1.3, así como el control (-), presentaron valores significativamente superiores ($P < 0.05$) frente al control (+), mientras que las demás no (Tabla 9). De manera visual, en la figura 22, se observa lo mencionado anteriormente, donde las raíces de las plantas pertenecientes a los tratamientos con B-3.4, A-19 y la combinación A-19+B-2.1.3, se ven más largas y densas respecto a las del control (+).

Tabla 9. Efecto de 5 rizobacterias y una combinación, sobre el peso seco de plantas de uchuva (*P. peruviana*), ubicadas bajo invernadero, a los 23 días de trasplante. **PSA**, peso seco parte aérea. **PSR**, peso seco raíz.

Tratamiento	PSA(g)*	PSR(g)*
Control (+)	0,095 ^b	0,080 ^d
B. 3.4	0,3507 ^a	0,239 ^{ab}
A-19+B.2.1.3	0,254 ^a	0,204 ^{abc}
A-19	0,325 ^a	0,201 ^{abc}
B. 3.5	0,142 ^b	0,116 ^{cd}
Control (-)	0,316 ^a	0,282 ^a
B. 2.1.3	0,255 ^a	0,167 ^{bcd}
B. 1.4	0,290 ^a	0,158 ^d

* Diferentes letras representan diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey de comparación múltiple HSD (Honestly Significant Difference) con una probabilidad de 0.05.



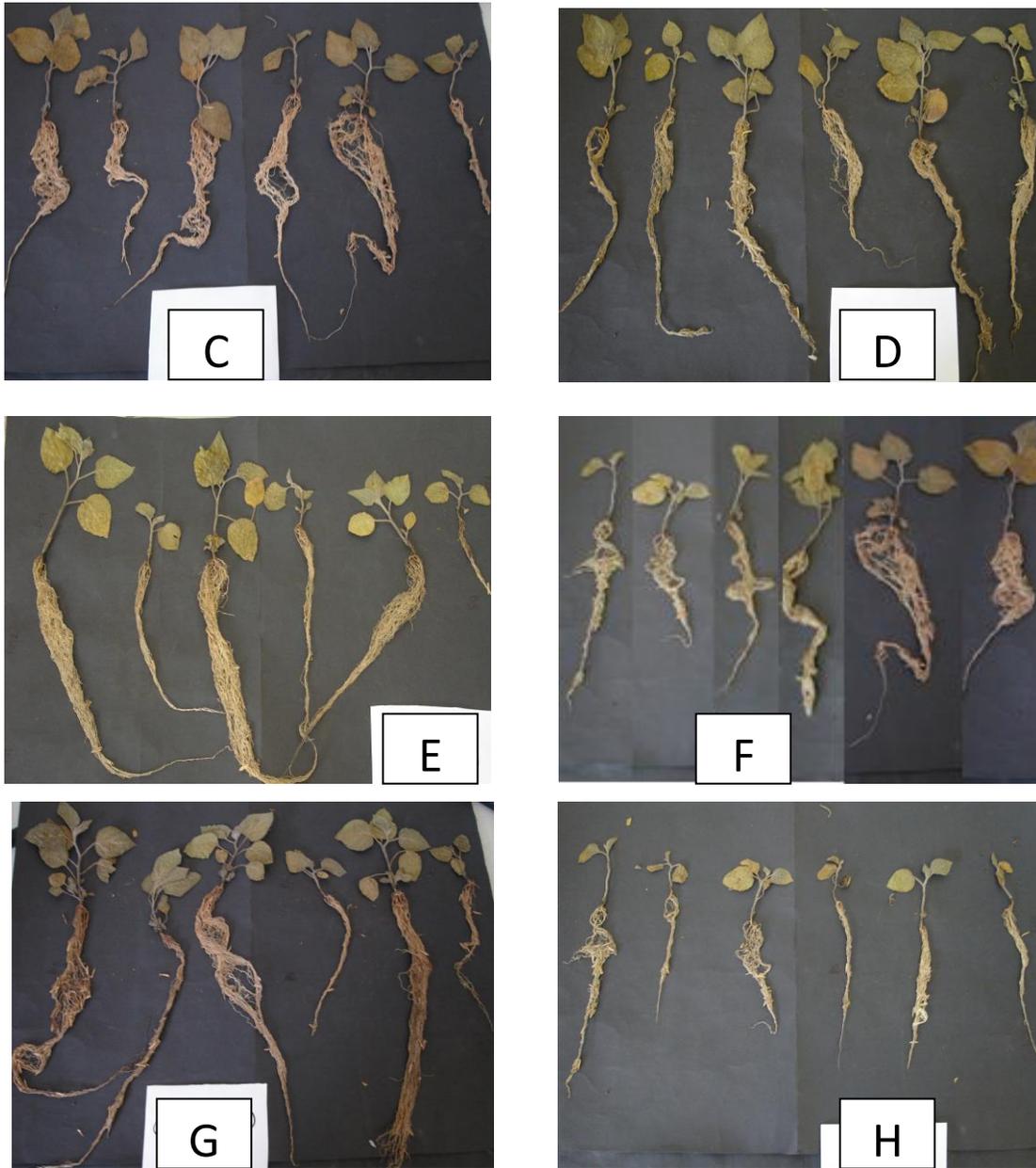


Figura 22. Se observan 6 plantas por tratamiento y controles, escogidas al azar, tomando dos plantas por réplica, posterior al proceso de secado. Plantas inoculadas con las cepas A-19 (A), A-19+B-2.1.3 (B), B-2.1.3 (C), B-3.4 (D), B-3.5 (E), B-1.4 (F) y los controles negativo (G) y positivo (H).

5. DISCUSIÓN

5.1. ANTAGONISMO *IN VITRO*

De las 225 cepas de rizobacterias de uchuva obtenidas, a 123 se les llevó a cabo pruebas de antagonismo tipo I contra *F. oxysporum* (G1), con el fin de hacer una primera selección de las que presentaban un efecto antagónico frente a este hongo. Se obtuvieron diferentes grados de inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* (G1), pero solo 9 de estas cepas, B-3.10E, B-2.1.3, B-1.4, B-3.4, B-3.5, B-2.13E, B-2.8, A-51 y A-19, mostraron porcentajes iguales o superiores a 27%, el cual fue el umbral mínimo de selección. El bajo número de rizobacterias, con actividad antagónica alta frente al hongo, puede ser consecuencia de que uno, o pocos grupos de microorganismos, son responsables de la actividad biocontroladora en campo, como usualmente se reporta para supresividad específica (como es el caso de la producción de antibióticos) (Weller *et al.*, 2002). Sin embargo, otra posibilidad, sería el hecho de que las poblaciones productoras de antibióticos, pueden presentarse en un número bajo respecto a las demás en la rizósfera, siendo esto consecuencia de las interacciones con la comunidad de microorganismos y factores abióticos, que modulan la dinámica de la población (Weller *et al.*, 2002).

Las 9 cepas escogidas, en los ensayos preliminares, se sometieron a las pruebas de antagonismo tipo II, con el fin, no solo de medir de forma más precisa el efecto de las bacterias sobre el crecimiento *in vitro* de *F. oxysporum*, sino también sobre su esporulación. El efecto inhibitorio que presentaron las cepas evaluadas sobre el crecimiento del micelio del hongo, se atribuye a la producción de metabolitos difusibles por parte de las bacterias, los cuales, al entrar en contacto con el hongo, impiden su desarrollo radial normal (Raaijmakers *et al.*, 2002; Bolwerk *et al.*, 2003; Fernando *et al.*, 2006)

El efecto de los metabolitos producidos, se evidenció al observar bajo microscopio, el crecimiento de las hifas en los bordes del micelio de *F. oxysporum* (G1), las cuales, al entrar en contacto con los antibióticos, perdieron la orientación del crecimiento, aumenta el número de ramificaciones y densidad de las hifas y se observan enrollamientos de las mismas, hechos que en su conjunto, ratifican algún tipo de afectación por parte de los compuestos liberados por las bacterias sobre el desarrollo del hongo. Las anteriores alteraciones sobre el crecimiento micelial por parte de las cepas, concuerdan con estudios *in vitro*, llevados a cabo por Bolwerk y colaboradores (2003), para interacciones entre cepas biocontroladoras del género *Pseudomonas* contra *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, donde se reporta un efecto antibiótico mediado por la phenazina-1-carboamida (PCN), que genera, de igual forma que en este estudio, una pérdida de la orientación del crecimiento, un aumento aproximado de 10 veces de la ramificación de las hifas respecto al control y un 1% de las hifas enrolladas.

Las diferencias, en cuanto a los porcentajes de inhibición mostrados por las rizobacterias evaluadas, se puede atribuir, a que las diferentes poblaciones de microorganismos que habitan la rizósfera, presentan una variación tanto inter como intraespecífica respecto a la producción y naturaleza de los metabolitos secretados (Weller et al., 2002); siendo un ejemplo claro, las cepas identificadas como *Pseudomonas* sp. (B-3.5, B-1.4 y B-2.1.3), las cuales afectaron el crecimiento de *F. oxysporum* de forma diferente. El género *Pseudomonas*, presenta gran variedad en la producción de antibióticos, siendo el más reportado, como responsable del biocontrol de diferentes hongos, entre ellos *F. oxysporum*, el 2,4 diacetyl-phloroglucinol (Weller et al., 2002; Schouten et al., 2004; Haas & Défago, 2005). También, la pirrolitrina y la phenazina-1-carboxamida (PCN), se han reportado como agentes de control sobre este hongo fitopatógeno en ensayos *in vitro* y plantas de tomate respectivamente (Raaijmakers et al., 2002; Bolwerk et al., 2003; Upadhyay & Srivastava, 2008). De esta forma, estos compuestos, son posibles candidatos, como causantes de la inhibición *in vitro* observada en este

estudio, para las cepas pertenecientes ha dicho género. Está claro que son necesarios estudios posteriores.

En cuanto al efecto de las rizobacterias sobre la esporulación *in vitro* de *F. oxysporum* (G1), se obtuvo una reducción significativa ($P < 0.05$) del número total de microconidias producidas respecto al control sin bacteria (en términos de esporas.ml⁻¹) para todas las cepas (excepto B-2.8), siendo B-1.4, B-3.5 y B-3.4, las que mostraron mejores resultados. Esta reducción, obedece en gran medida, a la inhibición del crecimiento vegetativo del hongo sobre el medio, lo cual disminuye la superficie efectiva sobre la cual se extiende el micelio, limitando el número de hifas que generan los conidióforos donde se producen las conidias.

Esta disminución en el número de microconidias, es una característica deseable, para seleccionar rizobacterias con potencial bicontrolador *in vivo* (Kamilova *et al.*, 2008), ya que, el proceso de infección en el caso de los hongos fitopatógeno del suelo, y más precisamente en el de *F. oxysporum*, la cantidad de inóculo presente en el sustrato, es un factor importante, el cual determina diferentes parámetros del proceso de enfermedad como la incidencia, severidad y aparición del primer síntoma (Landa *et al.*, 2001).

Respecto a la capacidad del hongo para producir microconidias, medido en términos de conidias por cm² de micelio, respondió más a un mayor nivel de estrés ejercido por los metabolitos liberados por las bacterias, que inhibían el crecimiento del hongo. De este modo, en los tratamientos en los cuales el porcentaje de inhibición de crecimiento fue alto (B-3.4, B-3.5, B-2.13E, A-19 y B-2.1.3), el hongo tendió a producir mas conidias por unidad de área, como consecuencia de la incapacidad de este de crecer sobre el medio de cultivo, mientras que en los tratamientos con porcentajes de inhibición bajo (A-08, B-3.10E y A-51), el numero de conidias producidas fue menor, debido a un menor nivel de estrés.

Sin embargo, es importante mencionar, que al comparar las cepas con altos porcentajes de inhibición de crecimiento, como B-3.4, B-3.5, B-2.13E, A-19, B-2.1.3, y B-1.4 se observa que esta última, si disminuyó la producción de conidias por cm^2 respecto a las demás, mientras que otras, como la B-2.13E, lo aumentaron significativamente. Esta aparente incongruencia, entre los resultados de inhibición de crecimiento y la capacidad de esporulación del hongo, se debe a que los metabolitos producidos por las rizobacterias, solo entran en contacto con una parte del micelio del hongo, principalmente los bordes, por lo cual las secciones más internas y aéreas no se ven afectadas directamente por el compuesto antagónico. De este modo, sería conveniente realizar ensayos en medios de cultivo líquidos, como se ha demostrado en estudios realizados por Kamilova y colaboradores (2008) donde la cepa biocontroladora *P. fluorescens* WCS365, inhibió la capacidad de *F. oxysporum*, tanto de producción de esporas como la germinación de las mismas, en cultivos líquidos duales (Kamilova et al., 2008).

5.2. ANTAGONISMO *IN VIVO*

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las pruebas de antagonismo *in vitro* tipo II, de las cepas con alto porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo y la reducción en la esporulación del mismo, se seleccionaron cinco aislados de bacterias para los ensayos de control *in vivo*. De este modo, las cepas escogidas fueron, B-3.4, B-3.5, B-1.4, B-2.1.3, y A-19, además de probar la combinación A-19+B-2.1.3, ya que estas últimas cepas pertenecen a géneros diferentes, reportándose en la bibliografía la mezcla de bacterias de diferentes especies, como una alternativa útil para incrementar los niveles de control (Raupach & Kloepper, 1998).

Aunque todas las cepas evaluadas redujeron la patogenicidad de *F. oxysporum* (G1) sobre plantas de uchuva, la rizobacteria B-3.4 fue la mejor respecto a las demás, ya que retraso la aparición del primer síntoma, las plantas inoculadas

presentaron la incidencia y porcentaje de severidad más bajo al final del experimento, así como los menores valores para el área bajo la curva del progreso de estas dos.

Discrepancias en cuanto a la capacidad de diferentes rizobacterias, para controlar un patógeno del suelo en un patosistema, se asocian a un gran número de factores, tanto abióticos (pH, humedad, temperatura, entre otros) como bióticos (interacción con la comunidad de microorganismos y exudados de la planta hospedera), que en conjunto juegan un papel importante en el establecimiento de la población del microorganismo controlador y expresión de la actividad antagonica del mismo (Raaijmakers *et al.*, 2002; Bolwerk *et al.*, 2003; Raaijmakers *et al.*, 2009).

De este modo, la capacidad de producir metabolitos, variará para cada bacteria, dependiendo de la capacidad de cada cual, para adaptarse a las condiciones de la rizósfera, y de la menor o mayor influencia de los diferentes factores, en la expresión de los genes involucrados en la producción y síntesis de estos metabolitos de interés (Garbeva *et al.*, 2004). Aunque no se demostró, se podría asumir, que todas las cepas evaluadas, fueron capaces de establecerse en la rizósfera de uchuva, ya que en su conjunto, influenciaron la patogenicidad del hongo y el crecimiento (menos la cepa B-3.5 para este ultimo) de las plantas durante el proceso de infección, por lo cual, las diferencias en el control de *F. oxysporum* (G1) obtenidas entre las cepas B-3.5, B-1.4, B-2.1.3, A-19, más la combinación (A-19+B-2.1.3) y B-3.4, pueden obedecer a dos posibilidades: en primer lugar, una diferencia en cuanto a la naturaleza del metabolito(s) inhibitorio(s) y/o la distinta capacidad de síntesis del mismo(s) en el suelo por parte de las bacterias, y en segundo, a que el antibiótico secretado por B-3.4, tenga la capacidad aditiva de activar la respuesta sistémica inducida en las plantas, como se ha demostrado para el 2,4-diacetyl-phloroglucinol, 2,3-butanediol, la pyocianina, entre otros (Van Loon & Bakker, 2006).

Es así, que varios autores (Raaijmakers *et al.*, 2002; Fernando *et al.*, 2006), han reportado la importancia de la producción de metabolitos con actividad antibiótica frente a patógenos, como un mecanismo importante de control, tanto *in vitro* como *in vivo*, donde a las bacterias que se les inactiva el gen o genes involucrados en la síntesis de un antibiótico determinado, mediante métodos de transformación, son incapaces de expresar la actividad biocontroladora, de la misma forma que la cepa original. De este modo, este estudio ratifica lo mencionado anteriormente y propone el antagonismo mediado por antibiosis, como un mecanismo de control de *F. oxysporum* en plantas de uchuva.

En el caso de las rizobacterias B-2.1.3, B-1.4 y B-3.5, las cuales disminuyeron la patogenicidad de *F. oxysporum* (G1) sobre plantas de uchuva respecto al control (+), e identificadas como *Pseudomonas sp.*, permite ratificar, que este género, se asocia comúnmente como antagonista, tanto *in vitro* como *in vivo*, de diferentes hongos fitopatógenos del suelo, entre ellos *F. oxysporum*, (Liu *et al.*, 1995; Chan *et al.*, 2003). Los antibióticos 2,4 diacetyl-phloroglucinol, phenazina-1-acido carboxílico y phenazina-1-carboamida, producidos por diferentes especies de *Pseudomonas* y reportados como agentes de control de este hongo en otras especies vegetales (Haas & Défago, 2005; Mazurier *et al.*, 2007), pueden ser candidatos como responsables del antagonismo de *F. oxysporum* observado en las pruebas *in vivo* para este estudio. En el caso de las otras dos cepas, B-3.4 y A-19, es necesario llevar a cabo la identificación para hacer alguna afirmación.

El inóculo inicial, como se mencionó anteriormente, es un factor importante en el desarrollo de la enfermedad, que influye también en el grado de supresión de esta por parte de las rizobacterias controladoras (Landa *et al.*, 2001). En un estudio realizado por Landa y colaboradores (2001), se demostró que la capacidad de control de cepas de *Pseudomonas* y *Bacillus* sobre *F. oxysporum* f. sp *ciceris*, fue dependiente de la temperatura e inóculo inicial del hongo en el suelo (en términos de Número de clamidiosporas.g⁻¹ de suelo), encontrándose que a

concentraciones altas de clamidiosporas, el efecto antagónico de estas bacterias biocontroladoras se veía significativamente disminuido.

De este modo, es importante aclarar, que en este estudio, el inóculo empleado de *F. oxysporum* (G1) en el suelo, mediante la técnica chaff-grain, fue dos veces mayor a lo sugerido por Leslie & Summerell (2006), lo cual pudo influir en el menor grado de supresión de la enfermedad por parte de las rizobacterias evaluadas. Por lo cual, es necesario estudios posteriores, que evalúen la capacidad biocontroladora de las rizobacterias seleccionadas, la cual puede aumentar o disminuir, en diferentes temperaturas y concentraciones de inóculo inicial. Es así, que los resultados obtenidos, en este estudio, deben ser concluyentes, solo para las condiciones en las cuales se desarrolló el experimento.

5.3. PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO Y GERMINACIÓN

Además de evaluar las diferencias respecto a la patogenicidad del hongo, es también importante determinar el efecto del proceso de infección, sobre las características de crecimiento de las plantas inoculadas con las rizobacterias, ya que plantas enfermas de uchuva, conservan la capacidad de producir frutos. De este modo, se realizaron dos muestreos, uno previo al proceso de infección, a los 8 días de trasplante, donde se midió el área foliar y longitud del tallo, y el segundo, al final del experimento, donde se determinó el peso seco de las plantas.

Un rápido crecimiento, en las primeras etapas de desarrollo, se asocia comúnmente, con una mejor capacidad de la planta para responder al ataque de patógenos del suelo, al incrementar el vigor y disminuir el periodo de vulnerabilidad (Van Loon & Bakker, 2006). Por lo cual, una estimulación por parte de las cepas evaluadas, en teoría, debería poder proteger mejor a las plantas durante el proceso de infección. En el caso de la germinación, ningún tratamiento

con las rizobacterias, incrementó significativamente ni el valor de germinación (GV), ni el porcentaje de germinación final. Sin embargo, en etapas posteriores de desarrollo, las cepas B-3.4, A-19 y la combinación A-19+B-2.1.3, incrementaron significativamente respecto a los controles (-) y (+), el área foliar de las plantas, en el caso de las tres cepas y la longitud del tallo, solo para la segunda.

La promoción del crecimiento en las plantas por parte de las rizobacterias, a través de la síntesis de hormonas y/o estimulación de la producción de las mismas en la planta, es un mecanismo ampliamente reportado, para diferentes géneros de bacterias, como *Pseudomonas* y *Bacillus*, que se da principalmente, en condiciones apropiadas de crecimiento (Ramírez & Mellado, 2006), por lo cual se hipotetiza, que este incremento de los valores para uno o ambos parámetros de crecimiento por parte de las cepas B-3.4, A-19 y la combinación A-19+B-2.1.3, se puede deber, al mecanismo mencionado anteriormente; y no tanto por la solubilización de nutrientes, ya que las plantas en su conjunto, fueron fertilizadas periódicamente.

En el caso de las otras rizobacterias evaluadas (B-1.4, B-3.5 y B- 2.1.3), estas no promocionaron significativamente ningún parámetro de crecimiento, aunque presentaron promedios superiores a los de los controles. Lo anterior, se puede deber a la inexistencia de una actividad promotora por medio de hormonas u otro mecanismo, ya que la capacidad de las bacterias respecto a la producción y/o inducción de hormonas en la planta, varía tanto inter como intraespecíficamente, así como la capacidad de mejorar el crecimiento a través de otros medios (Banerjee *et al.*, 2006; Duponnois, 2006; Ramirez & Mellado, 2006)

Al final del experimento, se pudo establecer, que las plantas inoculadas con las rizobacterias (menos la B-3.5), presentaron un mejor desarrollo bajo condiciones de enfermedad, en cuanto a la parte aérea (hojas y tallos), respecto al control (+), lo cual concuerda con los menores valores de severidad e incidencia para los tratamientos con las cepas evaluadas. Esto permite predecir, que las plantas, en

condiciones de cultivo, tendrán un mejor crecimiento durante el proceso de infección, presentando posiblemente una mayor productividad, respecto a las plantas sin las rizobacterias mencionadas. En el caso del desarrollo radicular, este fue significativamente mejor en los tratamientos con las cepas B-3.4, A-19 y la combinación A-19+B-2.1.3, más no para las cepas B-1.4, B-2.1.3 y B-3.5, lo cual puede indicar un menor control por parte de estas últimas durante la penetración del hongo en las raíces, concordando así, con una aparición temprana de los primeros síntomas de marchitez en estos tratamientos (coincidiendo con el mismo día que para el control (+)).

Aunque no se puede establecer una clara relación entre mejor desarrollo de las plantas y menor patogenicidad del hongo sobre las mismas, ya que el experimento no fue diseñado con este propósito, si se puede inferir alguna influencia de este hecho para los tratamientos con las cepas B-3.4, A-19, y la combinación A-19+B-2.1.3, ya que estas además de incrementar el área foliar y/o longitud del tallo, así como el peso seco de la parte aérea, presentaron, para los tres casos un retraso en la aparición de los primeros síntomas, y específicamente en la cepa B-3.4, la menor incidencia y severidad para el progreso de las mismas.

6. CONCLUSIONES

- Bacterias provenientes de la rizósfera de uchuva, presentan actividad antagónica *in vitro* contra *Fusarium oxysporum* (Aislado G1), gracias a la producción de metabolitos difusibles, que alteran el crecimiento normal del micelio.
- Cepas bacterianas pertenecientes a la rizósfera de uchuva, difieren en su capacidad antagónica *in vitro*, como consecuencia de una diferencia en cuanto a la composición y/o cantidad de antibiótico liberado al medio.
- Rizobacterias de uchuva, con buena capacidad de inhibición de crecimiento de *F. oxysporum*, *in vitro*, muestran un comportamiento variable respecto al control de la marchitez, causada por este mismo, en plantas de uchuva (*P. peruviana*), debido a una diferencia en cuanto a la naturaleza del metabolito (s) y/o cantidad producida, siendo la cepa B-3.4, la que mejores resultados mostró.
- Algunas cepas influenciaron positivamente el crecimiento de las plantas, previo al proceso de infección, al incrementar el área foliar y longitud del tallo, respecto a los controles positivo (+) y negativo (-); gracias, probablemente, a la producción de estimuladores del crecimiento por parte de las rizobacterias y/o estimulación de la síntesis de los mismos en la planta.
- La mayoría de las cepas (menos la B-3.5), permitieron un mejor desarrollo de las plantas durante el avance de la enfermedad, al obtenerse pesos secos de la parte aérea y raíz, significativamente superiores, a los del control positivo (+).

7. RECOMENDACIONES

- Aumentar el número de aislamientos de rizobacterias de uchuva, muestreando diferentes regiones, con el fin de captar una mayor diversidad de microorganismos y aumentar el cepario.
- Establecer una metodología de antagonismo *in vitro* en medio líquido, que permita establecer de manera más precisa, la influencia de las bacterias sobre la esporulación del hongo.
- Establecer un protocolo de evaluación rápida *in vivo*, de rizobacterias con diferentes porcentajes de inhibición *in vitro*, pues la actividad de las bacterias en los dos casos no necesariamente se correlaciona.
- Probar las bacterias seleccionadas en este estudio, frente a diferentes aislamientos de *F. oxysporum*, tanto *in vitro* como *ex vitro*, con el fin de establecer si estas presentan un amplio espectro antagónico.
- Probar las rizobacterias seleccionadas en diferentes condiciones, tanto de temperatura, como de inóculo inicial de *F. oxysporum* en el suelo, pues estos parámetros influyen en la capacidad biocontroladora de las PGPRs.

8. BIBLIOGRFÍA

- ALABOUVETTE, C., OLIVIAN, C., MIGHELI, Q., STEINBERG, C. 2009. Microbiological Control of Soil-Borne Phytopathogenic Fungi with Special Emphasis on Wilt-Inducing *Fusarium oxysporum*. *New Phytol.* pp: 1-16.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIMPAN, D. J. 1997. Gapped Blast and PSI-Blast: A New Generation of Protein Database Search Programs. *Nucleic Acid Res.* 25 (17): 3389-3402
- ANDERSEN, J. B., KOCH, B., NIELSEN, T. H., SORENSEN, D., HANSEN, M., NYBROE, O., CHRISTOPHERSEN, C., SORENSEN, J., MOLIN, S., GIVSKOV, M. 2003. Surface Motility in *Pseudomonas sp. DSS73* is Required for Efficient Biological Containment of the Root-Pathogenic Microfungi *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. *Microbiol.* 149: 37-46.
- ANGULO, R. 2005. Uchuva: El Cultivo. Centro de Investigaciones y Asesorías Agroindustriales (CIAA). Bogotá. Colombia.
- ANTOUN, H., PRÉVOST, D. 2006. Ecology of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. In: PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Siddiqui, Z. A. Springer. Netherlands. pp. 1-38.
- BAAYEN, R.P., FÖRCH, M.G. 2001. Chapter 14: Transfer Cell Formation Reveals a Biotrophic Phase In Bulb Rot of Lilies Infected by *Fusarium oxysporum* F.SP. *Lilii*. En: Summerell, B.A., Leslie, J.F., Beckhouse, D., Bryden, WJL., y Burgess, L.W. (eds) *Fusarium*. Paul E. Nelson Memorial Symposium APS Press, St Paul, MN, EE.UU., pg: 193-211.
- BAIS, H. P., WEIR, T. L., PERRY, L. G., GILROY, S., VIVANCO, J. M. 2006. The Role of Roots Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 57: 233-266.
- BANERJEE, M. R., YESMIN, L., VESSEY, J. K. 2006. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria As Biofertilizers and Biopesticides. In: Handbook of Microbial Biofertilizers. Rai, M. K. Haworth Press. USA. pp. 137-170.

- BENSON, D. A., KARSCH-MIZRACHI, LL., LIPMAN, J. D., OSTELL, J., RAPP, B. A., WHEELER, D. L. 2000. GenBank. Pub. Med. 28 (1): 15-18.
- BOLWERK, A., LAGOPODI, A. J., WIJFJES, A. H. M., LAMERS, G. E. M., CHIN-A-WOENG, T. F. C., LUGTENBERG, B. J. J., BLOEMBERG, G. V. 2003. Interactions in the Tomato Rhizosphere of Two *Pseudomonas* Biocontrol Strains with the Phytopathogenic Fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Mol. Plant-Microbe. Interact. 16 (11): 983-993.
- CEDEÑO, M., MONTENEGRO, M. 2004. Plan exportador, Logístico y de Comercialización de Uchuva al mercado de Estados Unidos para FRUTEXPO S.C.I Ltd. Trabajo de Grado para optar por el Título de Ingeniero Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ingeniería. Bogotá. Colombia. 134 p.
- CHAN, Y. K., MCCORMICK, W. A., SEIFERT, K. A. 2003. Characterization of an Antifungal Soil Bacterium and Its Antagonistic Activities against *Fusarium* Species. Can. J. Microbiol. 49 (4): 253-262.
- CHUNG, Y., SINGH, P., SHIN, Y., PARK, C. 1999. Biological Control of *Fusarium* Wilt of Cucumber by Chitinolytic Bacteria. Phytopatology. 89 (1): 92-98.
- COMPANT, S., DUFFY, B., NOWAK, J., CLÉMENT C., BARKA, E. 2005. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. Appl. Environ. Microbiol. 71: 4951-4959.
- COOK, R. J., THOMASHOW, L. S., WELLER, D. M., FUJIMOTO, D., MAZZOLA, M., BANGERA, G., KIM, D. S. 1995. Molecular Mechanims of Defence by Rhizobacteria Against Root Disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92 (10): 4197-4201.

- DESANTIS, TZ., HUGENHOLTZ, P., LARSEN, N., ROJAS, M., BRODIE, EL. 2006. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5069–72
- DESJARDINS, A.E., PROCTOR, R.H. 2001. Chapter 4: Biochemistry and Genetics of Fusarium Toxins. En: Summerell, B.A., Leslie, J.F., Beckhouse, D., Bryden, WJL., y Burgess, L.W. (eds) *Fusarium*. Paul E. Nelson Memorial Symposium APS Press, St Paul, MN, EE.UU., pg : 50-69.
- DUPONNOIS, R. 2006. Mycorrhiza Helper Bacteria: Their Ecological Impact in Mycorrhizal Symbiosis. In: *Handbook of Microbial Biofertilizers*. Rai, M. K. Haworth Press. USA. pp. 117-129.
- DUTTA, S., MISHRA, A.K., KUMAR, B.S. 2008. Induction of Systemic Resistance against Fusarial Wilt in Pigeon Pea Through Interaction of Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Rhizobia. *Soil Biol. Biochem.* 40 (2008): 452-461.
- DWIVEDI, D., JOHRI, B. N. 2003. Antifungals from Fluorescent Pseudomonads: Biosynthesis and Regulation. *Current Sci.* 85 (12): 1693-1703.
- EMMERT, B. A. E., KLIMOWICZ, K. A., THOMAS, G. M., HANDELSMAN, J. 2004. Genetics of Zwittermicin A Production by *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 104-113.
- FAURE, D., VEREECKE, D., LEVEAU, J. H. J. 2009. Molecular communication in the Rhizosphere. *Plant Soil.* 321: 279-303.
- FERNANDO, W. G. D., NAKKEERAN, S., ZHANG, Y. 2006. Biosynthesis of Antibiotics by PGPR and Its Relation in Biocontrol of Plant Diseases. In: *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Siddiqui, Z. A. Springer. Netherlands. pp. 67-108.
- FERNANDO, W. G. D., RAMARATHNAM, R., KRISHNAMOORTHY, A. S., SAVCHUK, S. 2004. Identification and Use of Bacterial Organic Volatiles in Biological Control of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Soil Biol. Biochem.* 36: (in press).

- FLOREZ, V. J., FISCHER, G., SORA, A. 2000. Cultivo, Poscosecha y Exportación de la Uchuva (*Physalis peruviana* L.). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía. Bogotá. Colombia.
- FRAVEL, D., OLIVAIN, C., ALABOUVETTE, C. 2003. *Fusarium oxysporum* and Its Biocontrol. *New Phytologist*. 157: 493-502.
- GARBEVA, P., VEEN, J. A., ELSAS, J. D. 2004. Microbial Diversity in Soil: Selection of Microbial Populations by Plant and Soil Type and Implications for Disease Suppressiveness. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42: 243-270.
- GONZÁLEZ, R., MONTEALEGRE, J., HERRERA, R. 2004. Control Biológico de *Fusarium solani* en Tomate Mediante el Empleo de los Bioantagonistas *Paenibacillus lentimorbus* y *Trichoderma* ssp. *Ciencia e investigación Agraria*. 31 (1): 21-28.
- GORDON, T. R., OKAMOTO, D. 1990. Colonization of Crop Residue by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Melonis* and Other Species of *Fusarium*. *Phytopatology*. 80 (4): 381-386
- GORDON, T. R., MARTYN, R. D. 1997. The Evolutionary Biology of *Fusarium oxysporum*. *Annu. Rev. Phytopathology*. 35: 111-128.
- HAAS, D., DÉFAGO, G. 2005. Biological Control of Soil-Borne Pathogens by Fluorescent *Pseudomonads*. *Nature Reviews: Microbiology*. AOP published online. pp, 1-13.
- HARTMANN, H. T., KESTER, D. E., DAVIES, F. T., GENEVE, R. L. 2001. *Plant Propagation: Principles and Propagation*. 7 edition. Prentice Hall. pp. 111-136.
- HOFFLAND, E., HAKULINEN, J., PELT, J. A. 1996. Comparison of Systemic Resistance Induced by Avirulent and Nonpathogenic *Pseudomonas* Species. *Phytopathology*. 86 (7): 757-762.
- JIMÉNEZ, R., VIRGEN, G., TABARES, S.Y., OLALDE, V. 2001. Bacterias Promotoras del Crecimiento de Plantas: Agro-Biotecnología. *Avance y Perspectiva*. Vol 20. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del

IPN. Universidad de Irapuato. Dpto de Biotecnología y Bioquímica. Irapuato, Mexico.

- JIMÉNEZ, M. M., NAVAS, J. A., JIMÉNEZ, R. M. 2004. The *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*/*Cicer arietinum* pathosystem: a case study of the evolution of plant-pathogenic fungi into races and pathotypes. *Int. Microbiol.* 7 (2): 95-104
- JURKEVITCH, E., HADAR, Y., CHEN, Y. 1992. Differential Siderophore Utilization and Iron Uptake by Soil and Rhizosphere Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 119-124.
- KAMILOVA, F., LAMERS, G., LUGTENBERG, B. 2008. Biocontrol Strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 Inhibits Germination of *Fusarium oxysporum* Spores in Tomato Root Exudate as well as Subsequent Formation of New Spores. *Environ. Microbiol.* 10 (6): 2455-2461.
- KISTLER, H.C. 2001. Chapter 5: Evolution of Host Specificity in *Fusarium oxysporum*. En: Summerell, B.A., Leslie, J.F., Beckhouse, D., Bryden, WJL., y Burgess, L.W. (eds) *Fusarium*. Paul E. Nelson Memorial Symposium APS Press, St Paul, MN, EE.UU., pg: 70-82.
- LAITILA, A., ALAKOMI, H., RAASKA, L., SANDHOLM, T., HAIKARA, A. 2002. Antifungal Activities of Two *Lactobacillus plantarum* Strains against *Fusarium* Moulds In Vitro and in Malting of Barley. *J. Appl Microbiol.* 93: 566-576.
- LANDA, B. B., CORTÉS, J. A., HERVÁS, A., DÍAZ, R. M. 2001. Influence of Temperature and Inoculum Density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on Suppression of Fusarium Wilt of Chickpea by Rhizosphere Bacteria. *Phytopathology.* 91 (8): 807-816.
- LARCHER, W. 2003. *Physiology Plant Ecology*. Fourth Edition. Springer. Germany. pp 49-55
- LIU, L., KLOEPPER J. W., TUZUN, S. 1995. Inducción of Systemic Resistance in Cucumber Against Fusarium Wilt by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Phytopatology.* 85 (6): 695-698.

- LESLIE, J. F., SUMMERELL, B. A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell. pp. 3-13, 212-218.
- LUGTENBERG, B. J., DEKKERS, L. C. 1999. What Makes Pseudomonas Bacteria Rhizosphere competent. Environ. Microbiol. 1 (1): 9-13.
- MATHIYAZHAGAN, S., KAVITHA, K., NAKKEERAN, S., CHANDRASEKAR, G., MANIAN, K., RENUKADEVI, P., KRISHNAMOORTHY, A., FERNANDO, W. 2004. PGPR Mediated Management of Stem Blight of *Phyllanthus amarus* (Shum and Thonn) Caused by *Corynespora cassicola* (Berk and Curt) wei. Archiv. Phytopathol. Plant Protec. 37: 183-199.
- MAZURIER, S., CORBERAND, T., LEMANCEAU, P., RAAIJMAKERS, J. M. 2009. Phenazine Antibiotics Produced by Fluorescent Pseudomonas Contribute to Natural Soil Suppressiveness to Fusarium Wilt. ISME J. 3 (8): 977-991.
- MONTEALEGRE, J., REYES, R., PERÉZ, L., HERRERA, R., SILVA, P., BESOAIN, X. 2003. Selection of Bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. EJB. 6(2): 115-127.
- NAKKEERAM, S., FERNANDO, W. G., SIDDIQUI, Z. A. 2006. Plant Growth Promoting Rhizobacteria Formulations and Its Scope in Commercializations for the Management of Pest and Diseases. In: PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Siddiqui, Z. A. Springer, Netherlands. pp 257-294
- NELSON, P. E., TOUSSOUN, T. A., COOK, R. J. 1981. *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*. Pennsylvania State University Press, University Park. pp 457
- PAL, K. K., MCSPADDEN, B. 2006. Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health Instructor. pp 1-25.
- PIETERSE, C. M. J., VAN PELT, C. M., WEES, V., TON, J., LÉON-KLOOSTERZIEL, K. M., KEURENTJES, J. B., VERHAGEN, B., KNOESTER, M., VAN DER SLUIS, I., BAKKER, P., VAN LOON, L. C. 2001. Rhizobacteria-Mediated Induced Systemic Resistance: Triggering, Signalling and Expression. Eurp. J. Plant Pathology. 107: 51-61.

- PIETERSE C. M. J., VAN WEES, S. C. M., TON, J., VAN PELT, J. A., VAN LOON, L. C. 2002. Signalling in Rhizobacteria Induced Systemic Resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol.* 4: 535-544.
- PODILE, A. A., KISHORE, K. 2007. Plant Growth Promoting Rizobacteria. In: *Plant-Associated Bacteria*. Gnanamanickam, S. S. eds. Springer. VA/USA. pp. 195-230.
- RAAIJMAKERS, J., VLAMI, M., DE SOUZA, J. 2002. Antibiotic Production by Bacterial Biocontrol Agents. *Antonie Leeuwenhoek.* 81 (1-4): 537-547.
- RAAIJMAKERS, J. M., PAULITZ, T. C., STEINBERG, C., ALABOUVETTE, C. 2009. The Rhizosphere: A Playground and Battlefield for Soilborne Pathogens and Beneficial Microorganisms. *Plant Soil*, 321: 341-361.
- RAMAMOORTHY, V., VISWANATHAN, R., RAGUCHANDER, T., PRAKASAM, V., SAMIYAPPAN, R. 2001. Induction of Systemic Resistance by Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Crop Plants against Pest and Diseases. *Crop Protection.* 20 (2001): 1-11.
- RAMIREZ, L. E., MELLADO, J. 2006. Bacterial Biofertilizers. In: *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Siddiqui, Z. A. Springer. Netherlands. pp. 143-172.
- RAUPACH, G. S., KLOEPPER, J. W. 1998. Mixtures of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Enhance Biological Control of Multiple Cucumber Pathogens. *Phytopathology.* 88 (11): 1158-1164.
- REAUVEN, M., SZMULEWICH, Y., KOLESNIK, I., GAMLIEL, A., ZILBERG, V., MOR, M., CAHLON, Y., BEN-YEPHET, Y. 2005. Methyl Bromide Alternatives for Controlling Fusarium Wilt and Root Knot Nematodes in Carnations. *Act. Hort. (ISHS)* 698: 99-104.
- SACHERER, P., DÉFAGO, G., HAAS, D. 1994. Extracellular Protease and Phospholipase C are Controlled by the Global Regulatory Gene *GacA* in the Biocontrol Strain *Pseudomonas fluorescens* CHAO. *FEMS Microbiol. Ecol.* 49: 379-388.

- SÁNCHEZ, M. T., FORERO, P. A. 2009. Reporte de Especies del Género *Fusarium* Asociados a la Uchuva (*Physalis peruviana*) y Descripción de la Etiología Relacionada con la Fusariosis. Tesis de Grado para optar a título de Biólogo. Univ. Mili. Nuev. Gran. Bogotá, Colombia.
- SCHLOSS PD, HANDELSMAN J. 2006. Introducing SONS, a tool for operational taxonomic unit-based comparisons of microbial community memberships and structures. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(10): 6773–6779.
- SCHOUTEN, A., VAN DEN BERG, G., HERMANN, V. E. STEINBERG, C., GAUTHERON, N., ALABOUVETTE, C., LEMANCEAU, P., RAAIJMAKERS, J. M. 2004. Defense Responses of *Fusarium oxysporum* to 2,4-Diacetylphloroglucinol, a Broad-Spectrum Antibiotic Produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Molec. Plant-Microbe. Interact.* 17 (11): 1201-1211.
- SRIVASTAVA, R., SHALINI, R. 2008. Antifungal Activity of *Pseudomonas Fluorescens* against different Plant Pathogenic Fungi. *EJEAFChe.* 7(4): 2789-2796.
- SWAIN, M., RAY, R. 2007. Biocontrol and other Beneficial Activities of *Bacillus subtilis* Isolated from Cowdung Microflora. *Microbiol. Res.* (2007): 1-10.
- UPADHYAY, A., SRIVASTAVA, S. 2008. Characterization of a New Isolate of *Pseudomonas fluorescens* Strain Psd as a Potential Biocontrol Agent. *Lett. Appl. Microbiol.* 47(2008): 98-105.
- UREN, N. C. 2007. Types, Amounts, and Possible Functions of Compounds Released into The Rhizosphere by Soil-Grown Plants. In: *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface.* Pinton, R., Varanini, Z., Nannipieri, P. CRC Press. USA. pp. 1-15.
- VAN LOON, L. C., BAKKER, P. A. H. M. 2006. Induced Systemic Resistance as a Mechanism of Disease Suppression by Rhizobacteria. In: *PGPR: Biocontrol and Biofertilization.* Siddiqui, Z. A. Springer. Netherlands. pp. 39-64.

- VAN LOON, L. C., BAKKER, P. A. H. M. 2007. Root Associated Bacteria Inducing Systemic Resistance: in Plant-Associated Bacteria. Gnanamanickam, S. S. eds. Springer. VA/USA. pp. 195-230.
- WANG,Q; GARRITY, G; TIEDJE, J; COLE, J. 2007. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy Appl. Environ. Microbiol. 73(16): 5261–5267.
- WELLER, M. D., RAAIJMAKERS, J. M., MCSPADDEN, B. B., THOMASHOW, L. S. 2002. Microbial Populations Responsible for Specific Soil Suppressiveness to Plant Pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 40: 309-348.
- WHIPPS, J. M. 1997. Developments in the Biological Control of Soil-Borne Plant Pathogens. Adv. Bot. Res. 52: 487-551.
- WHIPPS, J. M. 2001. Microbial Interactions and Biocontrol in the Rhizosphere. J. Exp. Bot. 52: 487-511.
- ZAPATA, J. L., SALDARRIAGA, A., LONDOÑO, M., DÍAZ, C. 2002. Manejo del Cultivo de la Uchuva en Colombia. Corpoica. Boletín técnico. Antioquia. Colombia.
- ZHANG, L., BIRCH, R. G. 1997. The Gene for Albicidin Detoxification from *Pantoea dispersa* Encodes an Esterase and Attenuates Pathogenicity of *Xanthomonas albilineans* to Sugarcane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 9984-9989.

9. CONSULTA VIRTUAL

- CORPORACIÓN COLOMBIANA INTERNACIONAL (CCI). 2005. Inteligencia de mercados: Uchuva. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. http://www.agronet.gov.co/www/docs_agronet/2006427154348_UCHUVAMarzo.pdf
- KEGLEY, S.E., HILL, B.R., ORME S., CHOI A.H. Consultado 2008. *PAN Pesticide Database*, Pesticide Action Network, North America (San Francisco, CA, 2008). © 2000-2008 Pesticide Action Network, North America. All rights reserved. <http://www.pesticideinfo.org>.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Consultado 2008. Ozone Layer Depletion, Regulatory Programs, Methyl Bromide. <http://www.epa.gov/ozone/mbr/qa.html>

10. ANEXOS

Anexo 1: Sitios de muestreo para la recolección de muestras de raíces de uchuva (*Physalis peruviana*).

Departamento	Municipio	FINCA	Edad Cultivo	N° Siembras	Clima Municipio
Cundinamarca	Silvania	"La Esperanza"			Altitud: 1470 m.s.n.m. Temperatura media: 20°C
		Desconocido	Desconocido	Desconocido	
	Granada	"El Rodeo"	8 meses	Primer Cultivo	Altitud: 1890 m.s.n.m. Temperatura media: 14°C
		"La Palmera"	7 meses	Ya se había cultivado	
		"Lote 9"	10 meses	3 veces Uchuva	
		"San Rafael"	8 meses	2 veces Uchuva	
	Fuquene	Plantas Silvestres			Altitud: 2750 m.s.n.m. Temperatura media: 13 °C
Gacheta	Plantas Silvestres			Altitud: 1745 m.s.n.m. Temperatura media: 20 °C	
Cajica	Plantas Silvestres			Altitud: 2558 m.s.n.m. Temperatura media: 14 °C	
Boyacá	Ventaquemada	"La Playa"	6 meses	Segundo Cultivo Uchuva	Altitud: 2630 m.s.n.m. Temperatura media: 11 °C
	Arcabuco	Plantas Silvestres			Altitud: 2739 m.s.n.m. Temperatura media: 13 °C

Anexo 2: Porcentajes de inhibición en las pruebas de antagonismo *in vitro* tipo I, para 123 cepas de rizobacterias de uchuva.

Cepa	%Inhib.*	Cepa*	% Inhib.*	Cepa	% Inhibi.*
B-1.1	5,45	B-2.2.4	14,67	B-1.31 E	6,97674419
B-1.2	10,65	B-2.2.5	16,34	B-2.1.1 E	9,89
B-1.3	13,56	B-2.2.6	12,78	B-2.1.2 E	4,65116279
B-1.4	43,0232558	B-3.1	11,627907	B-2.1.3 E	8,13953488
B-1.5	12,345	B-3.2	2,56	B-2.1.4 E	10,34
B-1.6	3,67	B-3.3	3,67	B-2.1.5 E	10,56
B-1.7	17,889	B-3.4	38,372093	B-2.1.6 E	11,57
B-1.8	8,89	B-3.5	36,0465116	B-2.1.9 E	21,45
B-1.9	20,77	B-3.6	12,7906977	B-2.1.10 E	12,63
B-1.11	22,88	B-3.7	5,78	B-2.1.11 E	13,78
B-1.12	12,33	B-3.8	8,67	B-2.1.12 E	10,52
B-1.13	5,89	B-3.9	10,56	B-2.1.13 E	32,5581395
B-1.14	3,89	B-3.10	12,45	B-2.1.14 E	20,36
B-1.15	18,6046512	B-3.11	18,6046512	B-2.1.15 E	0
B-1.16	3,48837209	B-3.12	2,56	B-2.1.17 E	2,34
B-1.17	2,56	B-3.13	16,78	B-2.2.1 E	14,67
B-1.18	15,888	B-3.14	19,45	B-2.2.2 E	9,30232558
B-1.19	16,34	B-3.15	6,78	B-2.2.3 E	13,76
B-1.20	7,89	B-1.1 E	21,34	B-2.2.4 E	18,54
B-1.21	10,4651163	B-1.2 E	6,78	B-2.2.5 E	0
B-1.22	20,32	B-1.3 E	8,32	B-2.2.6 E	18,49
B-1.23	19,67	B-1.4 E	19,3	B-3.1 E	8,13953488
B-1.24	10,4651163	B-1.5 E	12,45	B-3.2 E	8,13953488
B-2.1.1	15,1162791	B-1.6 E	13,56	B-3.3 E	6,89
B-2.1.2	6,87	B-1.7 E	3,4	B-3.4 E	22,56
B-2.1.3	55,8139535	B-1.8 E	9,30232558	B-3.5 E	19,7674419
B-2.1.4	18,33	B-1.9 E	9,56	B-3.6 E	6,97674419
B-2.1.5	12,34	B-1.10 E	9,32	B-3.7 E	22,54
B-2.1.6	3,67	B-1.11 E	13,56	B-3.8 E	4,65116279
B-2.1.8	37,2093023	B-1.12 E	13,67	B-3.9 E	5,81395349
B-2.1.10	26,744186	B-1.13 E	8,34	B-3.10 E	29,0697674
B-2.1.11	22,0930233	B-1.14 E	19,34	B-3.11 E	2,3255814
B-2.1.12	20,9302326	B-1.15 E	2,3	B-3.12 E	9,30232558
B-2.1.13	4,65116279	B-1.16 E	2,67	B-3.13 E	23,87
B-2.1.14	20,9302326	B-1.17 E	5,34	B-3.14 E	9,30232558
B-2.1.15	5,81395349	B-1.18 E	8,34	B-3.15 E	5,81395349
B-2.1.16	12,56	B-1.19 E	4,34	A-19	30,2325581

B-2.1.17	13,67	B-1.20 E	11,67	A-08	0
B-2.2.1	20,9302326	B-1.21 E	11,56	A-51	27,9069767
B-2.2.2	20,9302326	B-1.22 E	19,7674419	A-26	9,30232558
B-2.2.3	16,78	B-1.23 E	6,89	A-40	11,627907

*Porcentajes de inhibición para cada cepa, son el promedio de 4 replicas.

Anexo 3: Secuencias de la región 16S del rDNA empleadas en las identificación molecular para las rizobacterias seleccionadas.

- A-19:

CTGGCTCCATGAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTA
TTCACCGCGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGACGCCTGCAATCCGAAGTGAAGAATGGCT
TTATGGGATTTCGTTACCTTCGCGAGTTTGCAGCCCTTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGAT
GATTTGACGTCATCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGG
TTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACAGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGCTACTCTGTCCCCGAAGGGG
AAAGCCCTATCTTAGGGTTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTGAATTAACACATGCTCCACCGCT
TGTGCGGGCCCCGTCATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCAGCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAA
AGGGCGGAAACCTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGC
GCCTCAGTGTACAGTACAGACCAGAAAGTGCCTTTCGCCACTGGTGTCTCCAAATCTCTACGCATTTACCGCTACACTTGGAAATC
CACTTTCCTCTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATTGACCTCCACGTTAGCCGCTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGGAACCAC
CTGCGCGCGCTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCACCTACGTTATTACCGCGGCTGCTGGCAGTAGTTAGCCGTGGCTTT
CTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCAGCAGTTACTCTGGTACTTGTCTTCCCTAACAACAGAAGTTTACGACCCGAAGGCCCTTCTCGT
TCACGCGCGGTTGCTCCGTGAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGCTCAGTC
CCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTGCGCTACGCATCGTCGCTTGGTGGAGCCATTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGG
CCATCTATAAGTGACAGCGTAAACCGTCTTCCATCTTCTCATGCGAGAAAAGAACGTATCCGGTATTAGCTCCGGTTTCCCGAAGT
TATCCAGTCTTATAGGCAGGTTGCCACGTGTTACTACCCGTCCGCGCTAATCTCAGGGAGCAAGCTCCCGTCGATTGCTCGAC
TTGC

- B-3.5:

ACCGTCCCTCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGT
ATTCACCGGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGACAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTT
TTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCTTTGTACCGACATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCGTAAGGGCCATGAT
GACTTGACGTCATCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAG
GGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACAGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGTTCCCGAAGG
CACCAATCCATCTCGAAAGTTCATTGGATGTCAAGGCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTGAATTAACACATGCTCCACCGCT
TGTGCGGGCCCCGTCATTCATTGAGTTTAACTTTCGCGCGTACTCCCCAGGCGGTCACCTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAA
AAGCTCAAGGCTTCCAACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCGACTTTCGCA
CCTCAGTGTGAGTATCAGTCCAGGTGGTGCCTTCCGCACTGGTGTCTTCTATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATTC
ACCACCCTTACCATACTAGTACGTCAGTGTGAAATGCAAGTTCACAGGTTGAGCCCGGGGATTTCACATCCAACCTAACAAACCACC
TACGCGCGCTTACGCCAGTAATCCGATTAACGCTTGCACCCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGTCTATT
CTGTCGGTAACGTCAAACAGTTACGTATTAGGCAACTGCCCTTCTCCCAACTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTCACAC
ACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATATCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCC
AGTGTGACTGATCCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCTTGGTGGACATTACCTCACCAACTAGCTAATCCGACCTAGGCTC
ATCTGATAGCGCAAGGCCGAAGTCCCTGCTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCGTCCGTTTCCGAAGCTTATCCCCAC
TACCAGGCAGATTCTAGGCATTACTACCCGTCCGCGCTCTCAAGAGAAGCAAGCTTCTCTACCGCTCGACTTGCA

- B-1.4:

TCCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAAACGTATTC
ACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTGT
GGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGAC
TTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATTACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTT
GCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGCTCCCGAAGGCACC
AATCCATCTCTGAAAAGTTCAATTGGATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTGAATTAACACATGCTCCACCGTTGTG
CGGGCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGC GGCCGTACTCCCAGGCCGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAGAGC
TCAAGGCTCCCAACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGCACCTCA
GTGTCAGTATCAGTCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCTATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATTCACCAC
CCTCTACCATACTAGCTTGCAGTTTTGGATGCAGTTCAGGTTGAGCCGGGGATTTCACATCCAACCTAACAAACCACCTACGC
GCGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTG
GGTAACGTCAAAATTGCAGAGTATTAATCTACAACCCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCG
GCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATATCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGT
GACTGATCATCCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTGGAGCCATTACCTCACCAACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGA
TAGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCGTTCTTTGAAAACGTTGTCGCCCACTACCAG
GCAGATTCTAGGCATTACTACCCGTCCGCCGCTGAATCCAGGAGCAAGCTCCTTCATCCGCTCGACTGCA

- B-2.1.3:

TCCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAAACGTATTC
ACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTGT
GGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGAC
TTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATTACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTT
GCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGTTCCCGAAGGCACC
AATCCATCTCTGAAAAGTTCAATTGGATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTGAATTAACACATGCTCCACCGTTGTG
CGGGCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGC GGCCGTACTCCCAGGCCGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAGAGC
TCAAGGCTCCCAACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGCACCTCA
GTGTCAGTATCAGTCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCTATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATTCACCAC
CCTCTACCATACTAGCTTGCAGTTTTGGATGCAGTTCAGGTTGAGCCGGGGATTTCACATCCAACCTAACAAACCACCTACGC
GCGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTG
GGTAACGTCAAAATTGCAGAGTATTAATCTACAACCCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCG
GCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATATCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGT
GACTGATCATCCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTGGAGCCATTACCTCACCAACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGA
TAGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCGTTCTTTGAAAACGTTGTCGCCCACTACCAG
GCAGATTCTAGGCATTACTACCCGTCCGCCGCTGAATCCAGGAGCAAGCTCCTTCATCCGCTCGACTGCA

Anexo 4: Incidencia diaria de *F. oxysporum* sobre plantas de Uchuva (*Physalis peruviana*), durante 23 días.

Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Tratamiento																							
Contr (+)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,33	0,33	1	1,66	2	4	4,33	5,66	7,33	7,33	8
B. 3.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,66	1	2,33	3,66	4	4,33
A-19+B. 2.1.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,33	1,33	2,33	3	3,66	4,66	5,33	6
A-19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1,33	3,33	3,33	4	4,66	5,33	6
B. 3.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,66	0,66	1	1	1	2	2,33	2,33	4,33	4,33	5
Contr(-)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B. 2.1.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,33	0,33	0,33	1	1	1,66	3,33	4,33	5	5,66	5,66
B. 1.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,33	0,33	0,33	0,66	1	2	3,33	4	4,66	6	6,33

* Datos de incidencia, son el resultado del promedio de tres repeticiones por tratamiento.

Anexo 5: Índice de Severidad diaria de *F. oxysporum* sobre plantas de Uchuva (*Physalis peruviana*), durante 23 días, en términos de porcentaje, hallado mediante la fórmula: $S = (\sum nv/3N) * 100$.

Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Tratamiento																							
Contr(+)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,38	1,38	4,16	6,94	8,33	23,6	30,5	36,1	45,8	51,3	63,8
B. 3.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,77	4,16	9,72	18,0	23,6	27,7
A-19+B. 2.1.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5,55	5,55	12,5	16,6	23,6	30,5	33,3	38,8
A-19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4,16	5,55	16,6	16,6	26,3	34,7	40,2	45,8
B. 3.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,77	2,77	4,16	4,16	4,16	9,72	15,2	15,2	27,7	31,9	38,8
Contr (-)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B. 2.1.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,38	1,38	1,38	4,16	4,16	8,33	19,4	25	34,7	36,1	43,0
B. 1.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,38	1,38	1,38	2,77	4,16	9,72	16,6	22,2	27,7	37,5	44,4

* Datos de severidad, son el resultado del promedio de tres repeticiones por tratamiento.

Anexo 6: Análisis estadístico para el porcentaje de inhibición (PI) en las pruebas de antagonismo *in vitro* tipo II.

- Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición (PI) (Tomado del Programa R).

summary (anova) PI

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Tto.*	11	37931	3448	238.54	< 2.2e-16 ***
Residuals	84	1214	14		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

- Prueba de comparación múltiple de Tukey HSD para el porcentaje de inhibición (PI) (Tomado del Programa R)

HSD Test for PI	
Alpha	0.050000
Error Degrees of Freedom	84.000000
Error Mean Square	14.455709
Critical Value of Studentized Range	4.754551
Honestly Significant Difference	6.391226
Means with the same letter are not significantly different.	

Anexo 7: Análisis estadístico para N° esporas.ml⁻¹ en las pruebas de antagonismo *in vitro* tipo II.

- Análisis de varianza para el N° esporas.ml⁻¹ (Tomado del Programa R).

summary (anova) N° esporas.ml⁻¹

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Tto.	11	1.3139e+15	1.1945e+14	108.23	< 2.2e-16 ***
Residuals	84	9.2709e+13	1.1037e+12		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

- Prueba de comparación múltiple de Tukey HDS para el N° esporas.ml⁻¹ (Tomado del Programa R)

HSD Test for N°Esporas.ml ⁻¹	
Alpha	5.000000e-02
Error Degrees of Freedom	8.400000e+01
Error Mean Square	1.103673e+12
Critical Value of Studentized Range	4.754551e+00
Honestly Significant Difference	1765976
Means with the same letter are not significantly different.	

Anexos 8: Análisis estadístico para N° esporas.cm⁻² en las pruebas de antagonismo *in vitro* tipo II.

- Análisis de varianza para el N° esporas. cm⁻² (Tomado del Programa R).

summary (anova) N° esporas.cm ⁻²					
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
C	11	5.4148e+13	4.9225e+12	33.84	< 2.2e-16 ***
Residuals	84	1.2219e+13	1.4546e+11		
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

- Prueba de comparación múltiple de Tukey HSD para el N° esporas.cm⁻² (Tomado del Programa R)

HSD Test for N° esporas.cm ⁻²	
Alpha	5.000000e-02
Error Degrees of Freedom	8.400000e+01
Error Mean Square	1.454643e+11
Critical Value of Studentized Range	4.754551e+00
Honestly Significant Difference	641124.9
Means with the same letter are not significantly different.	

Anexo 9: Análisis estadístico para los ensayos de germinación

- Análisis de varianza para el valor de germinación (GV, por sus siglas en ingles) (Tomado del Programa R).

summary (anova) Valor de Germinación (GV)					
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
C	7	15.118	2.160	0.3131	0.9374
Residuals	16	110.361	6.898		

- Análisis de varianza para el porcentaje de germinación (Tomado del Programa R).

summary (anova) % Germinación					
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
C	7	141.41	20.20	0.2358	0.9699
Residuals	16	1370.83	85.68		

Anexo 10: Análisis estadístico para el área bajo la curva del el progreso de la Incidencia (ABCPI) durante 23 días de *F. oxysporum* sobre plantas de uchuva

- Análisis de varianza para ABCDI (Tomado del Programa R)

summary (anova) ABCDI											
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)						
C	6	911.90	151.98	17.831	8.081e-06 ***						
Residuals	14	119.33	8.52								
Signif. codes:	0	****	0.001	***	0.01	**	0.05	.	0.1	'	1

- Prueba de comparación múltiple de Tukey HSD para ABCPI de la Incidencia (Tomado del Programa R)

HSD Test for AUDPC	
Alpha	0.050000
Error Degrees of Freedom	14.000000
Error Mean Square	8.523810
Critical Value of Studentized Range	4.828954
Honestly Significant Difference	8.139718
Means with the same letter are not significantly different.	

Anexo 11: Análisis estadístico para el área bajo la curva del progreso de la Severidad (ABCPS) durante 23 días de *F. oxysporum* sobre plantas de uchuva.

- Análisis de varianza para la ABCPS (Tomado del Programa R)

summary (anova) ABCPS					
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
C	6	44870	7478	13.374	4.351e-05 ***
Residuals	14	7828	559		
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

- Prueba de comparación múltiple de Tukey HSD para ABCPS (Tomado del Programa R)

HSD Test for AUDPC	
Alpha	0.050000
Error Degrees of Freedom	14.000000
Error Mean Square	559.142742
Critical Value of Studentized Range	4.828954
Honestly Significant Difference	63.92556
Means with the same letter are not significantly different	

Anexo 12: Análisis estadístico del Área Foliar

- Análisis de varianza para el Área foliar (AF) (Tomado del programa R)

```
> summary (anova) AF
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
T	7	37.827	5.404	10.371	6.491e-05 ***
Residuals	16	8.337	0.521		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

- Prueba de comparación múltiple de Tukey HSD para el Área Foliar (AF) (Tomado del programa R)

HSD Test for AF	
Alpha	0.0500000
Error Degrees of Freedom	16.0000000
Error Mean Square	0.5210438
Critical Value of Studentized Range	4.8962205
Honestly Significant Difference	2.040504
Means with the same letter are not significantly different.	

Anexo 13: Análisis estadístico de la longitud del tallo (LT)

- Análisis de varianza para la longitud del tallo (LT) (Tomado del programa R)

```
> summary (anova) LT
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
T	7	19.5644	2.7949	5.4176	0.002489 **
Residuals	16	8.2544	0.5159		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

- Prueba de comparación múltiple de Tukey HSD para la longitud del tallo (LT) (Tomado del programa R)

HSD Test for LT	
Alpha	0.0500000
Error Degrees of Freedom	16.0000000
Error Mean Square	0.5158993
Critical Value of Studentized Range	4.8962205
Honestly Significant Difference	2.030406
Means with the same letter are not significantly different.	

Anexo 14: Análisis estadístico para el peso seco

- Análisis de varianza para el peso seco de la parte aérea (PSA)

summary (anova) PSA					
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
TR	7	0.171494	0.024499	15.581	4.714e-06 ***
Residuals	16	0.025158	0.001572		
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

- Prueba de comparación múltiple de Tukey HSD del peso seco para la parte aérea (PSA)

HSD Test for PSA	
Alpha	0.050000000
Error Degrees of Freedom	16.000000000
Error Mean Square	0.001572399
Critical Value of Studentized Range	4.896220465
Honestly Significant Difference	0.1120938
Means with the same letter are not significantly different.	

- Análisis de varianza para el peso seco de la raíz (PSR)

summary (anova) PSR						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
TR	7	0.089401	0.012772	8.9681	0.0001565 ***	
Residuals	16	0.022786	0.001424			
Signif. codes:	0 '***'	0.001 '**'	0.01 '*'	0.05 '.'	0.1 ''	1

- Prueba de comparación múltiple de Tukey HSD del peso seco para la raíz (PSR)

HSD Test for PSR	
Alpha	0.050000000
Error Degrees of Freedom	16.000000000
Error Mean Square	0.001424108
Critical Value of Studentized Range	4.896220465
Honestly Significant Difference	0.1066772
Means with the same letter are not significantly different.	