



**AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE *Pseudomonas* sp., y *Bacillus* sp., PROMOTORAS
DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN CULTIVO DE UCHUVA (*Physalis peruviana* L.)
CON ACTIVIDAD ANTAGÓNICA FRENTE A *Fusarium oxysporum***

DIANA CAROLINA CAVIEDES ALARCÓN

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial para optar por el título de
MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL

BOGOTÁ D.C.

2010



**AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE *Pseudomonas* sp., y *Bacillus* sp., PROMOTORAS
DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN CULTIVO DE UCHUVA (*Physalis peruviana* L.)
CON ACTIVIDAD ANTAGÓNICA FRENTE A *Fusarium oxysporum***

DIANA CAROLINA CAVIEDES ALARCÓN

JIMMY ALEXANDER ZAPATA NARVÁEZ B.Sc.
Director

ANDRÉS DÍAZ M.Sc.
Codirector

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL

BOGOTÁ D.C.

2010

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por qué no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946



**AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE *Pseudomonas* sp., y *Bacillus* sp., PROMOTORAS
 DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN CULTIVO DE UCHUVA (*Physalis peruviana* L.)
 CON ACTIVIDAD ANTAGÓNICA FRENTE A *Fusarium oxysporum***

APROBADO

Jimmy Alexander Zapata Narváez
DIRECTOR

Andrés Díaz M.Sc.
CODIRECTOR

María Clemencia Forero de la Rotta
JURADO

Ingrid Schuler, Ph.D
DECANA ACADÉMICA

Janeth Arias, M.Sc
DIRECTORA DE CARRERA

TABLA DE CONTENIDO

INDICE DE TABLAS	VII
INDICE DE FIGURAS	VIII
ANEXOS	IX
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUCCIÓN	12
2. MARCO TEÓRICO	13
2.1. <i>Physalis peruviana</i> L	13
2.2. Situación actual del cultivo de uchuva en Colombia	13
2.3. Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR)	15
3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
4. OBJETIVOS	19
5. MATERIALES Y MÉTODOS	20
5.1. Colección muestras de raíces de plantas sanas de uchuva (<i>Physalis peruviana</i> L.)	20
5.2. Aislamiento de los géneros <i>Pseudomonas</i> sp. y <i>Bacillus</i> sp. a partir de la rizosfera de uchuva (<i>Physalis peruviana</i> L.)	20
5.3. Determinación del efecto de los aislamientos sobre la germinación de las semillas de uchuva (<i>Physalis peruviana</i> L.)	21
5.4. Evaluación cualitativa de la solubilización de fosfato tricalcico por <i>Pseudomonas</i> sp. y <i>Bacillus</i> sp.	21
5.5. Determinación de la actividad antagónica de <i>Pseudomonas</i> sp. y <i>Bacillus</i> sp. contra <i>Fusarium oxysporum</i>	22
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
6.1. Aislamiento de <i>Pseudomonas</i> sp. y <i>Bacillus</i> sp. a partir de la rizosfera de uchuva (<i>Physalis peruviana</i> L.)	23
6.2. Efecto de <i>Pseudomonas</i> sp. y <i>Bacillus</i> sp sobre la germinación de las semillas de uchuva (<i>Physalis peruviana</i> L.)	24
6.3. Evaluación cualitativa de la solubilización de fosfato tricalcico por <i>Pseudomonas</i> sp. y <i>Bacillus</i> sp.	28
6.4. Determinación de la actividad antagónica de <i>Pseudomonas</i> sp. y <i>Bacillus</i> sp. contra <i>Fusarium oxysporum</i> .	29
7. CONCLUSIONES	32
8. RECOMENDACIONES	32
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Caracterización de los aislamientos de <i>Pseudomonas</i> sp., obtenidos en medio de cultivo King B.	23
Tabla 2: Caracterización de los aislamientos de <i>Bacillus</i> sp., obtenidos en medio de cultivo LB.	24
Tabla 3. Aislamientos promisorios en la promoción del crecimiento de las semillas de uchuva	27
Tabla 4. Solubilización cualitativa del fosfato por los aislamientos de <i>Pseudomonas</i> sp., y <i>Bacillus</i> sp., en medio SRS.	29
Tabla 5. Comparación porcentual de las variables de porcentaje de germinación, longitud de raíz y longitud del tallo, solubilización del fósforo y antagonismo.	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cultivo de uchuva (<i>Phytolacca peruviana</i> L.)	13
Figura 2. Síntomas del marchitamiento vascular en plantas de uchuva, (A) Planta marchita, (B) Necrosis en el cuello de la raíz, (C) Taponamiento vascular evidenciado por la colonización del xilema por estructuras de <i>F. oxysporum</i> . (D) Colonia de <i>F. oxysporum</i> en agar papa dextrosa.	15
Figura 3. Observación microscópica (100X) de las rizobacterias seleccionadas a). <i>Pseudomonas</i> sp. b) <i>Bacillus</i> sp. c) Fluorescencia <i>Pseudomonas</i> sp. bajo Luz UV.	23
Figura 4. Porcentaje de germinación de las semillas de uchuva inoculadas con <i>Pseudomonas</i> sp., y <i>Bacillus</i> sp., después de 20 días de incubación	25
Figura 5. Longitud de la raíz de las plántulas de uchuva inoculadas con <i>Pseudomonas</i> sp., y <i>Bacillus</i> sp., después de 20 días de incubación	26
Figura 6. Longitud del tallo de las plántulas de uchuva inoculadas con <i>Pseudomonas</i> sp., y <i>Bacillus</i> sp., después de 20 días de incubación	27
Figura 7: Semillas de uchuva después de 20 días de inoculación. (A) Testigo absoluto. (B) sp., aislamiento Bs03 .	28
Figura 8. Solubilización de fósforo en el medio SRS con el Tratamiento <i>Bacillus</i> aislamiento Pf 06, después de 6 días de incubación. (A). Halos de solubilización. (B) Halos de acidificación en medio.	29
Figura 9: Porcentaje de Inhibición del crecimiento micelial de <i>F. oxysporum in vitro</i> , con las rizobacterias después de 7 días de incubación	30
Figura 10: Crecimiento de <i>F. oxysporum</i> en la prueba de antibiosis. (A) Enfrentamiento con el aislamiento Bs03. (B) Testigo patógeno	31

ANEXOS

Anexo 1. Medios de cultivo.	38
Anexo 2. Estadística efecto de <i>Pseudomonas</i> sp., y <i>Bacillus</i> sp., sobre la germinación de semillas de uchuva.	39
Anexo 3. Estadística efecto de <i>Pseudomonas</i> sp., y <i>Bacillus</i> sp., sobre la elongación de la raíz de las semillas de uchuva.	40
Anexo 4. Estadística efecto de <i>Pseudomonas</i> sp. y <i>Bacillus</i> sp., sobre la elongación del tallo de las semillas de uchuva.	41
Anexo 5. Estadística solubilización cualitativa del fosfato por <i>Pseudomonas</i> sp.	42
Anexo 6. Estadística capacidad antagónica de <i>Pseudomonas</i> sp., y <i>Bacillus</i> sp.	43

RESUMEN

El marchitamiento vascular producido por el hongo *Fusarium oxysporum* es una de las enfermedades más limitantes en el cultivo de uchuva; con el objetivo de controlar esta enfermedad y mejorar las características del cultivo de uchuva un total de veinte aislamientos: catorce pertenecientes al género *Pseudomonas* sp., y seis pertenecientes al *Bacillus* sp., se aislaron a partir de la rizosfera de plantas sanas de uchuva de los municipios de Cómbita (Boyacá) y Granada (Cundinamarca). Estos aislamientos se evaluaron en su capacidad de promover la germinación de semillas de uchuva, solubilización cualitativa del fosfato y actividad antagónica *in vitro*. Los 20 aislamientos aumentaron el porcentaje de germinación de las semillas de uchuva sin embargo solo 18 aislamientos aumentaron la longitud de la raíz y el tallo de las plántulas de uchuva respecto al control, destacándose los aislamientos Pf09, Pf11, Pf14, Bs01, Bs02 y Bs03. La solubilización cualitativa del fosfato se detectó en el género *Pseudomonas* sp,. La mayoría de los aislamientos presentaron un porcentaje de inhibición micelial *in vitro* de *F. oxysporum* superior al 30%, el aislamiento Bs03 mostró el mayor porcentaje de inhibición del patógeno con un 63%. Se seleccionaron los aislamientos Pf02, Pf05, Pf09, Pf11, Pf13, Bs01, Bs02, Bs03, Bs04, Bs05 y Bs06 por su capacidad promotora en la germinación de semillas y crecimiento de las plántulas de uchuva y capacidad antagónica frente *F. oxysporum*.

Palabras claves: Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., actividad antagónica, solubilización del fosfato.

ABSTRACT

Vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* is one of the most limiting diseases in the Cape gooseberry crop, with the aim of controlling this disease and to improve crop characteristics of Cape gooseberry a total of twenty isolates: fourteen belonging to the genus *Pseudomonas* sp. and six belonging to *Bacillus* sp. were isolated from the rhizosphere of healthy plants of Cape gooseberry in the C6mbita (Boyac6) and Granada (Cundinamarca) municipalities. These isolates were evaluated for their ability to promote plant growth in Cape gooseberry seeds, phosphate solubilization qualitative and antagonistic activity *in vitro*. 20 isolates increased the percentage of seed germination of Cape gooseberry, however, only 18 isolates increased root length and stem Cape gooseberry seedlings compared to control, especially the isolates Pf09, Pf11, Pf14, Bs01, Bs02 and Bs03.. The solubilization of phosphate was detected qualitatively in the genus *Pseudomonas* sp.. Most of the isolates displayed > 30% inhibition of *in vitro* micelial growth of *F. oxysporum*, 63% showed Bs03. Pf02, Pf05, Pf09, Pf11, Pf13, Bs01, Bs02, Bs03, Bs04, Bs05 y Bs06 isolates were selected for improve germination and growth of Cape gooseberry seeds and antagonistic activity against *F. oxysporum*.

KEYWORDS: Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., antifungal activity, phosphate solubilization.

INTRODUCCIÓN

Aunque el uso de fertilizantes y plaguicidas de síntesis química en la agricultura ha permitido mejorar el rendimiento y la productividad de los cultivos al brindarle a las plantas los requerimientos nutricionales necesarios para su crecimiento y protección contra fitopatógenos e insectos plaga que en determinados momentos limitan la producción de los mismos. Sin embargo el alto consumo que se ha venido presentado en las últimas décadas de estos productos no solo ha elevado el costo de producción de los cultivos sino ha ocasionado un impacto negativo en el medio ambiente así como en la salud humana, animal y ambiental, al ser la mayoría de los casos productos con altas categorías toxicológicas.

Dentro de este contexto, el cultivo de uchuva (*P. peruviana*) no es ajeno a esta problemática ya que durante el cultivo y el periodo de fructificación se realizan constantes aplicaciones de fertilizantes, predominando la aplicación de formas asimilables de fósforo, sin embargo teniendo en cuenta que nuestros suelos agrícolas presentan alta cantidad de aluminio (Al) y hierro (Fe), las aplicaciones de estos fertilizantes son ineficientes ya que el fósforo rápidamente se une a estos elementos formando compuestos como variscita ($\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y vivianita ($\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$), formas de fósforo no asimilables por las plantas.

Sumado a lo anterior, una de las principales limitantes fitosanitarias que afecta drásticamente la producción del cultivo de uchuva es el marchitamiento vascular, enfermedad producida por el hongo *Fusarium oxysporum* que no solo reduce la producción de la fruta sino que además produce la muerte de la planta, provocando pérdidas económicas significativas. El control de esta enfermedad se realiza mediante la aplicación de fungicidas como Aliette 80 WP, Orthocide 50% WP, Validacin 3%, Store 250 EC, Cobrethane, Kocide 2000 (según agricultores de los municipios de Combita (Boyacá) y Granada (Cundinamarca)) y a muchos de los cuales el hongo ha desarrollado resistencia, además de ser un riesgo para la salud humana, animal y ambiental.

De acuerdo con esto, es necesario implementar alternativas que permitan reducir las aplicaciones de fertilizantes y fungicidas de síntesis química, siendo una de estas el uso de microorganismos eficientes que tengan la capacidad de transformar el fósforo insoluble en formas solubles, promover el crecimiento vegetal y que presenten actividad biocontroladora contra *F. oxysporum*.

Dentro de estos microorganismos, las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), principalmente los géneros *Pseudomonas* sp., y *Bacillus* sp., además de controlar diferentes fitopatógenos tienen la capacidad de solubilizar nutrientes como el fósforo, el cual aunque se encuentra en grandes concentraciones en el suelo no es asimilable por las plantas al formar compuestos insolubles con elementos como Al y Fe; y la capacidad de estimular el crecimiento de las plantas por la producción de fitohormonas.

MARCO TEÓRICO

UCHUVA *Physalis peruviana* L.

La uchuva (*P. peruviana* L.) es una planta perenne y arbustiva perteneciente a la familia de las solanáceas, y al género *Physalis* que incluye según Legge en 1974 citado por Fisher *et al*, 2000 alrededor de 100 especies caracterizadas por la formación y permanencia de sus frutos en un cáliz acrecente o capacho (Fisher *et al*, 2000).

La planta de uchuva alcanza una altura entre 1 a 2,5 m, posee hojas simples acorazonadas dispuestas de forma alterna en la planta, sus raíces fibrosas se encuentran entre 10 a 15 cm de profundidad que se desarrollan de acuerdo al tipo y textura del suelo, aireación, temperatura y humedad del mismo (Fisher *et al*, 2000). Su fruto es una baya jugosa globosa u ovoide con un diámetro entre 1.25 y 2.5 cm, y un peso de 4 a 5g, de color amarillo- naranja en su madurez, cubierto por un cáliz formado por cinco sépalos que le protege contra insectos, pájaros, patógenos y condiciones climáticas extremas; se caracteriza por tener un fruto azucarado, alto nivel de ácido ascórbico, B- caroteno, complejo vitamina B, fósforo y hierro (Fisher *et al*, 2000).



Figura 1. Cultivo de uchuva. (A) Planta de uchuva (B) Vista general del cultivo de uchuva de la finca Milagro, en el municipio de Combita, Boyacá.

SITUACIÓN ACTUAL DEL CULTIVO DE UCHUVA EN COLOMBIA

En Colombia el cultivo de uchuva, es uno de los frutales de mayor importancia debido a los ingresos generales por concepto de las exportaciones a países como Alemania, Reino Unido, Suecia, Francia Bélgica y Luxemburgo, donde la fruta es apreciada por sus excelentes características organolépticas comparados con los frutos obtenidos de cultivos de países como Zimbabwe, Malasia, China, Kenia y Sudáfrica. Se ha venido observando un aumento en las hectáreas sembradas en los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Antioquia, Magdalena,

Huila, Nariño, Tolima, Cauca, pasando de 34.4 hectáreas cultivadas en 1994 a 360 hectáreas cultivadas en el 2004 (FNFH-ASOHOFRUCOL según Fisher *et al*, 2005) solo en Cundinamarca se alcanza el 75% de la producción con 273 hectáreas sembradas, siendo Granada, Silvania y Fusagasugá los principales municipios productores. Al mismo tiempo se ha observado un incremento en la producción nacional, según cálculos realizados por el CCI pasando de 936 toneladas producidas en 1994 a 6.335 toneladas en el año 2000, con una tasa de crecimiento promedio anual del 36,9%, de las cuales Cundinamarca produce el 80% seguido por Antioquia con un 16% seguidos por Boyacá y Tolima.

Colombia ha pasado de exportar 748 toneladas/año en 1994 a 1850 toneladas/año en el 2000 con ganancias mayores a los 23.8 millones de dólares, al igual que el consumo aparente a nivel nacional ha aumentado a 4485 toneladas/año con un crecimiento del 74.5% anual promedio (www.agronet.gov.co). Los principales países importadores de uchuva fresca son Holanda con un volumen del 36% seguidos por Alemania con un 28%, Francia 9%, Suecia 7%, Reino Unido 5% (Fisher *et al*, 2005) siendo los meses de mayor demanda los meses de febrero, marzo, abril, mayo, octubre, noviembre y diciembre, observándose bajas en los precios US\$/ kg de uchuva en julio, octubre y enero (www.agronet.gov.co).

Al ser el cultivo de la uchuva básicamente de economía campesina se presenta un gran desconocimiento de los requerimientos nutricionales del cultivo ya que solo se basan en aquel obtenido por medio de la experiencia además de tener una baja asistencia técnica, generando una tendencia al uso excesivo de fertilizantes (entre 400-600 Kg/ha de fertilizante químico) lo cual genera daños en el crecimiento y desarrollo de la planta al crear un estrés nutricional, al brindar en unas dosis muy altas unos elementos y otros en muy baja cantidad (Ramírez *et al*, 2008), así mismo dentro de las limitantes que afectan la producción de fruta, se encuentra una deficiente fertilización principalmente con fósforo, tanto en las etapas de establecimiento como en la fructificación, básicamente se realizan la aplicación de fertilizantes con formas asimilables de fósforo, sin embargo teniendo en cuenta que estos suelos presentan alta cantidad de aluminio (Al) y hierro (Fe), las aplicaciones de estos fertilizantes son ineficientes ya que el fósforo rápidamente se une a estos elementos formando compuestos como variscita ($\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y vivianita ($\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) que no son formas de fósforo asimilables por las plantas (Rodríguez- Fraga, 1999).

Otra limitante es el marchitamiento vascular, enfermedad producido por el hongo *F. oxysporum*, la cual ha presentado una incidencia de hasta un 88% en los cultivos de la sabana de Bogotá y en municipios como Granada, Silvania y Fusagasugá (Góngora-Rojas, 2006). *F. oxysporum* se encuentra presente en el suelo ya sea en micelio o en formas de resistencia propagándose a través del agua, viento, instrumentos contaminados y trasplantes infectados. Este patógeno al tener contacto con una planta sana, germina ingresando por medio de heridas o atravesando la

corteza de las raíces secundarias hasta llegar a los vasos xilemicos, los cuales coloniza de forma ascendente hasta obstruirlos por completo, produciendo síntomas de pérdida de turgencia, clorosis, marchitamiento y secamiento lateral terminando en la muerte de la planta (Agrios, 2005).

A lo anterior se ha planteado nuevas alternativas que sean amigables con el ambiente y no solo permita el control de *F. oxysporum* sino que además le brinde a la planta los nutrientes que necesita, siendo las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal una de las estrategias mas estudiadas al mejorar el crecimiento de las plantas e inhibir gran número de fitopatógenos.



Figura 2. Síntomas del marchitamiento vascular en plantas de uchuva, (A) Planta marchita, (B) Necrosis en el cuello de la raíz, (C) Taponamiento vascular evidenciado por la colonización del xilema por estructuras de *F. oxysporum*. (D) Colonia de *F. oxysporum* en agar papa dextrosa.

RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL

La rizósfera se define como el volumen de suelo que interactúa con las raíces de las plantas de una forma química, física o biológica, permitiendo el desarrollo de diversos grupos de microorganismos debido a la presencia de exudados radicales (Lugtenberg, 2009). Estos exudados actúan como quimioatrayentes hacia la raíz, por lo que las poblaciones encontradas en cada especie de planta difieren dependiendo de la capacidad que posean estos de utilizar los diferentes metabolitos y de la forma que los microorganismo pueden influenciar cuales compuestos exudan las raíces, creando un ambiente favorable para ellos (Lucy *et al*, 2000). Así mismo el tipo de suelo, humedad, pH, temperatura, edad de la planta, humedad relativa, entre otros, va a permitir la proliferación de microorganismos benéficos, patógenos o neutrales.

Entre las bacterias que tienen un efecto positivo en el crecimiento de las plantas se encuentran las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR), las cuales actúan por mecanismos ya sean directos: proporcionándole a la planta de forma solubles de elementos como fósforo y hierro o indirectos mediante la inhibición de microorganismos patógenos mediante la competencia por

nutrientes o espacio en la raíz, producción de antibióticos, reducción del hierro disponible por sideróforos, síntesis de enzimas líticas o por la inducción de respuestas de defensa en la planta (Van Loon, 2007). Entre algunos de los beneficios en el crecimiento vegetal por la adición de PGPR se encuentra un incremento en la germinación de la semilla, un aumento en la proliferación del sistema radical, aumento en el contenido de clorofila, magnesio, nitrógeno, proteína y actividad hidráulica de la planta, disminución en la senescencia de las hojas o un mayor rendimiento (Lucy *et al*, 2000).

Entre los géneros de PGPR más conocidos están, el género *Pseudomonas* sp. que se caracteriza por ser bacilos Gram negativos rectos o curvados con un tamaño de 0.5- 1.0 x 1.5-5.0 μm ; no presentan formación de esporas; son aerobias siendo algunas capaces de utilizar el nitrato como aceptor final de electrones, crecen quimioorganotróficamente a pH neutro siendo bacterias mesofílicas y móviles por la presencia de uno o varios flagelos polares; este género está ampliamente distribuido en el medio ambiente por su capacidad de utilizar diferentes fuentes de carbono y tener bajos requerimientos nutricionales; algunas de estas especies se consideran patógenos importantes para plantas, animales y el hombre (Hendricks, 2000).

Actualmente el grupo fluorescente entre las que se encuentran *P. fluorescens*, *P. putida*, grupo filogenético gamma de las proteobacterias, ha sido de gran interés, ya que producen un amplio rango de enzimas y metabolitos que pueden tener un efecto antagónico sobre diversos fitopatógenos mediante la inducción de resistencia sistémica al activar compuestos de defensa situados en lugares diferentes al lugar donde ataca el patógeno (Saravanakumar *et al*, 2007), como es la producción de ácido salicílico (Saikia *et al*, 2003). De igual forma estas bacterias promueven el crecimiento vegetal mediante la producción de sideróforos, moléculas de bajo peso molecular que les permiten obtener micronutrientes limitantes para su desarrollo y crecimiento como es el hierro (Mercado- Bakker, 2007), producción de fitohormonas (Dey *et al*, 2004) y solubilización del fósforo mineral principalmente por la producción de ácidos orgánicos, aunque otros mecanismos se han propuesto como la producción de sustancias quelantes como ácidos inorgánicos (ácido sulfhídrico, ácido nítrico y ácido carbónico); así mismo para la mineralización del fósforo orgánico se ha descrito la producción de fosfatasa ácida y alcalina que hidrolizan los enlaces fosfoéster o fosfoanhídrido de los compuestos. (Rodríguez-Fraga, 1999)

Otro género de gran importancia es *Bacillus* sp. es un grupo de bacilos Gram positivos rectos con un tamaño de 0.5- 2.5 x 1.2-10 μm ; presentan formación de esporas ovales o redondas; móviles por flagelos peritricos; aerobios o anaerobios facultativos, crecen quimioorganotróficamente encontrándose en ambientes con diferente pH, temperatura y salinidad presentan un metabolismo fermentativo; y son catalasa positiva; ubicuos en un amplio rango de hábitat (Hendricks, 2000),

gracias a la producción de una pared celular de múltiples capas, la formación de esporas resistentes a condiciones de estrés, secreción de antibióticos y enzimas.

Especies de *Bacillus* sp., tienen actividad biocontroladora frente a un amplio rango de patógenos, por medio de tres mecanismos: antagonismo, promoción de crecimiento de la planta (Rodríguez *et al*, 1999) o la estimulación de las defensas de esta (Choudhary, Johri, 2009; Kloepper *et al*, 2004), siendo la producción de toxinas y antibióticos de las familias de las surfactinas, iturinas y fengicinas las más importantes (Ongena Jacques, 2008; Ahmad *et al*, 2008).

Tanto el género *Pseudomonas* sp. como el género *Bacillus* sp. se destacan por su acción bicontroladora frente a *Fusarium oxysporum* causante de la enfermedad marchitamiento vascular en diferentes cultivos, por ejemplo Liu *et al*, 1995 reportó que la cepa *Pseudomonas putida* 89B-27 indujo resistencia sistémica contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* en raíces de plantas de pepino observando una reducción en los síntomas y el número de plantas muertas comparadas con el control. Hamed *et al*, 2009 observó como cepas de *Bacillus polymyxa* (B3) y *Pseudomonas fluorescens* (B4) redujeron la incidencia de *F. oxysporum* f. sp. *niveum* en semillas de melón en 64.7 y 59.4% respectivamente después de 4 y 8 semanas de inoculadas respecto al control. De igual forma, *Pseudomonas fluorescens* WCS374 redujo en 42% el marchitamiento producido por *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* en semillas de rábano e incremento en 45% su rendimiento (Leeman *et al* 1995). Benhamou *et al*, 1998 reportó que *Bacillus pumilus* SE34 redujo el marchitamiento producido por *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, en semillas de tomate disminuyendo los síntomas y numero de lesiones en raíces secundarias.

Actualmente cepas biocontroladoras de *Pseudomonas* sp. fluorescentes y *Bacillus* sp., se han incluido en la formulación de bioplaguicidas y se encuentran en el mercado aplicándose como productos secos, suspensiones, etc. Entre estos productos se incluyen: *Bacillus subtilis* GB03 (Kodiak;Gustafson), MBI 600 (Subtilex; Becker Underwood) y QST 713 (Serenade;AgraQuest), *Bacillus pumilus* GB34 (YieldShield;Gustafson), *Bacillus licheniformis* SB3086 (EcoGuard;Novozymes), una mezcla de *B. subtilis* GB122 y algunas cepas de *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas chlororaphis* (Cedomon; BioAgri) (Haas-Defago, 2005).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La uchuva (*Physalis peruviana* L.) es una de las frutas de gran importancia económica en Colombia, con altos índices de exportación, debido a su exquisitez y valor nutricional, al pasar de exportar 1.6 millones de dólares en 1991 a 23.8 millones de dólares en el 2005 equivalentes a un total de 6421,6 toneladas según Proexport en el 2005 citado por Piñeiro- Díaz, 2007, siendo países europeos como Alemania (30.4%), Reino Unido (9.9%), Suecia (6.1%) Francia (5.8%), Bélgica y Luxemburgo (12.4%) los principales importadores con un 97% de la uchuva exportada y Asia, Canadá y Estados Unidos el 3% restante. Adicionalmente, se presenta la posibilidad de expandir el porcentaje de exportaciones a Suiza, España, Brasil, Italia y Hong Kong.

Desde 1985 se ha considerado a la uchuva como un cultivo promisorio de gran importancia económica, en los departamentos de Cundinamarca, Antioquia, Boyacá, Cauca, Huila, Tolima y Nariño, observando un aumento en las hectáreas sembradas en estos departamentos pasando de 34.4 hectáreas cultivadas en 1994 a 360 hectáreas cultivadas en el 2004, alcanzando solo en Cundinamarca el 75% de la producción con 273 hectáreas sembradas, siendo los municipios de Granada, Silvania y Fusagasugá los principales productores.

No obstante a la creciente demanda de uchuva, se ha hecho necesaria la aplicación de fertilizantes de síntesis química que suministren los nutrientes necesarios para el crecimiento de la planta y obtener mayor producción de frutos, lo que ha ocasionado un uso inadecuado de estos compuestos como son los fertilizantes a base de fosfatos, los cuales, al incorporarse al suelo se unen a elementos como Al y Fe transformándose en formas insolubles.

De otra parte, el marchitamiento vascular, enfermedad producida por el hongo *F. oxysporum* reduce la producción de la fruta, además de provocar la muerte de la planta, causa pérdidas económicas significativas, sin presentar una estrategia de control eficiente.

De acuerdo con esto, es necesario implementar alternativas que permitan reducir las aplicaciones de fertilizantes y fungicidas de síntesis química, utilizando rizobacterias que tengan la capacidad solubilizar fósforo, promover el crecimiento vegetal y que presenten actividad biocontroladora contra *F. oxysporum*.

OBJETIVO GENERAL

Aislar y seleccionar de la rizosfera de plantas de uchuva *Pseudomonas sp.*, y *Bacillus sp.*, promotoras del crecimiento vegetal con actividad antagónica frente a *Fusarium oxysporum*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Conformar una colección de *Pseudomonas sp.*, y *Bacillus sp.*, aislados de la rizosfera de plantas de uchuva de cultivos comerciales.

Seleccionar aislamientos de *Pseudomonas sp.*, y *Bacillus sp.*, con capacidad para promover el crecimiento vegetal.

Seleccionar aislamientos de *Pseudomonas sp.*, y *Bacillus sp.*, con actividad antagonista “*in vitro*” sobre *F. oxysporum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de laboratorio se realizó en el Laboratorio de Control Biológico (LCB) del Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB) de Corpoica (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria), ubicado en el Centro de Investigación de Tibaitatá en el Km 14 vía Mosquera.

COLECTA DE MATERIAL VEGETAL

Se colectaron un total de siete muestras de raíces de plantas sanas de uchuva (*Physalis peruviana* L.) en cinco cultivos comerciales, dos en el municipio de Cómbita (Boyacá) y tres en el municipio de Granada (Cundinamarca). De cada cultivo se seleccionaron cuatro plantas sanas (en focos en los cuales se presentaban plantas con síntomas de marchitamiento vascular) a partir de las cuales se extrajeron raíces secundarias, en una profundidad no mayor a 15 cm, se transfirieron cuidadosamente a bolsas de papel debidamente rotuladas y se trasladaron en nevera de icopor al LCB, almacenándose a 4°C hasta su procesamiento.

AISLAMIENTO RIZOBACTERIAS.

De cada cultivo se conformó una muestra compuesta, se cortaron las raíces secundarias en pedazos de 5 mm hasta pesar 10 g, se lavaron con agua estéril para remover el suelo adherido y se transfirieron a 90 mL de solución salina 0,85% (v/v). Se colocaron en agitación constante a 150 r.p.m. durante 30 minutos, se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-6} y se sembró una alícuota de 0.1 mL de las diluciones 10^{-4} a 10^{-6} por triplicado en agar King B (KB) para *Pseudomonas* spp.; en tanto que para *Bacillus* spp. se colocaron los tubos de las diluciones 10^{-4} a 10^{-6} en un baño termostatado a 80°C por 20 minutos (Díaz et al, 2009), posteriormente se sembraron (0,1 mL) por triplicado en agar Luria Bertoni (LB). Las cajas de Petri se incubaron a 28°C durante 48 horas.

Se seleccionaron las colonias que presentaron color, tamaño y textura representativos a los géneros de interés; además en agar King B se tuvo en cuenta que las colonias presentarían fluorescencia al colocarlas bajo Luz UV (366 nm) (Díaz et al, 2009). A partir de estas colonias se realizaron aislamientos en los medios de cultivo respectivos hasta obtener colonias puras realizando observaciones macro y microscópicas, adicionalmente se realizaron las pruebas de citocromo oxidasa y catalasa a las 24 horas como caracterización preliminar de los géneros *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. (Idris et al, 2007).

Para descartar la posible presencia de *P. aeruginosa* se realizaron cultivos de las colonias obtenidas en agar King B en agar cetrimide incubándolas a 37°C por 48 h. Al cabo de 24 h y 48 h se examinaron los cultivos y aquellos aislamientos que presentaron pigmentación azul/verde o

marrón rojiza, debido a la producción de piocianina o pioverdina se consideraron positivos para el ensayo. Además se realizó como prueba confirmatoria el crecimiento a 42°C para los aislamientos que dieron positivos en la prueba anterior (Massana *et al*, 2010). Los aislamientos seleccionados se crioconservaron en una solución de glicerol 10% (v/v) y peptona 0.1% (p/v) a -70°C.

EFFECTO DE LOS AISLAMIENTOS SOBRE LA GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE UCHUVA

Se realizó un cultivo líquido para cada uno de los aislamientos de rizobacterias en erlenmeyers de 125mL con 25mL de caldo LB, los cuales se mantuvieron en agitación constante a 150 rpm a 28°C durante 48 horas. Posteriormente se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el precipitado fue lavado 2 veces con solución de NaCl al 0,85%, obteniendo así la biomasa, ésta se resuspendió en una solución de carboximetilcelulosa al 2% y se ajustó su concentración a $1,2 \times 10^9$ U.F.C/mL por medio del tubo 4 del patrón de MacFarland .

Paralelamente las semillas de uchuva (seleccionadas en uno de los cultivos, por uno de los productores a partir de frutos de plantas sanas con alta producción de fruta) se colocaron en baño termostático a 48°C por 2 horas, se dejaron secar en cabina de flujo laminar, se desinfectaron sumergiéndolas en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 30 segundos y posteriormente se lavaron tres veces con agua destilada estéril. La inoculación de las semillas se realizó, sumergiéndolas en una suspensión de cada una de las rizobacterias durante 10 minutos, posteriormente se dejaron secar en cabina de flujo laminar y se colocaron en cámaras húmedas (la unidad experimental fue una caja Petri con 20 semillas, cada tratamiento tuvo tres réplicas). Se contó como testigo absoluto las semillas sumergidas en agua destilada estéril. Los tratamientos se incubaron a 26°C en completa oscuridad durante 20 días, realizando mediciones diarias, las variables evaluadas fueron el porcentaje de germinación de las semillas y la longitud de la raíz y del tallo, comparando los resultados obtenidos en el control. Para los datos de porcentaje de germinación de las semillas de uchuva se realizó un análisis y homogeneidad de varianza (ANOVA) y comparación de medias de tratamientos con la prueba de Tukey con un 95% de confianza, y para los datos de elongación de raíz y tallo se realizó un análisis y homogeneidad de varianza (ANOVA) y comparación de medianas con un test de Kruskal- wallis con un 95% de confianza.

EVALUACIÓN CUALITATIVA DE SOLUBILIZACIÓN DEL FOSFATO

La solubilización del fosfato tricalcico por parte de los aislamientos se detectó por la formación de halos transparentes alrededor de la colonia y acidificación del medio de cultivo Sundara Rao y Sinha

(SRS), (Anexo 1) el cual tiene como indicador de pH púrpura de bromocresol. Este ensayo se realizó empleando la técnica de anillos plásticos (Caballero- Camelo, 2003). Se sembraron 50 µL de la suspensión de cada aislamiento ajustado por medio del tubo 2 del patrón de MacFarland a una concentración de 6×10^8 UFC/mL en tres pozos realizados previamente por medio de pitillos en el medio de cultivo por triplicado. Se incubaron las cajas de Petri a 28°C por 6 días. Se midieron los halos de solubilización, desde la mitad del anillo hasta el extremo del halo de solubilización en los días 2, 4, 6. Se realizó un análisis ANOVA y se compararon las medias de los tratamientos con un test de Tukey con un 95% de confianza.

ACTIVIDAD ANTAGÓNICA *in vitro*

La actividad antagónica de cada una de las rizobacterias aisladas contra *F. oxysporum* se determinó mediante la inhibición por antibiosis en agar papa dextrosa (PDA) (Ochoa, 1996). Se colocaron discos de agar de 5 mm de cada aislamiento en cuatro puntos equidistantes con una distancia de 1.5 cm tomados a partir del borde de una caja Petri (dos en la parte superior y dos en la parte inferior) por triplicado y se incubaron a 28°C por 48h. Discos de agar PDA de 5mm con *F. oxysporum* se cortaron de aislamientos de 15 días de edad y se colocaron en el centro de las cajas con las rizobacterias previamente sembradas, incubándose a 25°C por 7 días. Se utilizó como control el crecimiento solo de *F. oxysporum* en agar PDA. El radio de la colonia fúngica se midió con un calibrador y se calculó el porcentaje de inhibición micelial del patógeno con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición: } \frac{(R-r)}{R} * 100$$

R: Radio máximo de la colonia fúngica en el control.

r: Radio de la colonia fúngica enfrentada al aislamiento.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y se compararon las medias de los tratamientos con un test de Tukey con un 95% de confianza.

ANÁLISIS DE COMPARACIÓN MULTICRITERIO

La selección de las rizobacterias se llevó a cabo por medio de un análisis de comparación multicriterio en el cual a las variables de porcentaje de germinación, elongación de la raíz y del tallo de las semillas de uchuva, capacidad fosfatosolubilizadora de los aislamientos y antagonismo frente *F. oxysporum* se le asignó un porcentaje de valor, obteniendo de esta manera las rizobacterias que copilaban los mejores resultados.

RESULTADOS Y DISCUSION

ASLAMIENTO DE RIZOBACTERIAS

A partir de las muestras de raíces colectadas, fueron seleccionados 14 aislamientos de *Pseudomonas* sp., tomando como criterio de selección las características macroscópicas como la fluorescencia que estas bacterias presentaron en agar King B y características microscópicas como (bacilos Gram negativos, motiles) (Figura 3A y 3C); igualmente se seleccionaron 6 aislamientos de *Bacillus* sp., de acuerdo con las características macro y microscópicas (bacilos Gram positivos, esporulados) (Figura 3B). De acuerdo con las pruebas bioquímicas de citocromo oxidasa y catalasa se realizó una identificación preliminar de los aislamientos. Los aislamientos de *Pseudomonas* sp, fueron codificados con las letras Pf. y los de *Bacillus* sp., con la letra Bs. (Tabla 1 y 2).



Figura 3. Observación microscópica (100x) de las rizobacterias seleccionadas. (A) *Pseudomonas* sp. (B) *Bacillus* sp. (C) Fluorescencia de *Pseudomonas* sp, bajo Luz UV.

Tabla 1: Caracterización de los aislamientos de *Pseudomonas* spp., obtenidos en medio de cultivo King B

AISLAMIENTO	COLORACIÓN GRAM	FORMA	ENDOSPORA	CATALASA	CITOCROMO OXIDASA	FLUORESCENCIA SI / NO	CRECIMIENTO (42°C) AGAR CETRIMIDE
Pf01	-	Bacilo	Ausente	Positiva	Positiva	SI	-
Pf02	-	Bacilo	Ausente	Positiva	Positiva	SI	-
Pf03	-	Bacilo	Ausente	Positiva	Positiva	SI	-
Pf04	-	Bacilo	Ausente	Positiva	Positiva	SI	-
Pf05	-	Bacilo	Ausente	Positiva	Positiva	SI	-
Pf06	-	Bacilo	Ausente	Positiva	Positiva	SI	-
Pf07	-	Bacilo	Ausente	Positiva	Positiva	SI	-
Pf08	-	Bacilo	Ausente	Positiva	Positiva	SI	-
Pf09	-	Bacilo	Ausente	Positiva	Positiva	SI	-
Pf10	-	Bacilo	Ausente	Positiva	Positiva	SI	-
Pf11	-	Bacilo	Ausente	Positiva	Positiva	SI	-
Pf12	-	Bacilo	Ausente	Positiva	Positiva	SI	-
Pf13	-	Bacilo	Ausente	Positiva	Positiva	SI	-
Pf14	-	Bacilo	Ausente	Positiva	Positiva	SI	-

Los géneros *Pseudomonas* sp., y *Bacillus* sp., son una importante fracción de las poblaciones microbianas aisladas a partir de la rizosfera, las cuales han sido constantemente relacionados con la promoción del crecimiento en plantas y la inhibición de un amplio rango de patógenos, lo cual se debe a su capacidad de colonizar diferentes partes de la raíz incluyendo partes internas, la capacidad de utilizar exudados radicales, competir con otros microorganismos y ser capaces de adaptarse a diferentes condiciones de estrés ambiental (Weller, 2007).

TABLA 2: Caracterización de los aislamientos obtenidos de *Bacillus* spp., en medio de cultivo LB

AISLAMIENTO	COLORACIÓN GRAM	FORMA	ENDOSPORA	CATALASA	CITOCROMO OXIDASA
Bs01	+	Bacilo	Presente	Positiva	Negativa
Bs02	+	Bacilo	Presente	Positiva	Negativa
Bs03	+	Bacilo	Presente	Positiva	Negativa
Bs04	+	Bacilo	Presente	Positiva	Negativa
Bs05	+	Bacilo	Presente	Positiva	Negativa
Bs06	+	Bacilo	Presente	Positiva	Negativa

EFFECTO DE LOS AISLAMIENTOS SOBRE LA GERMINACION DE LAS SEMILLAS DE UCHUVA

Los aislamientos de *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp., no presentaron diferencias significativas en el porcentaje de germinación con respecto al control, sin embargo los aislamientos Pf13 (96.7%), Pf14 (96.7%), Bs01 (95%) Bs03 (98.3%) y Bs04 (96.7%) presentaron un aumento en un orden de magnitud del 17% en comparación con el control (78%), indicando la estimulación de la germinación por la producción de fitohormonas (Anexo 2). Resultados similares fueron obtenidos por Niranjani *et al*, 2004 los cuales determinaron el efecto de cepas de *P. fluorescens* sobre semillas de maíz obteniendo porcentajes de germinación de 92% respecto al control con 86% de germinación. Igualmente Raju *et al*, 1999 observaron un aumento en el porcentaje de germinación de semillas de sorgo infectadas con *Fusarium moniliforme* al ser tratadas con *P. fluorescens* (72.6%) con respecto al control (57.8%) y el fungicida Bavistina (61%). Solamente dos aislamientos de *Pseudomonas* sp., codificados como Pf03 y Pf04 presentaron porcentajes de germinación inferiores al control en un orden de magnitud del 10% (Figura 4).

Así mismo, las semillas de uchuva inoculadas con las rizobacterias requirieron un menor tiempo para iniciar su germinación (9^o día), destacándose los aislamientos Pf14 y Bs03 que presentaron al 15^{avo} día un porcentaje de germinación de 92.6% y 87.9% respectivamente, comparadas con el

control el cual presentó solo 23.4% del porcentaje de germinación final (20^{avo} día), iniciando su germinación en el 14^{avo} día, igual que los tratamientos Pf03 y Pf04.

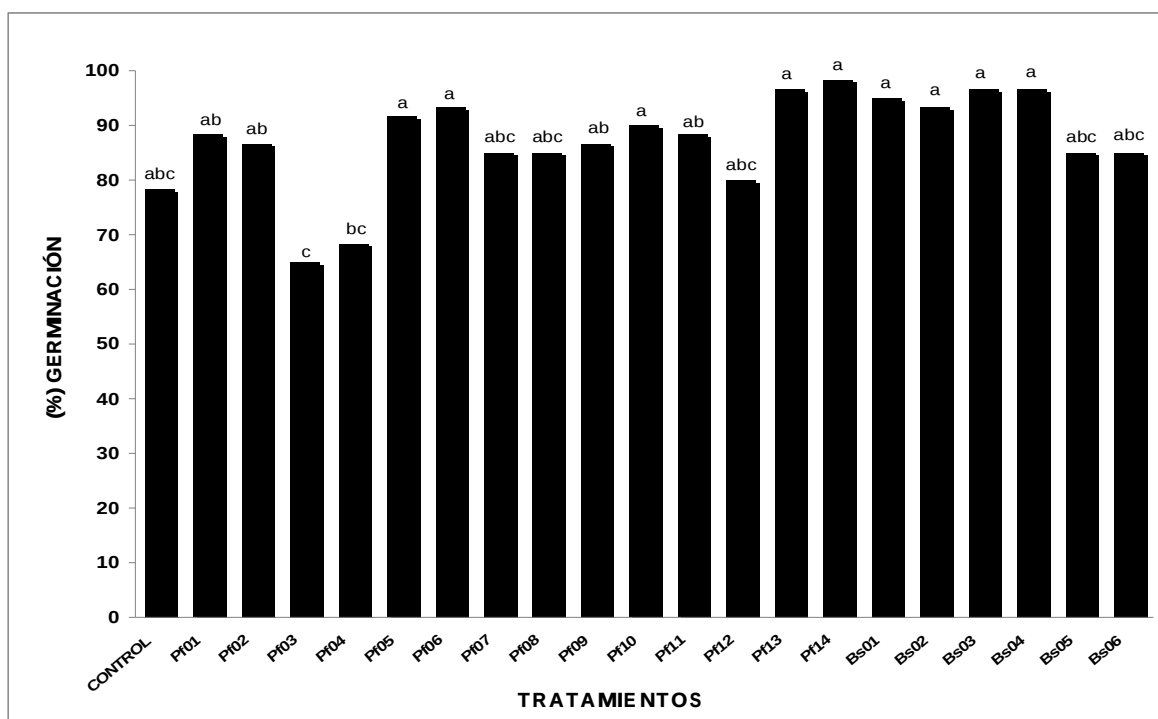


Figura 4: Porcentaje de germinación de las semillas de uchuva inoculadas con *Pseudomonas* sp., y *Bacillus* sp., después de 20 días de incubación. Las medias seguidas con la misma letra en columnas diferentes no presentan diferencias significativas entre sí con el test de Tukey ($P < 0.05$)

Los aislamientos Pf09, Pf11, Pf14, Bs01, Bs02 y Bs03 presentaron el mayor incremento para la longitud de la raíz con valores entre 21.9 mm y 27.1 mm, comparados con el control cuya longitud de la raíz fue de 10.3 mm (Figura 5, Anexo 3); en cuanto a la longitud del tallo en caja de Petri los aislamientos Pf02, Pf08, Pf09, Pf10, Pf11, Pf12, Pf13, Pf14, Bs01, Bs02, Bs03 y Bs04 presentaron los valores más altos entre 20 mm y 28.9 mm en tanto que en el control fue de 5.6 mm (Figura 6, Figura 7. Anexo 4).

Los aislamientos Pf09, Pf11, Pf14, Bs01, Bs02 y Bs03 presentaron los mayores porcentajes de germinación e incremento en la longitud de la raíz y del tallo en las semillas de uchuva. Resultados similares reportó Boruah *et al*, 2003 quienes observaron un incremento en la longitud y biomasa de la raíz de semillas de frijol inoculadas con cepas de *Pseudomonas* sp., con respecto al control; así mismo, Desai *et al*, 2007 observó un incremento del 140% de la raíz en semillas de jatrofa (*Jatropha curcas*) inoculadas con cepas de *Bacillus* sp..

Este efecto es atribuido a la capacidad que poseen las rizobacterias de sintetizar fitohormonas como el ácido indol acético, giberelinas y citoquininas (Gutiérrez, *et al* 2001, Dey *et al*, 2004 Ortiz, *et al* 2008), así como a la capacidad de producir ciertos metabolitos volátiles; por ejemplo, Ryu *et al*, 2003 observaron un mayor crecimiento de las plántulas de *A. thaliana* que se encontraban inoculadas con *B. subtilis* capaz de producir acetoina y 2,3 butanodiol que con su mutante incapaz de sintetizar estos metabolitos.

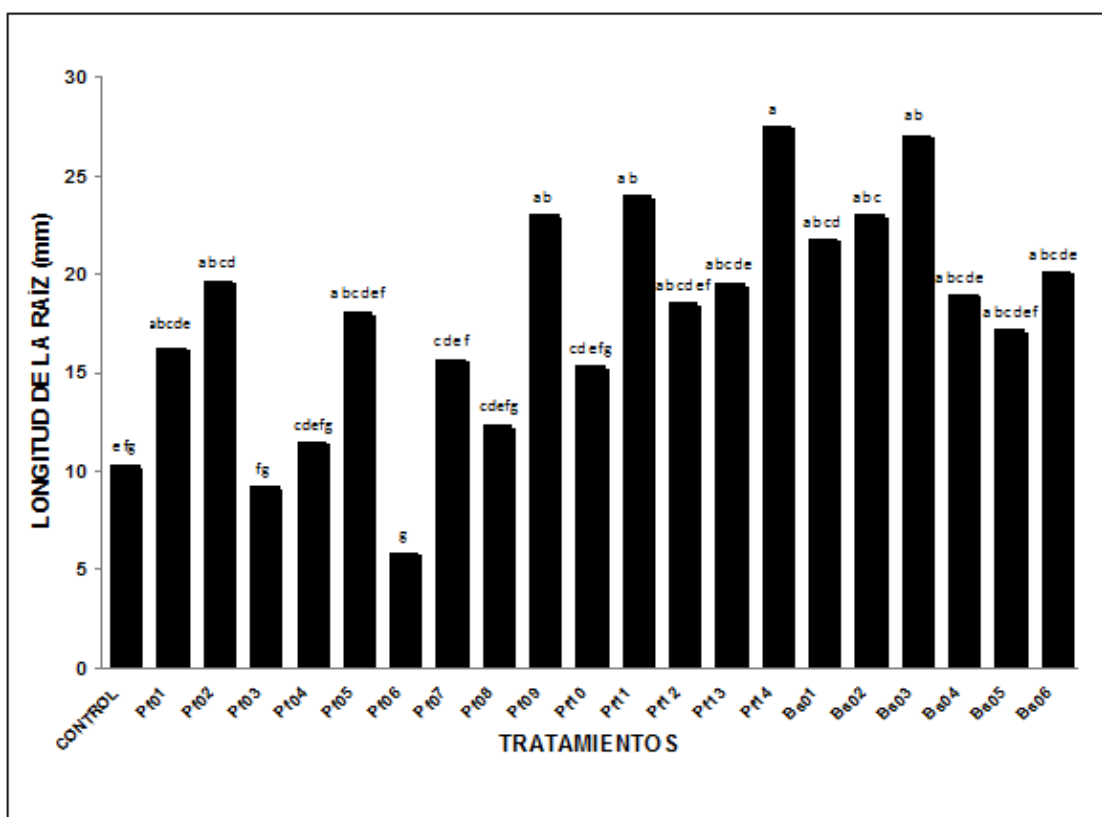


Figura 5: Longitud de la raíz de las plántulas de uchuva inoculadas con *Pseudomonas* sp., y *Bacillus* sp., después de 20 días de incubación. Las medias seguidas con la misma letra en columnas diferentes no presentan diferencias significativas entre sí con el test Kruskal-wallis ($P < 0.05$)

El aislamiento Pf03 no presentó promoción de crecimiento de las plántulas de uchuva, en tanto que el aislamiento Pf06 tuvo un efecto negativo en el crecimiento de la raíz y el tallo. Según Tanimoto *et al*, 2005 dependiendo de la concentración de algunas fitohormonas como el ácido indol acético (AIA) se puede observar aceleración o inhibición en la elongación de la raíz; Gravel *et al*, 2007 demostraron el efecto adverso sobre la elongación de la raíz de semillas germinadas de tomate al aumentar la concentración de AIA en el medio. Así mismo, un aumento del compuesto 1-amilociclopropano- 1 carboxilato (ACC), precursor del etileno puede causar un retardo en la elongación de la raíz. Shaharoon *et al*, 2006 observaron los efectos del ACC en semillas de pera etioladas inoculadas con rizobacterias con relación al control (semillas de pera etioladas + ACC),

obteniendo como resultado un aumento en la longitud de la semilla, la elongación de la raíz y una reducción en el diámetro del tallo de las semillas inoculadas.

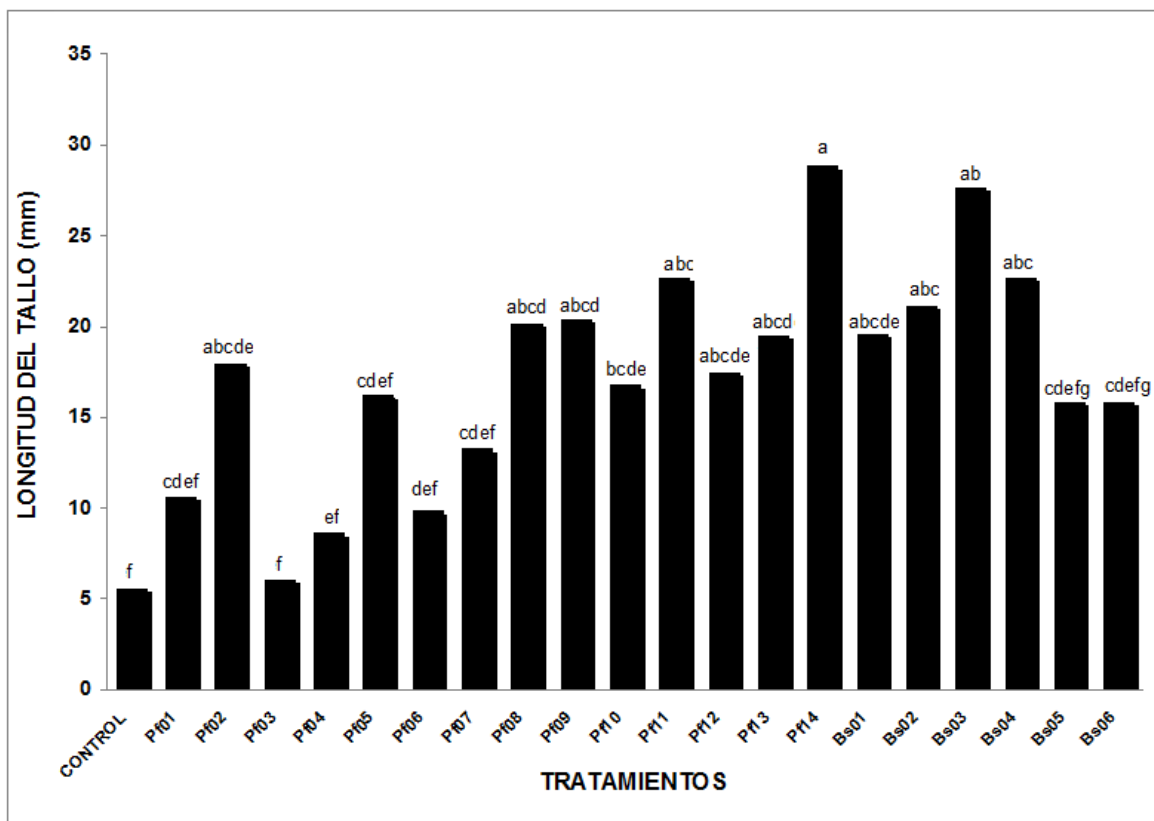


Figura 6. Longitud del tallo de las plántulas de uchuva inoculadas con *Pseudomonas* sp., y *Bacillus* sp., después de 20 días de incubación. Las medias seguidas con la misma letra en columnas diferentes no presentan diferencias significativas entre sí con el test Kruskal-wallis ($P < 0.05$)

De lo anterior se debe rescatar que las rizobacterias que presentaron promoción de crecimiento, no solo incrementaron el porcentaje de germinación y crecimiento de raíz y tallo sino que además se observó mayor homogeneidad en cuanto al tiempo de germinación de las semillas en cada una de las réplicas por tratamiento respecto al obtenido en el tratamiento control (Tabla 3), teniendo en cuenta lo anterior sería una estrategia a implementarse desde el establecimiento del semillero.

Tabla 3. Aislamientos promisorios en la promoción del crecimiento de las semillas de uchuva.

ASLAMIENTO	%GERMINACIÓN	LONGITUD DE LA RAÍZ (mm)	LONGITUD DEL TALLO (mm)	INICIO GERMINACIÓN	HOMOGENEIDAD GERMINACIÓN (%CV)
CONTROL	78,3	10,33	5,55	14 día	13,3
Pf09	86,7	23,08	20,43	9 día	3,3
Pf11	88,3	24,08	22,68	9 día	8,6
Pf14	98,3	27,58	28,85	9 día	3,2
Bs01	95,0	21,85	19,58	9 día	0
Bs02	93,3	23,08	21,15	9 día	3,1
Bs03	96,7	27,13	27,65	9 día	3,0

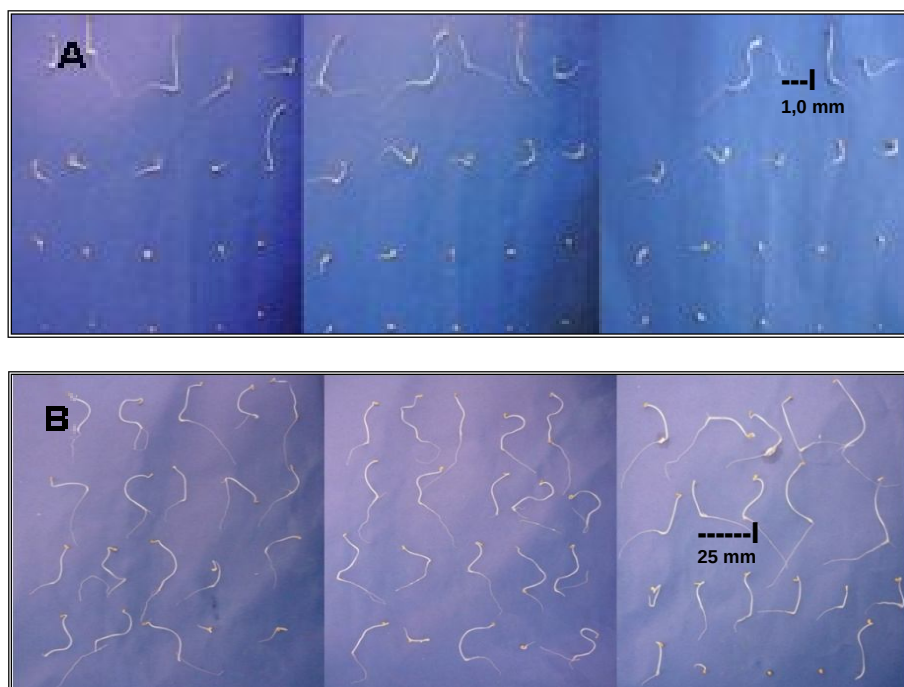


Figura 7. Semillas de uchuva después de 20 días de inoculación. (A) Testigo absoluto. (B) Tratamiento *Bacillus* sp., aislamiento Bs03.

SOLUBILIZACIÓN CUALITATIVA DEL FOSFATO

Todos los aislamientos pertenecientes al género *Pseudomonas* spp., fueron capaces de solubilizar el fosfato tricalcico presente en el medio SRS, lo cual se evidenció por la formación de halos transparentes debido a la producción de ácidos orgánicos que causaron el viraje del indicador de pH de púrpura a amarillo (Figura 8). Se observaron diferencias significativas con respecto al diámetro de los halos con valores entre 7.8 mm (Pf01) y 2.5 mm (Pf14) (Tabla 3, Anexo 5). Según Chen *et al*, 2006 la producción de ácidos orgánicos es el mejor mecanismo para la solubilización del fosfato, debido a que estos acidifican la célula microbiana y sus alrededores permitiendo la liberación del fosfato mediante la quelación de los cationes unidos a éste por el grupo hidroxilo y carboxilo presentes en los ácidos orgánicos entre ellos ácido fórmico, cítrico, oxálico, acético, propionico, láctico, gluconico, fumárico y succínico. Zadeh *et al*, 2010 observaron una relación proporcional entre pH ácidos y la solubilización del fosfato entre cepas de *Pseudomonas* sp. fluorescentes en cultivos de 8 días en medio líquido Pikovskaya.

Tabla 4: Solubilización de fosfato tricalcico por las rizobacterias después de 6 días de incubación. Los valores con las mismas letras no presentan diferencias significativas con la técnica de Tuckey con una confianza del 95%.

AISLAMIENTO	ACIDIFICACIÓN	HALO SOLUBILIZACIÓN Día 6 (mm)
Pf01	+	7,8 a
Pf02	+	5,6 bc
Pf03	+	5,9 abc
Pf04	+	6,6 abc
Pf05	+	7,0 abc
Pf06	+	7,6 ab
Pf07	+	5,9 abc
Pf08	+	6,5 abc
Pf09	+	5,7 bc
Pf10	+	4,9 c
Pf11	+	6,3 abc
Pf12	+	6,8 abc
Pf13	+	6,1 abc
Pf14	+	2,5 d
Bs01	-	0 e
Bs02	-	0 e
Bs03	+	0 e
Bs04	+	0 e
Bs05	-	0 e
Bs06	-	0 e

Los aislamientos Pf01, Pf05 y Pf06 (resaltados en rojo) presentaron halos con un valor mayor a 7.0 mm (medido desde el extremo del pozo al extremo del halo de solubilización).

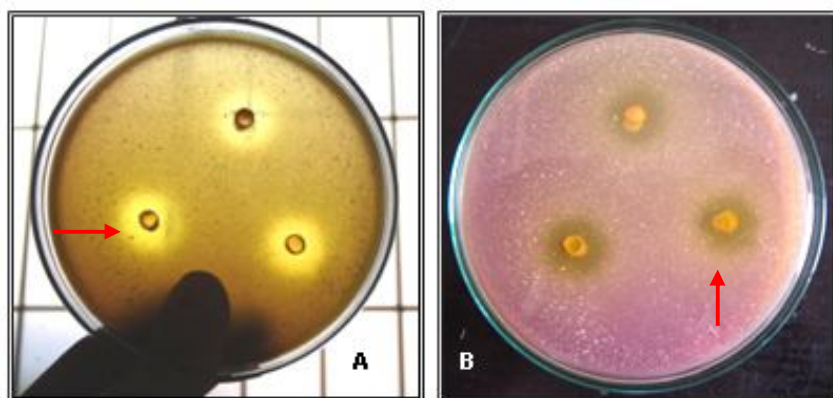


Figura 8. Solubilización de fósforo en el medio SRS con el aislamiento Pf06, después de 6 días de incubación en medio SRS. (A). Halos de solubilización. (B) Halos de acidificación.

Ninguno de los aislamientos de *Bacillus* sp., solubilizó el fosfato tricalcico aunque los aislamientos Bs03 y Bs04 presentaron una acidificación del medio de cultivo (Tabla 3); sin embargo, es posible que la cantidad de ácidos producidos no haya reducido el pH al rango óptimo para solubilizar el

fósforo presente en el medio o que estas bacterias presenten otros mecanismos para solubilizar fósforo, como la producción de enzimas como las fosfatasas ácidas y alcalinas. Khaled *et al.*, 2008; de Freitas *et al.*, 1997 detectaron la producción de estas enzimas en medios con fósforo inorgánico aunque en baja concentración, debido a que este mecanismo es utilizado por los microorganismos casi siempre en medios que presentan fosfato de origen orgánico. Sin embargo, también se debe tener en cuenta la eficiencia de la técnica utilizada, ya que se han reportado microorganismos que no presentaban halo de solubilización en medio sólido pero solubilizaban fósforo en medio líquido (Nautiyal, 1999).

ACTIVIDAD ANTAGÓNICA

Diecinueve de los aislamientos inhibieron el crecimiento micelial de *F. oxysporum* con respecto al control, en tanto que en el tratamiento correspondiente al aislamiento Pf14, el crecimiento de *F. oxysporum* fue igual al control.

Los aislamientos Pf01, Pf02, Pf03, Pf04, Pf05, Pf06, Pf08, Pf09, Pf11, Pf12, Pf13, Bs01, Bs03, Bs04, Bs05 y Bs06 presentaron un porcentaje de inhibición mayor del 30%, siendo los más efectivos los aislamientos Bs03, Bs06, Bs05 y Pf09 con 63%, 52%, 46% y 42% de inhibición respectivamente (Figura 9, Anexo 6)). Entre las rizobacterias antagonistas hubo diferentes grados de actividad antagónica contra *F. oxysporum* lo que se atribuye a la capacidad de los aislamientos de producir metabolitos secundarios que permitan el control de patógenos.

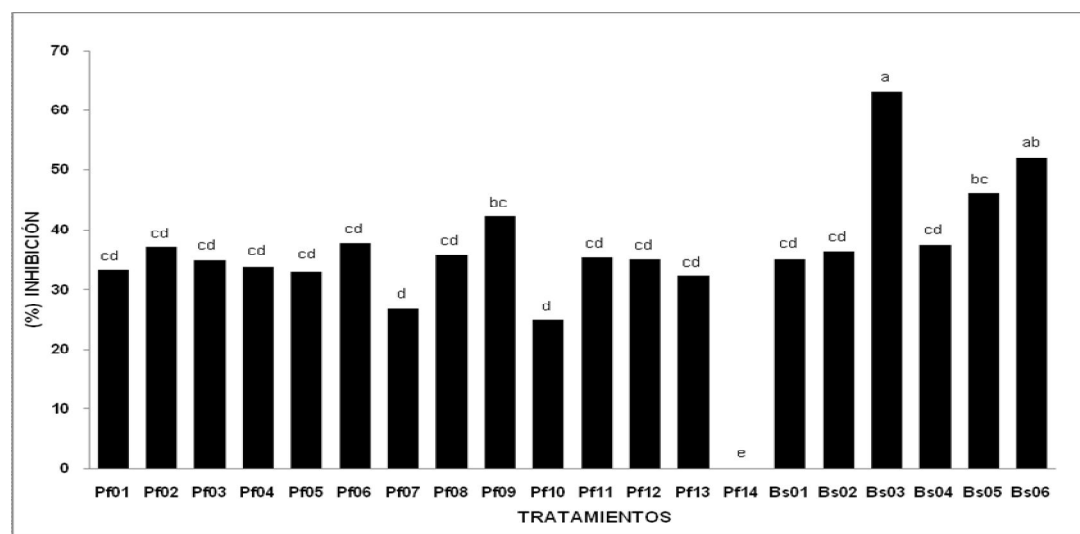


Figura 9: Porcentaje de Inhibición del crecimiento micelial de *F. oxysporum in vitro*, con las rizobacterias después de 7 días de incubación. Las medias seguidas con la misma letra en columnas diferentes no presentan diferencias significativas entre sí con el test Kruskal-wallis ($P < 0.05$)

En este trabajo los mayores porcentajes de inhibición de *F. oxysporum* se obtuvieron por miembros del género *Bacillus* sp. (Bs03, Bs05 y Bs06) resultados similares han sido reportados por Idris *et al*, 2007 quienes observaron que los aislamientos que presentaron diferencias significativas en el biocontrol de *F. oxysporum* en sorgo tanto *in vitro* como en invernadero pertenecían al género *Bacillus* sp.

Los géneros *Pseudomonas* sp., y *Bacillus* sp., han sido ampliamente reportados debido a la capacidad de inhibir el desarrollo de diversos fitopatógenos, por la producción de metabolitos como fenazinas, 2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG), pirrolnitrina (Prn), pioluterina (Plt) para *Pseudomonas* sp., (Baehler *et al*, 2005), y la producción de Iturina A y surfactina zwittermicina y kanosamina para el género *Bacillus* sp. (Kinsella *et al*, 2009; Asaka-Shoda; 1996); los cuales actúan inhibiendo el crecimiento o el metabolismo de patógenos como *Fusarium* spp., *Ralstonia solanacearum*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* (Idris *et al*, 2007, Sang *et al*, 2008; Ahmad *et al*, 2008).

Igualmente, no solo se observó la inhibición del crecimiento micelial de *F. oxysporum*, sino también se observó el cambio en la pigmentación del micelio del patógeno (Figura 10), pasando de un color púrpura en la base a blanco, resultados similares reportó Idris *et al*, 2007 atribuyendo este cambio fenotípico a la capacidad de las rizobacterias de producir otros metabolitos con actividad antagonica como sideroforos, iones de hidrogeno y productos volátiles como etileno y amonio. Ahmadzadeh *et al*, 2009 observaron que la mayoría de *Pseudomonas* fluorescentes produjeron diferentes metabolitos antifúngicos entre ellos, proteasas, sideroforos, cianida de hidrógeno (HCN) y DAPG, inhibiendo el crecimiento micelial de *Pythium ultimum* y *Rhizoctonia solani*.

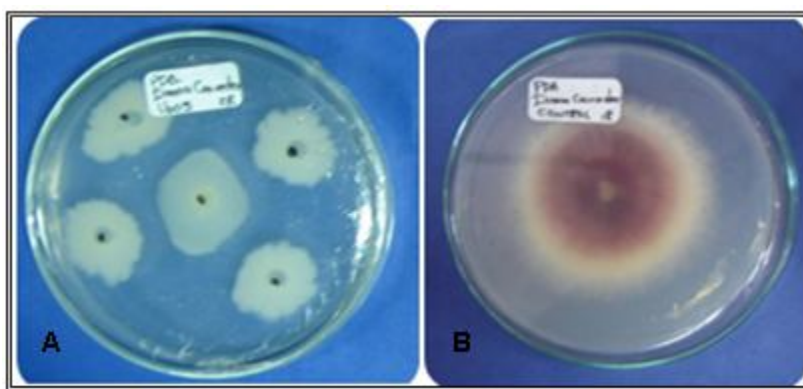


Figura 10. Crecimiento de *F. oxysporum* en la prueba de antibiosis. (A) Enfrentamiento con el aislamiento Bs03. (B) Testigo patógeno

Aunque el aislamiento Pf14 no inhibió el crecimiento de *F. oxysporum* *in vitro*, es necesario evaluar otros mecanismos diferentes al antagonismo que permiten controlar la presencia de enfermedades

en plantas, como es la inducción de resistencia sistémica, competencia por nutrientes y espacio y producción de sideroforos (Lutengberg et al, 2007; Compant, *et al* 2005).

ANÁLISIS MULTIVARIADO PORCENTUAL

Por medio de los resultados obtenidos (Tabla 5) se seleccionaron los aislamientos, Pf02, Pf05, Pf09, Pf11, Pf13, Bs01, Bs02, Bs03, Bs04, Bs05, Bs06 por presentar el mejor resultado en la promoción de crecimiento en semillas de uchuva al estimular el porcentaje de germinación y elongación de la raíz y del tallo, capacidad fosfatosolubilizadora y capacidad antagonista, destacándose el aislamiento Bs03, sin embargo se debe tener en cuenta para próximos estudios el aislamiento Pf14 que produjo un efecto igual o mejor en la estimulación del crecimiento en semillas de uchuva.

Tabla 5. Comparación porcentual entre los aislamientos de las variables de % germinación, longitud de raíz y longitud del tallo, solubilización del fósforo y antagonismo.

AISLAMIENTO	%GERMINACIÓN	LONGITUD DE LA RAÍZ (mm)	LONGITUD DEL TALLO (mm)	HALO SOLUBILIZACIÓN Día 6 (mm)	ANTAGONISMO	TOTAL
Pf01	0,008	0,006	0,003	0,005	0,023	0,045
Pf02	0,007	0,008	0,008	0,003	0,026	0,053
Pf03	0,000	0,002	0,000	0,003	0,024	0,030
Pf04	0,001	0,003	0,002	0,004	0,024	0,034
Pf05	0,009	0,007	0,007	0,004	0,023	0,050
Pf06	0,009	0,000	0,003	0,004	0,027	0,043
Pf07	0,007	0,006	0,005	0,003	0,019	0,040
Pf08	0,007	0,004	0,009	0,004	0,025	0,049
Pf09	0,007	0,010	0,009	0,003	0,030	0,060
Pf10	0,008	0,006	0,007	0,003	0,018	0,041
Pf11	0,008	0,011	0,011	0,004	0,025	0,058
Pf12	0,005	0,008	0,007	0,004	0,025	0,049
Pf13	0,010	0,008	0,009	0,004	0,023	0,054
Pf14	0,011	0,013	0,015	0,001	0,000	0,040
Bs01	0,010	0,010	0,009	0,000	0,025	0,053
Bs02	0,009	0,010	0,010	0,000	0,026	0,055
Bs03	0,010	0,013	0,014	0,000	0,044	0,081
Bs04	0,010	0,008	0,011	0,000	0,026	0,055
Bs05	0,007	0,007	0,006	0,000	0,032	0,052
Bs06	0,007	0,009	0,006	0,000	0,037	0,058

CONCLUSIONES

Se conformó una colección con 20 aislamientos de bacterias aisladas de la rizosfera de plantas de uchuva, 14 pertenecientes al género *Pseudomonas* sp. y 6 al género *Bacillus* sp.

6 aislamientos estimularon el porcentaje de germinación, longitud de la raíz y longitud del tallo de semillas de uchuva.

Todas las bacterias del género *Pseudomonas* sp., solubilizaron en algún nivel el fosfato inorgánico insoluble presente en el medio SRS por la producción de ácidos orgánicos; en contraste, el género *Bacillus* sp. puede presentar mecanismos diferentes de solubilización del fósforo.

18 aislamientos inhibieron el crecimiento micelial de *F. oxysporum* por la producción de metabolitos secundarios en la prueba *in vitro*.

Se seleccionaron los aislamientos Pf02, Pf05, Pf09, Pf11, Pf13, Bs01, Bs02, Bs03, Bs04, Bs05, Bs06 debido a su capacidad promotora en la germinación y crecimiento de las semillas de uchuva, capacidad fosfatotsolubilizadora y capacidad antagónica frente *F. oxysporum*.

RECOMENDACIONES

Identificar mediante técnicas moleculares las rizobacterias que presentaron mayor promoción del crecimiento en las semillas de uchuva.

Evaluar la capacidad promotora del crecimiento vegetal de los aislamientos Pf09, Pf11 y Pf14 de *Pseudomonas* sp., y Bs03 de *Bacillus* sp., en condiciones de invernadero y campo.

Caracterizar los metabolitos que inhibieron el crecimiento de *F. oxysporum* por las rizobacterias evaluadas.

Determinar el efecto antagónico de los aislamientos Pf09 y Bs03 contra *F. oxysporum* en condiciones de invernadero y de campo.

BIBLIOGRAFÍA

Agrios G, *Plant Pathology* 5ª edición. Editorial Elsevier Academic Press. 2005.922p.

Ahmad F, Ahmad I, Khan M. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbial Research* 2008; 163 (2): 173-181.

Ahmadzadeh M, Tehrani A. Evaluation of fluorescent *Pseudomonads* for plant growth promotion, antifungal activity against *Rhizoctonia solani* on common bean, and biocontrol potential. *Biological Control* 2009; 48(2): 101-107.

Asaka O, Shoda M. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-Off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied and Environmental Microbiology* 1996; 62 (11): 4081–4085

Baehler E, Bottiglieri M, Tarr M, Maurhofer M, Keel C. Green fluorescent protein-based reporters to monitor balanced production of antifungal compounds in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Journal of Applied Microbiology* 2005; 99 (1): 24–38.

Benhamou N, Kloepper J, Tuzun S. Induction of resistance against Fusarium wilt of Tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: Ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Planta* 1998; 204:153-168.

Boruah D, Rabha B, Saikia N, Kumar B. Fluorescent *Pseudomonas* influences palisade mesophyll development and spatial root development in *Phaseolus vulgaris*. *Plant and Soil* 2003; 256: 291–301.

Caballero, T., Camelo, M. Bonilla,R., Martínez, M.. Determinación de actividad fosfato solubilizadora por bacterias aisladas a partir de suelos algodoneros en los departamentos del Cesar y Meta. *Suelos Ecuatoriales* 2007; 37 (1): 94:100.

Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Barka E. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; 71 (9): 4951–4959.

Corporación Colombia Internacional. Inteligencia de Mercados, Perfil del Producto No.13. www.agronet.gov.co/www/docs_agronet/200511316613_UCHUVA-13.pdf. (Consultado 13 de enero de 2010)

Chen Y, Rekha P, Arun A, Shen F, Lai W, Young C. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology* 2006; 34 (1): 33–41.

Choudhary D, Johri B. Interactions of *Bacillus* spp. and plants – With special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research* 2009; 164 (5): 493-513.

de Freitas J, Banerjee M, Germida J. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biology and Fertility of Soils* 1997; 24:358–364.

Desai S, Narayanaiah Ch, Kumari K, Reddy M, Gnanamanickam S, Rajeswara Rao G, Venkateswarlu B. Seed inoculation with *Bacillus* spp. improves seedling vigour in oil-seed plant *Jatropha curcas* L. *Biology and Fertility of Soils* 2007; 44: 229–234.

Dey R, Pal, K, Bhatt D, Chauhan S. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological Research* 2004; 159: 371-294

Díaz K, Valiente C, Martínez M, Castillo M, Sanfuentes E. Root-promoting rhizobacteria in *Eucalyptus globulus* cuttings. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2009; 25:867–873.

Fisher G, Flórez V, Sora A. *Producción, Poscoquecha y Exportación de la Uchuva (Physalis peruviana L.)*. Editorial Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Bogotá, D. C., Colombia. 2000, 175 p.

Fisher G, Piedrahita W, Miranda D, Romero J. *Avances en cultivo, poscoquecha y exportación de la uchuva Physalis peruviana L. en Colombia*. Primera edición. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. 2005, 221 p.

Góngora A, Rojas P. Incidencia de las enfermedades de uchuva *Physalis peruviana* L. por estado fenológico y de acuerdo con la ubicación en los diferentes estratos de la planta en el departamento de Cundinamarca. *Tesis de pregrado*. Facultad de ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2006, 87p.

Gravel V, Antoun H, Tweddell R. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology and Biochemistry* 2007; 39(8):1968-1977.

Gutierrez F, Solano B, Probanza A, Mehouchi J, Tadeo F, Talon M. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum* 2001; 111 (2): 206–211.

Haas D, Défago G. Biological control of soil-borne pathogens by Fluorescent *Pseudomonads*. *Nature Reviews Microbiology* 2005; 3(4):307-319

Hamed E, AbdEl-Sayed M, Shehata H. Suppression of Fusarium Wilt of atermelon by Biological and Chemical Control. *Journal of Applied Sciences Research* 2009; 5(10): 1816-1825

Hendricks B. *Manual de Bergey's of Determinative bacteriology*. Ninth Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Estados Unidos. 2000, 787 p.

Idris H, Labuschagne N, Korsten L. Screening rizobacteria for biological control of *Fusarium* root and crown rot of sorghum in Ethiopia. *Biological control* 2007; 40 (1): 97-106.

Khaled A, Tarabily E, Nassar A, Sivasithamparam K. Promotion of growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a calcareous soil by a phosphate-solubilizing, rhizosphere-competent isolate of *Micromonospora endolithica*. *Applied Soil Ecology* 2008; 39 (2):161-171.

Kim K, Jordan D, McDonald G. *Enterobacter agglomerans*, phosphate solubilizing bacteria, and microbial activity in soil: effect of carbon sources. *Soil Biology and Biochemistry* 1998; 30 (8-9): 995–1003.

Kinsella K, Schulthess C, Morris T, Stuart J. Rapid quantification of *Bacillus subtilis* antibiotics in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry* 2009; 41 (2): 374–379.

Kloepper J, Ryu C, Zhang S. Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp.. *Phytopathology* 2004; 94 (11): 1259-1266.

Leeman M, Van Pelt J, Den Ouden F, Heinsbroek M, Bakker P, Schippers B. Induction of Systemic Resistance against *Fusarium* wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* 1995; 85: 1021-1027

Liu L, Kloepper J, Tuzun S. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by Plant Growth promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 1995; 85(6): 695-698

Lucy M, Reed E, Glick B. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 2000; 86 (1): 1–25.

Lugtenberg B. Kamilova F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology* 2009; 63: 541-556.

Massana C, Lucena F, Blanch A. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* in water-bottling plants on the basis of procedures included in ISO 16266:2006. *Journal of Microbiological Methods* 2010; 81(1): 1-5.

Mercado J, Bakker P. Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie van Leeuwenhoek* 2007; 92 (4): 367-389.

Nautiyal S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 1999; 170: 265-270

Niranjan S, Shetty N, Shetty H. Seed bio-priming with *Pseudomonas fluorescens* isolates enhance growth of pearl millet plants and induces resistance against downy mildew. *International Journal Of Pest Management* 2004; 50(1): 41-48.

Ochoa J. Control biológico de marchitamiento vascular de clavel ocasionado por *Fusarium oxysporum* fsp. *dianthi* mediante el uso de microorganismos potenciales antagonistas *Pseudomonas fluorescens*, *Streptomyces coelicolor* y *Trichoderma hamatum*. Tesis de pregrado. Facultad de ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. 1996

Ongena M, Jacques P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology* 2008; 16 (3): 115-125.

Ortiz R, Valencia E, Lopez J. Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling. *Plant Signaling & Behavior* 2008; 3(4): 263-265.

Piñeiro M, Díaz L. Aplicación de programas para el mejoramiento de la calidad e inocuidad de la cadena de suministro de frutas y hortalizas. Ventajas y desventajas. Organización de las naciones unidas para la Agricultura y la alimentación. 2007

Ramírez M, Roveda G, Bonilla R, Cabra L, Peñaranda A, López M, Serralde D, Tamayo A, Navas G, Días C. Uso y manejo de biofertilizantes en el cultivo de uchuva. Editorial Produmedios. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. 2008, 54p.

Raju N, Niranjana S, Janardhana G, Prakas H, Shetty H, Mathur S. Improvement of seed quality and field emergence of *Fusarium moniliforme* infected sorghum seeds using biological agents. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1999; 79 (2): 206- 212.

Ryu Ch, Farag M, Hu Ch, Reddy M, Wei H, Pare P, Kloepper J. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Plant Biology* 2003; 100 (8): 4927–4932

Rodriguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 1999; 17 (4-5): 319-339.

Saikia R, Singh T, Kuman R, Srivastava J, Srivastava A, Singh K, Arora D. Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas fluorescens* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in chickpea. *Microbiological Research* 2003; 158 (3): 203–213.

Sang M, Chun S, Kim K. Biological control of *Phytophthora* blight of pepper by antagonistic rhizobacteria selected from a sequential screening procedure. *Biological Control* 2008; 46(3): 424-433.

Saravanakumar D, Vijayakumar C, Kumar N, Samiyappan R. PGPR-induced defense responses in the tea plant against blister blight disease. *Crop Protection* 2007; 26 (4): 556-565

Shaharoona B, Bibi R, Arshad M, Ahmed Z, Hassan Z. Aminocyclopropane-1-carboxylate (acc)-deaminase rhizobacteria extenuates acc-induced classical triple response in etiolated pea seedlings *Pakistan Journal of Botany* 2006; 38 (5): 1491-1499.

Tanimoto E. Regulation of Root Growth by Plant Hormones—Roles for Auxin and Gibberellin *Critical Reviews in Plant Sciences* ; 2005 24:249–265

Van Loon L. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology* 2007; 119 (3): 243–254

Weller D. *Pseudomonas* Biocontrol Agents of soilborne pathogens: Looking back over 30 years. *Phytopathology* 2007; 97: 250-256.

Zadeh P, Rastin N, Rahmani H, Khavazi K, Soltani A, Nejati R, Miransari M. Plant growth-promoting activities of fluorescent *Pseudomonads*, isolated from the Iranian soils. *Acta Physiologiae Plantarum* 2010; 32 (2):281–288

ANEXO 1

MEDIOS DE CULTIVO

MEDIO SRS

COMPOSICIÓN	g/L
Sulfato de amonio	0,5
Cloruro de potasio	0,2
Sulfato de magnesio	0,3
Sulfato de hierro 7.H ₂ O	0,002
Sulfato de manganeso	0,004
Cloruro de sódio	0,2
Glucosa	10
Extracto de levadura	0,5
Púrpura de bromocresol	0,1
Fosfato tricalcico	5
Agar	20

pH Final 7,2

ANEXO 2

ESTADÍSTICA EFECTO DE *Pseudomonas* sp., y *Bacillus* sp., SOBRE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE UCHUVA.

ONE-WAY ANOVA FOR: BS01 BS02 BS03 BS04 BS05 BS06 CONTROL PF01 PF02 PF03 PF04 PF05
PF06 PF07 PF08 PF09 PF10 PF11 PF12 PF13 PF14

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	20	4609.52	230.476	5.14	0.0000
WITHIN	42	1883.33	44.8413		
TOTAL	62	6492.86			

AT LEAST ONE GROUP VARIANCE IS NEAR ZERO;
VARIANCE-EQUALITY TESTS CANNOT BE COMPUTED.

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 61.8783
EFFECTIVE CELL SIZE 3.0

VARIABLE	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
BS01	95.000	3	0.0000
BS02	93.333	3	2.8868
BS03	96.667	3	2.8868
BS04	96.667	3	2.8868
BS05	85.000	3	5.0000
BS06	85.000	3	8.6603
CONTROL	78.333	3	10.408
PF01	88.333	3	11.547
PF02	86.667	3	2.8868
PF03	65.000	3	8.6603
PF04	68.333	3	7.6376
PF05	91.667	3	2.8868
PF06	93.333	3	5.7735
PF07	85.000	3	5.0000
PF08	85.000	3	5.0000
PF09	86.667	3	2.8868
PF10	90.000	3	10.000
PF11	88.333	3	7.6376
PF12	81.667	3	12.583
PF13	96.667	3	2.8868
PF14	98.333	3	2.8868
TOTAL	87.381	63	6.6964

CASES INCLUDED 63 MISSING CASES 0

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS

VARIABLE	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
PF14	98.333	I
BS03	96.667	I
BS04	96.667	I
PF13	96.667	I
BS01	95.000	I
BS02	93.333	I
PF06	93.333	I
PF05	91.667	I
PF10	90.000	I
PF01	88.333	I I
PF11	88.333	I I
PF02	86.667	I I
PF09	86.667	I I
BS05	85.000	I I I
BS06	85.000	I I I
PF07	85.000	I I I
PF08	85.000	I I I
PF12	81.667	I I I
CONTROL	78.333	I I I
PF04	68.333	-- I I
PF03	65.000	 I

THERE ARE 3 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE	5.377	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	20.788		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	5.4676		

ANEXO 3

ESTADÍSTICA EFECTO DE *Pseudomonas* sp., y *Bacillus* sp., SOBRE LA ELONGACIÓN DE LA RAÍZ DE LAS SEMILLAS DE UCHUVA.

KRUSKAL-WALLIS ONE-WAY NONPARAMETRIC AOV

VARIABLE	MEAN RANK	SAMPLE SIZE
BS01	489.2	40
BS02	521.4	40
BS03	592.1	40
BS04	452.4	40
BS05	422.6	40
BS06	465.9	40
CONTROL	272.5	40
PF01	399.6	40
PF02	449.7	40
PF03	246.6	40
PF04	299.9	40
PF05	425.9	40
PF06	169.8	40
PF07	385.5	40
PF08	312.8	40
PF09	516.3	40
PF10	369.0	40
PF11	534.4	40
PF12	445.1	40
PF13	454.9	40
PF14	605.0	40
TOTAL	420.5	840

KRUSKAL-WALLIS STATISTIC 171.4507
P-VALUE, USING CHI-SQUARED APPROXIMATION 0.0000

PARAMETRIC AOV APPLIED TO RANKS

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	20	1.007E+07	503471	10.52	0.0000
WITHIN	819	3.921E+07	47870.2		
TOTAL	839	4.928E+07			

TOTAL NUMBER OF VALUES THAT WERE TIED 837
MAX. DIFF. ALLOWED BETWEEN TIES 0.00001

CASES INCLUDED 840 MISSING CASES 0

COMPARISONS OF MEAN RANKS

VARIABLE	MEAN RANK	HOMOGENEOUS GROUPS
PF14	604.96	I
BS03	592.13	I I
PF11	534.39	I I I
BS02	521.39	I I I
PF09	516.29	I I I
BS01	489.21	I I I I
BS06	465.91	I I I I I
PF13	454.86	I I I I I
BS04	452.36	I I I I I
PF02	449.69	I I I I I
PF12	445.11	I I I I I I
PF05	425.94	I I I I I I
BS05	422.61	I I I I I I
PF01	399.56	.. I I I I I
PF07	385.52	 I I I I
PF10	369.04	 I I I I I
PF08	312.76	 I I I I
PF04	299.86	 I I I I
CONTROL	272.46	 I I I
PF03	246.60	 I I
PF06	169.84	 I

THERE ARE 7 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL Z VALUE 3.67
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 199.37

ANEXO 4

ESTADÍSTICA EFECTO DE *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. SOBRE LA ELONGACIÓN DEL TALLO DE LAS SEMILLAS DE UCHUVA.

KRUSKAL-WALLIS ONE-WAY NONPARAMETRIC AOV

VARIABLE	MEAN RANK	SAMPLE SIZE
BS01	455.6	40
BS02	496.7	40
BS03	599.1	40
BS04	522.1	40
BS05	397.7	40
BS06	475.6	40
CONTROL	202.2	40
PF01	322.7	40
PF02	432.2	40
PF03	206.3	40
PF04	259.9	40
PF05	395.5	40
PF06	297.1	40
PF07	363.7	40
PF08	470.4	40
PF09	475.4	40
PF10	426.7	40
PF11	514.1	40
PF12	430.0	40
PF13	461.3	40
PF14	626.1	40
TOTAL	420.5	840

KRUSKAL-WALLIS STATISTIC 176.5594
P-VALUE, USING CHI-SQUARED APPROXIMATION 0.0000

PARAMETRIC AOV APPLIED TO RANKS

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	20	1.037E+07	518520	10.91	0.0000
WITHIN	819	3.891E+07	47508.1		
TOTAL	839	4.928E+07			

TOTAL NUMBER OF VALUES THAT WERE TIED 836
MAX. DIFF. ALLOWED BETWEEN TIES 0.00001

CASES INCLUDED 840 MISSING CASES 0

COMPARISONS OF MEAN RANKS

VARIABLE	MEAN RANK	HOMOGENEOUS GROUPS
PF14	626.14	I
BS03	599.09	I I
BS04	522.09	I I I
PF11	514.11	I I I
BS02	496.69	I I I
BS06	475.65	I I I I
PF09	475.42	I I I I
PF08	470.40	I I I I
PF13	461.27	I I I I
BS01	455.60	I I I I I
PF02	432.17	I I I I I
PF12	430.04	I I I I I
PF10	426.72	.. I I I I
BS05	397.70	 I I I I
PF05	395.51	 I I I I
PF07	363.65	 I I I I
PF01	322.73	 I I I I
PF06	297.06	 I I I
PF04	259.93	 I I
PF03	206.29	 I
CONTROL	202.24	 I

THERE ARE 6 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL Z VALUE 3.67
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 199.37

ANEXO 5

ESTADÍSTICA SOLUBILIZACION CUALITATIVA DEL FOSFATO POR *Pseudomonas* sp.

ONE-WAY ANOVA FOR: PF01 PF02 PF03 PF04 PF05 PF06 PF07 PF08 PF09 PF10 PF11 PF12
PF13 PF14

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	13	358.176	27.5520	8.04	0.0000
WITHIN	220	753.589	3.42540		
TOTAL	233	1111.76			

BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	CHI-SQ	DF	P
	21.96	13	0.0560

COCHRAN'S Q 0.1262
LARGEST VAR / SMALLEST VAR 3.9328

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 1.44435
EFFECTIVE CELL SIZE 16.7

VARIABLE	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
PF01	7.8889	18	1.6047
PF02	5.6111	18	1.9140
PF03	5.9444	18	1.6260
PF04	6.6667	18	1.3720
PF05	7.0000	15	2.2039
PF06	7.6667	15	2.2573
PF07	5.9333	15	1.8696
PF08	6.5556	18	1.2472
PF09	5.7778	18	2.2375
PF10	4.9333	15	1.3345
PF11	6.3333	18	2.4734
PF12	6.8667	15	1.8465
PF13	6.1667	18	1.2485
PF14	2.4000	15	2.1974
TOTAL	6.1496	234	1.8508

CASES INCLUDED 234 MISSING CASES 18

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS

VARIABLE	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
PF01	7.8889	I
PF06	7.6667	I I
PF05	7.0000	I I I
PF12	6.8667	I I I
PF04	6.6667	I I I
PF08	6.5556	I I I
PF11	6.3333	I I I
PF13	6.1667	I I I
PF03	5.9444	I I I
PF07	5.9333	I I I
PF09	5.7778	.. I I
PF02	5.6111	.. I I
PF10	4.9333	 I
PF14	2.4000	 I

THERE ARE 4 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE 4.736 REJECTION LEVEL 0.050
STANDARD ERRORS AND CRITICAL VALUES OF DIFFERENCES
VARY BETWEEN COMPARISONS BECAUSE OF UNEQUAL SAMPLE SIZES.

ANEXO 6

ESTADÍSTICA CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE *Pseudomonas* sp., y *Bacillus* sp.

ONE-WAY ANOVA FOR: BS01 BS02 BS03 BS04 BS05 BS06 PF01 PF02 PF03 PF04 PF05 PF06
PF07 PF08 PF09 PF10 PF11 PF12 PF13 PF14

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	19	7059.25	371.539	17.46	0.0000
WITHIN	40	851.333	21.2833		
TOTAL	59	7910.58			

AT LEAST ONE GROUP VARIANCE IS NEAR ZERO;
VARIANCE-EQUALITY TESTS CANNOT BE COMPUTED.

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 116.752
EFFECTIVE CELL SIZE 3.0

VARIABLE	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
BS01	35.000	3	5.0000
BS02	36.333	3	5.6862
BS03	63.333	3	3.5119
BS04	37.333	3	4.0415
BS05	46.000	3	9.1652
BS06	52.000	3	0.0000
PF01	33.333	3	4.5092
PF02	37.000	3	2.6458
PF03	34.667	3	1.5275
PF04	33.667	3	2.0817
PF05	33.000	3	4.5826
PF06	37.667	3	4.6188
PF07	26.667	3	5.5076
PF08	35.667	3	4.0415
PF09	42.333	3	3.2146
PF10	27.333	3	4.5092
PF11	35.333	3	4.9329
PF12	35.000	3	3.0000
PF13	32.333	3	3.5119
PF14	4.3333	3	7.5056
TOTAL	35.917	60	4.6134

CASES INCLUDED 60 MISSING CASES 0

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS

VARIABLE	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
BS03	63.333	I
BS06	52.000	I I
BS05	46.000	.. I I
PF09	42.333	.. I I
PF06	37.667	 I I
BS04	37.333	 I I
PF02	37.000	 I I
BS02	36.333	 I I
PF08	35.667	 I I
PF11	35.333	 I I
BS01	35.000	 I I
PF12	35.000	 I I
PF03	34.667	 I I
PF04	33.667	 I I
PF01	33.333	 I I
PF05	33.000	 I I
PF13	32.333	 I I
PF10	27.333	 I
PF07	26.667	 I
PF14	4.3333	 I

THERE ARE 5 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE 5.352 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 14.256
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 3.7668