

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIOCONTROLADOR DE LOS AISLAMIENTOS DE
ACTINOBACTERIAS *MCR 33, MCR 26, T1J Y T3A* CONTRA *Fusarium oxysporum* y
Rhizoctonia solani EN FRIJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris* L.).**

Valentina Bonilla Bravo



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ D.C**

NOTA DE ADVERTENCIA

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

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

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIOCONTROLADOR DE LOS AISLAMIENTOS DE
ACTINOBACTERIAS MCR 33, MCR 26, T1J Y T3A CONTRA *Fusarium oxysporum* y
Rhizoctonia solani EN FRIJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris* L.).**

Valentina Bonilla Bravo


María Ximena Rodríguez Bocanegra
Directora


Marcela Franco Correa
Co-directora


Jose Salvador Montana Lara
Jurado

RESUMEN

El frijol es una fuente alimentaria para gran parte de la población América Latina y África por su alto contenido de proteínas, vitaminas y minerales; en Colombia, la mayor parte del frijol producido se concentra en la zona andina y es destinado al consumo de sus habitantes. Millonarias pérdidas económicas se producen por el impacto de enfermedades como marchitamiento vascular y pudrición radical ocasionadas por *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*, respectivamente, reduciendo significativamente el rendimiento y la producción de esta leguminosa, lo que representa un importante impedimento para el agricultor. Frente a esta problemática existen diversas estrategias de control para el desarrollo de estas enfermedades, las cuales incluyen prácticas culturales, aplicaciones de fungicidas de síntesis química y el uso de agentes biocontroladores. El uso de agentes biocontroladores supone una alternativa amigable con el medio ambiente y con los microorganismos benéficos presentes en el suelo frente al uso descontrolado de los fungicidas químicos.

En el presente estudio se evaluó el potencial biocontrolador de cuatro aislamientos de actinobacterias caracterizados previamente como rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) frente a *F. oxysporum* y *R. solani* en plantas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) a nivel *in vitro*, mediante la técnica de enfrentamiento dual, e *in vivo* bajo condiciones de invernadero.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la evaluación *in vitro*, se seleccionaron los aislamientos MCR 33 y T3A para evaluar su potencial biocontrolador en condiciones de invernadero, dado su mayor efecto inhibitorio sobre *F. oxysporum* y *R. solani* en pruebas de antagonismo en medio PDA. En su evaluación biocontroladora *in planta*, no se demostró control de la enfermedad causada por *F. oxysporum*, indicando que estas dos actividades no se relacionan directamente. Quizás, esta ausencia de control se explica por el tiempo insuficiente de interacción entre las actinobacterias inoculadas y el sistema radicular del frijol, lo que no favoreció el establecimiento de estos aislamientos en la rizósfera

INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es una de las leguminosas más cultivadas y consumidas en África y Sur América (De la Fuente et al, 2011). Sus semillas son consideradas una de las mejores fuentes alimentarias por su alto contenido en proteínas, en especial de faseolina. A pesar de no ser una fuente significativa de aminoácidos sulfurados como metionina, aporta otros aminoácidos esenciales como lisina (Broughton et al, 2003). Adicionalmente, el frijol común es una fuente de vitaminas y minerales, entre ellos, hierro, fósforo, magnesio y manganeso (Ulloa et al, 2011), lo que lo hace un alimento más completo en comparación con otros cultivos como los cereales (Broughton et al, 2003).

A pesar de su importancia en la dieta, millonarias pérdidas se producen por el impacto de diversas enfermedades ocasionadas por hongos que atacan los cultivos de frijol; entre ellas las de mayor impacto son el marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* y la pudrición radical por *Rhizoctonia solani* (Castellanos et al, 2011). El control de estas enfermedades se basa principalmente en el uso de fungicidas de síntesis química apoyado con prácticas de cultivo como deshoje, control de malezas y rotación de cultivos. Sin embargo, los fungicidas tienen acción limitada contra los hongos fitopatógenos mencionados anteriormente, su uso masivo representa un riesgo para el medio ambiente y la salud humana (Pereira et al, 2014), y adicionalmente ocasionan efectos negativos sobre la fertilidad de suelos destinados al cultivo, aumentando el costo de producción (Franco, 2009). Frente a esta problemática, el uso de agentes biocontroladores supone una alternativa viable frente a la acción de los hongos fitopatógenos que reducen el rendimiento de los cultivos (Padder et al, 2010), siendo *Trichoderma* spp., *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* los agentes más reportados con acción antagónica frente a hongos fitopatógenos en plantas de frijol común (El-Fiki et al, 2014; Padder et al, 2010). No obstante, el papel de las actinobacterias como agentes biocontroladores de *F. oxysporum* y *R. solani* en frijol común no ha sido ampliamente documentado, pese a su reconocimiento en la producción de gran variedad de metabolitos secundarios (El-Tarabily, 2006), a su capacidad de propagarse en condiciones de estrés presentando mayor viabilidad e infectividad (Franco, 2008) y a su capacidad de influir positivamente sobre el crecimiento de las plantas como bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR), lo que podría conferir una ventaja frente al uso de otros géneros de agentes biocontroladores ya reportados.

En el presente proyecto se propone evaluar el potencial biocontrolador de cuatro aislamientos de actinobacterias consideradas como rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) frente a *F. oxysporum* y *R. solani* en frijol común, a nivel *in vitro* e *in planta*.

MARCO TEÓRICO

Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR)

Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal son microorganismos habitantes de la rizosfera que colonizan la superficie de la raíz sin causar enfermedad a la planta manteniendo una elevada densidad poblacional después de ser inoculadas en la rizosfera (Bach & Diaz, 2009). El término rizobacteria promotora de crecimiento vegetal o PGPR, por sus siglas en inglés "Plant Growth Promoting Rhizobacteria", fue acuñado por primera vez en 1978 por Kloepper y Schroth cuando reportaron la presencia de bacterias que influían positivamente en el crecimiento y la salud vegetal. Desde entonces se han realizado investigaciones que incluyen a *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, como los géneros más evaluados para la producción y comercialización de inoculantes (Kaur & Sharma, 2013; Bach & Diaz, 2009).

Estos microorganismos estimulan el crecimiento de plantas a través de mecanismos directos e indirectos. En la estimulación directa se desarrollan procesos que promueven el crecimiento vegetal como la solubilización de fósforo, quelación de hierro, fijación de nitrógeno y producción de sustancias reguladoras del crecimiento; mientras que en la estimulación indirecta las PGPR producen metabolitos con actividad antagónica e inducen mecanismos de resistencia en la planta, siendo así reconocidas por tener un papel importante en control biológico (Ryu et al, 2005).

El grupo de actinobacterias del género *Streptomyces*, ha recibido especial atención por su capacidad de controlar el desarrollo de hongos y bacterias fitopatógenas a través de actividades de promoción de crecimiento vegetal (El-Tarabily, 2006), que incluyen la producción de compuestos extracelulares de diversa actividad biológica y estructura química (Learn-Han et al, 2014). Estas bacterias filamentosas Gram positivas tienen un crecimiento lento, a menudo se incuban entre una y dos semanas para desarrollar y diferenciar sus colonias típicas, son resistentes a condiciones adversas dado que sus propágulos son resistentes a la desecación y altas temperaturas (Sylvia, 2005).

Generalidades del frijol

Estudios arqueológicos demuestran que el cultivo de frijol proviene del continente americano, en especial de países como México y Perú donde se han encontrado gran número de especies silvestres que datan entre 5000 y 8000 años de antigüedad; de esta manera se evidencia que esta legumbre constituía uno de los alimentos principales en la dieta de culturas que se desarrollaron en esa región hace más de 8000 años.

La propagación de este grano a los otros continentes se asocia a partir del siglo XVI cuando los españoles transportaron las semillas hacia Europa y los portugueses las repartieron (Fenalce, 2010). Hoy en día están descritas más de 70 especies del género

Phaseolus ampliamente distribuidas en los cinco continentes (Chacón, 2009), sin embargo se han identificado cinco grupos de frijoles como las especies silvestres domesticadas más cultivadas por el hombre, entre ellas se destacan *Phaseolus vulgaris* (frijol común), *Phaseolus coccineus* (frijol ayocote), *Phaseolus lunatus* (frijol comba), *Phaseolus acutifolius* (frijol tepari) y *Phaseolus polyanthus*, siendo *Phaseolus vulgaris* la leguminosa más importante en latinoamérica debido a que constituye una importante fuente de proteína (alrededor del 22% en peso seco) complementando la dieta de parte de la población en América Latina y África (De Ron & Santalla, 2013).

Desde su siembra hasta la cosecha se identifican dos fases generales de desarrollo: la fase vegetativa y fase reproductiva. La fase vegetativa comprende desde la germinación de la semilla hasta la formación de la tercera hoja trifoliada y es donde se forma la mayor parte de la estructura vegetativa necesaria para la reproducción; la fase reproductiva inicia con la aparición de los botones florales en el 50% de las plantas y termina con la maduración de las vainas. De esta manera, en una escala de desarrollo del frijol común se reconocen 10 etapas que diferencian la fase vegetativa y reproductiva, V y R respectivamente (anexo1). Sin embargo, no se define la duración de cada etapa debido a diferentes factores como el clima, suelo, genotipo y hábito de crecimiento que influyen en el desarrollo de la planta (Fernández et al, 1986).

Mundialmente se producen 25 millones de toneladas de frijol seco cada año con un rendimiento en promedio de 832 Kg por hectárea, aunque países como India, Brasil, Myanmar, China, Estados Unidos y México superan esta cifra (De Ron & Santalla, 2013; FAOSTAT, 2015); además, destinan un área considerable para su siembra contribuyendo finalmente con el 66% de la producción mundial anual de esta leguminosa (Fenalce, 2010). Colombia por su parte, produce aproximadamente 170 mil toneladas al año que son consumidas en su mayoría por sus habitantes. A pesar de no ser un buen productor de frijol seco, Colombia supera en rendimiento a Brasil, China, India y México, utilizando un área de cultivo mucho menor que estos países (FAOSTAT, 2015). Pese a que el frijol se cultiva en todas las regiones del país, la mayor producción se concentra en un 93% en la zona andina destacándose los departamentos de Antioquia, Huila, Tolima, Santander y Cundinamarca; siendo Antioquia el departamento que aporta cerca del 27% del volumen de producción nacional (Fenalce, 2010).

En las zonas tropicales donde se cultiva frijol, las enfermedades causadas por hongos disminuyen significativamente el rendimiento de este cultivo y representan un impedimento importante para su producción constituyendo un fuerte impacto económico para el agricultor.

Enfermedades producidas por *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* en los cultivos de frijol

Marchitamiento por *Fusarium oxysporum*: El marchitamiento por *Fusarium* en frijol común es una de las enfermedades más importantes en el mundo ya que llega a disminuir el rendimiento del cultivo hasta un 30% (Ronquillo et al, 2010). La enfermedad es causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, el cual penetra principalmente el hipocótilo o los tejidos de las raíces de la planta, coloniza el tejido vascular y finalmente bloquea la circulación del xilema evidenciándose marchitamiento en toda la planta, clorosis foliar, senescencia prematura de las hojas basales y decoloración del tejido vascular (Xue et al, 2015; Cardona et al, 1982). El inicio de la sintomatología descrita se observa en las hojas inferiores las cuales presentan amarillamiento y marchitamiento a los siete o nueve días después de la inoculación y progresa hacia la parte superior de la planta, en hojas más jóvenes (CIAT, 1994).

Chancro o pudrición radical por *Rhizoctonia solani*: La pudrición causada por *Rhizoctonia solani* se evidencia por una podredumbre radical en la vaina y chancro del tallo. Inicialmente se observan chancros o depresiones de color café rojizo en las raíces y en el hipocótilo de forma alargada y algunas veces circulares, que pueden estar rodeados de un borde más oscuro; después estos chancros aumentan de tamaño tornándose más profundos y rojizos hasta ocasionar finalmente el volcamiento de la planta de frijol (Cardona et al, 1982). Las condiciones óptimas para el desarrollo de la enfermedad son temperatura de suelo de 18°C y humedad de suelo moderada a alta (Cardona et al, 1982), reduciendo la germinación de la semilla, emergencia de las plántulas y estancamiento de las plantas por lo que llega a disminuir la producción del frijol en un 60% (Guerrero et al, 2011).

Las medidas de control para estas enfermedades se basan en prácticas culturales como el establecimiento de un eficiente sistema de drenaje en épocas lluviosas, sembrar la semilla de frijol a poca profundidad, rotar con plantas no hospedantes para reducir la incidencia del patógeno y arar a una profundidad de 20 a 25 cm. También es común la aplicación de fungicidas químicos a la semilla antes o durante de la siembra, siendo Cloroneb y PCNB productos altamente específicos contra *R. solani*.

Por otro lado, el uso de plantas resistentes constituye otra estrategia para disminuir la incidencia del patógeno resultando ser la medida de control más efectiva sobre *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* (CIAT, 1994). Diversos estudios demuestran la eficacia del uso de plantas resistentes por aplicaciones exógenas de ácido salicílico el cual induce tolerancia al estrés provocado por patógenos o factores abióticos (Gális et al, 2004; Senaratna et al, 2000; Palma et al, 2009; Xue et al, 2013); lo anterior podría contribuir con una estrategia práctica en agricultura para la mejora de cultivos de frijol (Xue et al, 2013).

Finalmente, a diferencia de la aplicación de fungicidas químicos, el uso de agentes biocontroladores supone una alternativa amigable con el medio ambiente y con los

microorganismos benéficos presentes en el suelo (Akter et al, 2013). Este método consiste en disminuir la incidencia del patógeno y la severidad de la enfermedad que ocasiona por acción de un agente biocontrolador aplicado en un solo sistema de cultivo; sin embargo, el mayor inconveniente de esta medida es que pocos microorganismos conservan su capacidad antagonica en pruebas de campo (Pliego et al, 2011).

Mecanismos de antagonismo de agentes biocontroladores

Se han reportado gran cantidad de aislamientos de microorganismos con actividad biocontroladora de hongos en los que se identifican diferentes mecanismos de acción. Los mecanismos directos implican el ataque del patógeno directamente, ya sea por la acción de enzimas líticas como quitinasas, glucanasas y proteasas o por la producción y secreción de metabolitos con actividad antimicrobiana como antibióticos, ácido cianhídrico y amoniac. También se incluyen otras estrategias como competencia por espacio y micoparasitismo; en la primera, la capacidad del microorganismo antagonico por colonizar la raíz interfiere con el desarrollo del fitopatógeno y en la segunda, el agente biocontrolador puede crecer, adherirse sobre estructuras fúngicas y penetrar las hifas. Los mecanismos indirectos se relacionan con la inducción de resistencia sistémica de la planta activando su respuesta de defensa frente al estímulo biótico; esto se evidencia por el aumento de moléculas señal como el ácido jasmónico y ácido salicílico, y la producción de glucanasas, quitinasas, peroxidases, catalasas, calosa, suberina y fitoalexinas en los tejidos vegetales (Pliego et al, 2011).

Las actinobacterias, por su parte, son reportadas como bacterias promotoras de crecimiento vegetal (Grönemeyer et al, 2012) y agentes biocontroladores con la capacidad de producir en cantidad gran variedad de metabolitos secundarios y enzimas líticas con actividad antifúngica (Shekhar et al, 2006; Nishimura et al, 2002). La evaluación en el laboratorio de los mecanismos de antagonismo utilizados por las actinobacterias se realiza generalmente por medio de la técnica de enfrentamiento dual, la cual es útil para seleccionar inicialmente los aislamientos con potencial biocontrolador por acción de los metabolitos secundarios que se difunden en el medio de cultivo (Lahoum et al, 2015; Márquez et al, 2002).

METODOLOGÍA

Organismos de estudio

- Actinobacterias

Los aislamientos *MCR 33*, *MCR 26*, *T1J* y *T3A* pertenecen al género *Streptomyces* y han demostrado tener actividad promotora de crecimiento vegetal (Franco, 2008; Prada, 2013). Los aislamientos se encuentran en la colección de microorganismos del laboratorio de la Unidad de Investigaciones Agropecuarias (UNIDIA) de la Pontificia Universidad Javeriana. Prada (2013) identificó que los aislamientos *T1J* y *T3A* tienen una actividad solubilizadora de fósforo significativamente alta, mientras que en el estudio de Franco (2008) el aislamiento *MCR 26* se caracterizó como solubilizador de fosfato, fijador de nitrógeno, tener actividad quitinolítica y antagónica frente a *Rhizoctonia solani* y *Verticillium dahliae*. Por su parte, *MCR 33* presenta actividad celulolítica y es solubilizador de fósforo.

- Hongos fitopatógenos

Rhizoctonia solani y *Fusarium oxysporum* son aislamientos donados por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), caracterizados como patógenos de plantas de frijol.

Establecimiento de bancos de trabajo

- Conservación de *F. oxysporum* y *R. solani*.

A partir de los aislamientos de hongos fitopatógenos proporcionados por el CIAT, se sembró un cuadro de papel filtro en medio PDA y agar avena y se incubó a 28°C durante seis días. A partir de estos cultivos se inocularon cuadros de papel filtro estériles colocados sobre medio PDA y avena; después de seis días de incubación a 28°C, los trozos de papel filtro con micelio del hongo se transfirieron a cajas de Petri estériles e incubaron por una semana para desecación. Finalmente, los cuadros de papel filtro secos se introdujeron en sobres de papel pergamino previamente esterilizados y se almacenaron a temperatura de refrigeración.

- Conservación de los aislamientos de actinobacterias (*MCR 26*, *MCR 33*, *T1J* y *T3A*)

A partir del banco de conservación de los aislamientos *MCR 26*, *MCR 33*, *T1J* y *T3A* del laboratorio UNIDIA se realizó una siembra masiva en agar avena y se incubó a 28°C hasta observar producción de propágulos. Luego se tomaron discos de agar-microorganismo y se incorporaron en un tubo Eppendorf con solución estéril de glicerol al 20% (v/v) para su posterior almacenamiento a -20°C.

Evaluación de crecimiento de *F. oxysporum* y *R. solani* en diferentes medios de cultivo

La evaluación de crecimiento de los hongos fitopatógenos en diferentes medios de cultivo se llevó a cabo para seleccionar el medio para desarrollar las pruebas de antagonismo. La prueba consistió en inocular un disco de agar-micelio en el centro de la caja de Petri y medir el diámetro de la colonia fúngica cada 24 horas durante ocho días de incubación a temperatura ambiente. Este montaje se realizó por quintuplicado en medio PDA, avena y Czapeck.

Pruebas de antagonismo *in vitro*

La relación antagónica actinobacteria-hongo se evaluó por medio de pruebas de enfrentamiento en cultivo dual. Este enfrentamiento es basado en la producción de metabolitos secundarios por bacterias que tienen un efecto negativo en el crecimiento radial de los hongos, por lo que se le confirió una ventaja a la actinobacteria en cuanto al tiempo de desarrollo, correspondiente a 7 y 14 días.

Inicialmente se inoculó la actinobacteria en la parte central y en el extremo de la caja de Petri, como se describe en la *Figura 1*, y después del tiempo de incubación indicado anteriormente se inoculó el disco de agar-micelio. Posteriormente, se realizaron mediciones del crecimiento de la colonia fúngica control comparada con el tratamiento durante siete días cada 24 horas. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

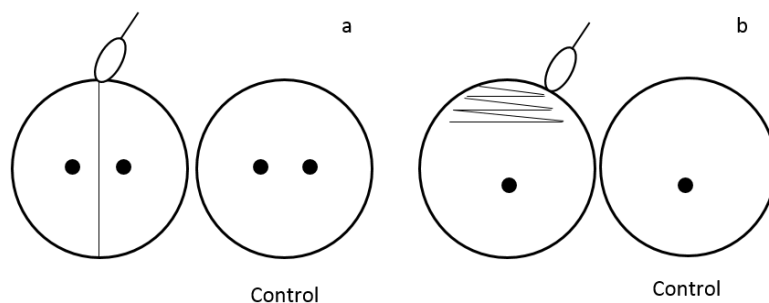


Figura 1. Representación de la evaluación de la capacidad antagonista de los aislamientos de actinobacterias frente a *F. oxysporum* y *R. solani* a nivel *in vitro*. Los círculos negros representan los discos de agar con el hongo y las líneas delgadas la actinobacteria. (a): el disco con el hongo está ubicado a 1 cm del extremo de la caja hacia el interior de esta. (b): el disco con el hongo está ubicado a 3 cm desde el extremo inferior de la caja de Petri y la siembra de la actinobacteria se realiza hasta alcanzar 2 cm desde el extremo superior de la caja de Petri.

Posteriormente se procedió a determinar el porcentaje de inhibición micelial a partir de la siguiente ecuación (Márquez et al, 2002):

$$\% \text{ inhibición micelial} = \frac{Z_n - Z_i}{Z_n} * 100$$

Donde: Z_n = Zona no influenciada por el patógeno (control); Z_i = Zona influenciada por el patógeno

Finalmente se realizó un análisis de área bajo de la curva de los porcentajes de inhibición, seguido de un análisis de varianza para todos los tratamientos y otro análisis de varianza diferenciando la técnica de enfrentamiento dual con siembra central y lateral de la actinobacteria para cada hongo.

La ecuación empleada para el análisis del área bajo la curva fue la siguiente (Istifadah et al, 2006):

$$A_{\text{reap}} = \sum_{i=1}^{n-1} \left[\frac{(Y_{i+1} + Y_i)}{2} \right] (t_{i+1} - t_i)$$

Donde Y es el % de inhibición y t es el día de observación

Evaluación del potencial biocontrolador de las actinobacterias seleccionadas contra *F. oxysporum* y *R. solani* bajo condiciones de invernadero en plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* var. Bachué)

Preparación del material vegetal

Las plántulas de frijol se obtuvieron a partir de semillas variedad Bachué proveniente de SEMICOL SA. Las semillas fueron sometidas a lavado con agua corriente para eliminación del fungicida con el cual se comercializa y desinfección superficial con EtOH 70% (30 segundos), NaClO 5% (5 minutos) y seis enjuagues con agua destilada estéril (Rojas & Vargas, 2009; Ferroni, 2009).

La etapa de germinación inició cuando se dispusieron las semillas desinfectadas sobre una toalla de papel absorbente humedecido con agua destilada estéril; ésta a su vez estaba contenida en un recipiente plástico (cámara húmeda). Después de 4 o 5 días a temperatura ambiente, las semillas germinadas se trasplantaron a semilleros con suelo estéril adquirido en Jardineros Ltda.

Pruebas de patogenicidad de aislamientos de *F. oxysporum* y *R. solani*

Para la prueba de patogenicidad con *F. oxysporum*, se preparó un inóculo inicial en caldo glucosa-extracto de levadura y se incubó durante tres días a 120 rpm; posteriormente se ajustó el inóculo a 10^6 conidios/ml para infectar las plántulas de 13 días de desarrollo post-germinación (primer par de hojas verdaderas completamente extendidas, estadio V2) (Ronquillo *et al*, 2010). La infección se llevó a cabo en condiciones de invernadero, donde se realizaron heridas con tijeras desinfectadas en los ápices de las raíces de 30 plántulas y se continuó con la inmersión de éstas en la suspensión de conidios por 5 minutos (Brick *et al*, 2006 ; Castellanos *et al*, 2011).

El control negativo consistió en la inmersión del sistema radicular con cortes en los ápices de las raíces (17 plántulas) en agua destilada, mientras que para el control absoluto no se hicieron cortes en el sistema radicular y este se sumergió en agua destilada estéril (17 plántulas). Todas las plántulas fueron transplantadas a recipientes plásticos de capacidad de 9 onzas que contenían suelo estéril proveniente de Jardineros Ltda y se mantuvieron en el invernadero de fitopatología de la Pontificia Universidad Javeriana con riego cada dos días, manteniendo el suelo a capacidad de campo.

Durante un mes, cada seis días, se evaluaron los síntomas típicos de marchitamiento causado por *Fusarium* y se estableció una escala de severidad de la enfermedad (Shoonhoven & Pastor-Corrales, 1987). Al final de la evaluación se realizó un muestreo destructivo de las plántulas inoculadas y no inoculadas para medir el avance del patógeno y necrosis en los haces vasculares, pero dado al grado tan severo de la enfermedad no se realizó siembra de tejido de tallo en PDA para medir el avance del patógeno.

Para la prueba de patogenicidad con *R. solani* se inocularon plántulas de 7 días de desarrollo post-germinación (primer par de hojas verdaderas, de $\frac{3}{4}$ a totalmente desplegadas, estadio V2) (Nerey *et al*, 2010). La inoculación se llevó a cabo por dos métodos. El primero, colocando un disco de agar micelio de 5 mm de diámetro (obtenidos a partir del margen de una colonia de *R. solani* cultivada 4 días en medio PDA), en el cuello de la plántula y cubriéndolo con suelo estéril (Velásquez & Medina, 2002). El segundo método, se basó la metodología descrita por el CIAT (2011), en la cual el inóculo se prepara a partir de 800 g de suelo con 50 g de papa picada y 10 discos de agar micelio de 5 mm de diámetro, para luego de 12 días mezclar con suelo estéril a una concentración de 2% (p/p). La evaluación de la sintomatología típica ocasionada por *R. solani* fue evaluada a los 10 días después de la inoculación (Nerey *et al*, 2010).

Prueba de toxicidad con ácido salicílico en plántulas de frijol

Para determinar la concentración de ácido salicílico (AS) a aplicar en uno de los tratamientos control de la evaluación del potencial biocontrolador de las actinobacterias seleccionadas contra *F. oxysporum*, bajo condiciones de invernadero, se dispuso de 7 grupos de plántulas de frijol de 7 días de desarrollo post-germinación. Las concentraciones de AS evaluadas fueron 0,2 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM y 20 mM, preparadas en tween 20 al 0,02% (v/v). Las diferentes concentraciones de AS se aplicaron por aspersión foliar a cada unidad experimental durante siete días consecutivos (Xue *et al*, 2013). El control negativo consistió en la aplicación de solución tween 20 al 0,02% y para el control absoluto se aplicó agua corriente. La evaluación de los síntomas de toxicidad se llevó a cabo durante 14 días desde el primer día de aplicación AS.

Evaluación de desarrollo de marchitamiento vascular generado por *F. oxysporum* en plantas de frijol previamente inoculadas con las actinobacterias seleccionadas.

La evaluación del potencial biocontrolador de *F. oxysporum* en invernadero se realizó con los aislamientos *MCR 33* y *T3A*, los cuales presentaron los mayores porcentajes de inhibición en las pruebas de antagonismo *in vitro*.

Preparación de inóculos de actinobacterias: Se preparó un inóculo en caldo papa a partir de una suspensión de propágulos de cada actinobacteria, incubando en agitación constante (120 rpm) a 28°C, durante 15 días.

Preparación de material vegetal para prueba de antagonismo in planta: Para los tratamientos que incluían actinobacterias, se inoculó suelo estéril con una suspensión de cada actinobacteria a una concentración de 10^6 propágulos/g suelo (Rojas & Vargas, 2009; Ferroni, 2009) para posteriormente sembrar las semillas de frijol previamente germinadas en cámara húmeda. Para el tratamiento de aplicación de AS, plántulas de 8 días de desarrollo post-germinación fueron asperjadas a nivel foliar con una solución de AS 2 mM durante siete días consecutivos, tal como se mencionó en la metodología de la prueba de toxicidad de AS. Todas las plántulas de la prueba se mantuvieron 16 días en el invernadero de docencia de la Pontificia Universidad Javeriana, regando con agua corriente cada dos días para mantener el suelo a capacidad de campo.

Pruebas de antagonismo in planta: Para las pruebas de antagonismo en el invernadero, se establecieron seis tratamientos y dos controles descritos en la tabla 2. Todas las plántulas destinadas para esta prueba tenían 16 días de desarrollo post-germinación, desde su siembra en semilleros, con las hojas del primer trifolio totalmente desplegadas (estadio V3). La inoculación de *F. oxysporum* se llevó a cabo eliminando el suelo adherido al sistema radicular con agua corriente como describió anteriormente. El resto de las plántulas transplantaron a vasos plásticos de 9 oz con suelo estéril. Finalmente, para los tratamientos con actinobacterias se realizó un refuerzo con 10 mL de suspensión de 10^6 unidades propagativas/ml para cada planta (tabla 2, tratamientos 2, 3, 5 y 6). Se realizó

una repetición en el tiempo con tres réplicas compuestas de 10 plántulas por cada unidad experimental.

Tabla 2. Tratamientos del experimento de evaluación del potencial biocontrolador de los aislamientos T3A y MCR 33 contra *F. oxysporum* en plantas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

Tratamiento	Inoculación con <i>F. oxysporum</i>	Inoculación con MCR 33	Inoculación con T3A	Adición ácido salicílico	Heridas en los ápices	Número mínimo de plántulas
1	✓				✓	30
2		✓			✓	30
3			✓		✓	30
4	✓			✓	✓	30
5	✓	✓			✓	30
6	✓		✓		✓	30
Control negativo					✓	30
Control absoluto						30

Variabes evaluadas: Las plantas del experimento fueron mantenidas en el invernadero de fitopatología de la Pontificia Universidad Javeriana con riego cada tres días durante cuatro semanas. Durante este tiempo se evaluó la sintomatología típica causada por *F. oxysporum*, cada cinco días y posteriormente, al finalizar el periodo de observación se realizó un muestreo destructivo de todas las plantas para evaluar el avance del patógeno y la longitud de necrosis. Las observaciones de la sintomatología causada por *F. oxysporum* fueron extrapoladas a los grados de severidad de acuerdo a la escala definida en la prueba de patogenicidad y a la escala propuesta por Shoonhoven A & Pastor-Corrales (1987). Posteriormente los grados de severidad fueron convertidos a porcentaje de severidad para cada tratamiento en base a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ severidad} = \frac{\sum nv}{9N} * 100$$

Donde n= número de plantas en cada categoría, es decir al grado de patogenicidad, v= valor numérico de cada categoría, N= número total de plantas en cada unidad experimental (Quilambaqui et al. 2004; Ramos, 2013).

Finalmente, la severidad de la enfermedad en todos los tratamientos se analizó en función del área bajo la curva (Istifadah et al, 2006) del porcentaje de severidad, seguido de un análisis de varianza junto con un análisis de comparaciones múltiples de Duncan en el programa SPSS Statistics 19.

El avance del patógeno se determinó en 15 plantas por tratamiento, desinfectando superficialmente con EtOH 70% (30 segundos), NaClO 2,5% (5 minutos) y tres enjuagues con agua destilada estéril. Posteriormente se hicieron cortes transversales desde la base

de la raíz principal hacia el tallo cada 5 mm y se ubicaron en orden ascendente en medio PDA suplementado con cloranfenicol (0,2 g/L) y diclorán (800µL/L a una concentración 2%p/v) (Alvarado, 2014). Estas siembras se incubaron a 28°C durante 5 días.

Para evaluar la longitud de necrosis se utilizaron las 15 plantas restantes de cada tratamiento, realizando cortes longitudinales ascendentes desde la base de la raíz principal. Luego se midió el avance de necrosis en cada tallo (Alvarado, 2014).

Se realizó un análisis estadístico en el programa SPSS Statistics 19 correspondiente a un ANOVA de un factor y comparaciones múltiples de Duncan para los datos de avance de patógeno y longitud de necrosis (Alvarado, 2014; Ramos, 2013)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de crecimiento de *F. oxysporum* y *R. solani* en diferentes medios de cultivo

Para la evaluación de crecimiento de *R. solani* y *F. oxysporum* se realizó siembra central de un disco agar micelio en los medios PDA, avena y Czapeck. Los resultados presentados en la figura 2 demuestran, en primera medida, que *R. solani* tiene una velocidad de crecimiento mayor que *F. oxysporum*; el diámetro de la colonia de *R. solani* alcanza el límite de la caja de Petri después de cuatro días de la inoculación en todos los medios evaluados, mientras que *F. oxysporum* lo hace a partir del séptimo día en agar Czapeck, seguido de agar avena en el día octavo y en PDA la colonia no se desarrolló hasta el límite de la caja de Petri sino que alcanzó a medir hasta 6,7 cm de diámetro.

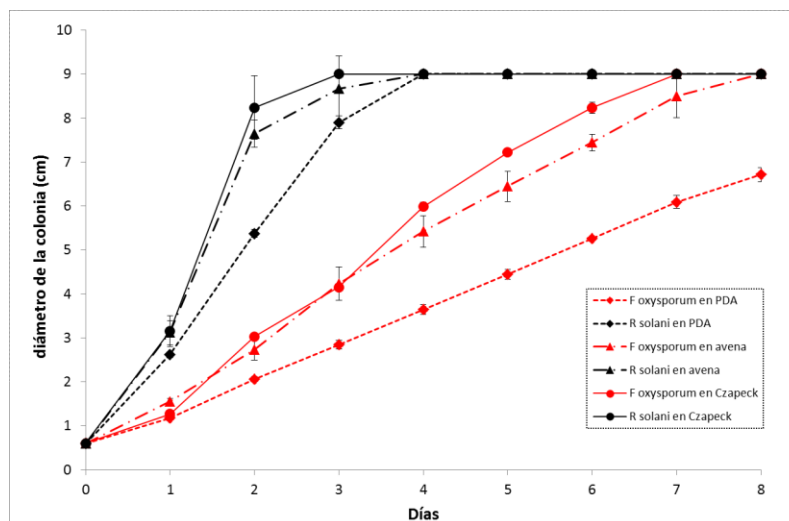


Figura 2. Crecimiento de *R. solani* y *F. oxysporum* en diferentes medios de cultivo.

Por otro lado, se puede evidenciar diferencias en el crecimiento de los hongos evaluados según el medio en el cual fueron cultivados; en ambos hongos se conservó la tendencia en la rapidez de crecimiento siendo Czapeck el medio que permitió un crecimiento más rápido, luego avena y por último PDA. Sin embargo, se observa mayor diferencia en el crecimiento en PDA frente a los otros dos medios de cultivo.

En la evaluación del crecimiento también se registraron diferencias en la morfología de las colonias fúngicas. En el caso de *F. oxysporum* las colonias en PDA eran algodonosas, densas y con pigmentación morada, en avena también se pudo observar pigmentación pero el micelio no presentó crecimiento elevado sobre el sustrato y en Czapeck el micelio era blanco algodonoso. Por su parte, *R. solani* no desarrolló esclerocios en ningún medio, después de cuatro días de incubación el micelio tornaba a un color marrón y era mucho menos denso en agar Czapeck que en PDA y avena.

El medio Czapeck se compone básicamente de nutrientes de naturaleza química y no orgánica que podría no ser de preferencia para los hongos dado su metabolismo quimiorganotrofo (Madigan et al, 2009); lo expuesto anteriormente conlleva a suponer que el micelio poco denso de *R. solani* y *F. oxysporum* en este medio es la evidencia del estrés nutricional del mismo.

El agar avena es usualmente utilizado para facilitar el crecimiento, esporulación e identificación de hongos fitopatógenos dado su alto contenido nutricional proveniente de la avena (Anaconda et al, 2005; Sarria et al, 2008) pero dado a que es un medio opaco, no permite diferenciar la colonia del medio de cultivo, lo que implica menor precisión en la medida del diámetro de la colonia.

La literatura reporta al medio PDA como el más utilizado para el aislamiento, identificación, manutención y preservación de hongos (Dynowska et al, 2011), muchas de las descripciones típicas de *Rhizoctonia* spp. y *Fusarium* spp. se han realizado en base al crecimiento en este medio, el cual contiene una alta proporción de carbono y micronutrientes, provenientes del extracto de papa, incluido el cobre que juega un papel fundamental en el desarrollo del hongo debido a que es cofactor enzimático de variedad de oxidasas implicadas en la pigmentación y en la formación de otros metabolitos (Griffith et al, 2007). Además, la facilidad en su preparación, bajo costo de sus ingredientes (Narrea & Malpartida, 2006) y su propiedad traslúcida que permite realizar un seguimiento más detallado del desarrollo del hongo, hace llamativo el uso de este medio en el laboratorio. Por otro lado, es un medio de cultivo que también permite la difusión de metabolitos secundarios (pigmentos) de las actinobacterias, los cuales inhiben el desarrollo de hongos patógenos por antibiosis (Márquez et al, 2002). Lo anterior se apoya en los estudios de Farfán y Gutiérrez (2009) y Duque y Quintana (2008). Los primeros evaluaron la actividad antifúngica de 14 aislamientos de actinobacterias en PDA y observaron que todos los aislamientos de actinobacterias presentaron algún porcentaje de inhibición contra *Fusarium* sp. y *Rhizoctonia* sp.; mientras que Duque y Quintana (2008) evaluaron el efecto antagónico de algunos de los mismos aislamientos de actinobacterias en agar avena y encontraron que el 90,9% no presentó inhibición alguna frente a *Fusarium oxysporum*.

El crecimiento retardado de *R. solani* y *F. oxysporum* en PDA comparado con avena y Czapeck, permite una evaluación más prolongada y detallada del efecto en el desarrollo de la colonia fúngica en presencia de los aislamientos de actinobacterias en las pruebas de antagonismos. Su propiedad traslúcida, fácil preparación y buena difusión de metabolitos secundarios son otras características por las cuales conllevan a su selección para realizar la evaluación del potencial biocontrolador de los aislamientos MCR26, MCR 33, T3A y T1J *in vitro*.

Pruebas de antagonismo *in vitro*

El potencial biocontrolador *in vitro* de los aislamientos MCR 33, MCR 26, T3A y T1J fue evaluado en función del porcentaje de inhibición de los hongos fitopatógenos durante

siete días. Este seguimiento a través del tiempo permitió evaluar finalmente el efecto antagónico de las actinobacterias en término de área bajo la curva.

El análisis de varianza del área bajo la curva de los porcentajes de inhibición, mostró diferencia significativa del efecto antagónico entre las cepas MCR 33 y T3A frente a MCR 26 y T1J, tanto para *F. oxysporum* como para *R. solani*, siendo los dos primeros aislamientos aquellos que representan los mayores valores de porcentaje de inhibición de crecimiento fúngico (Figura 3).

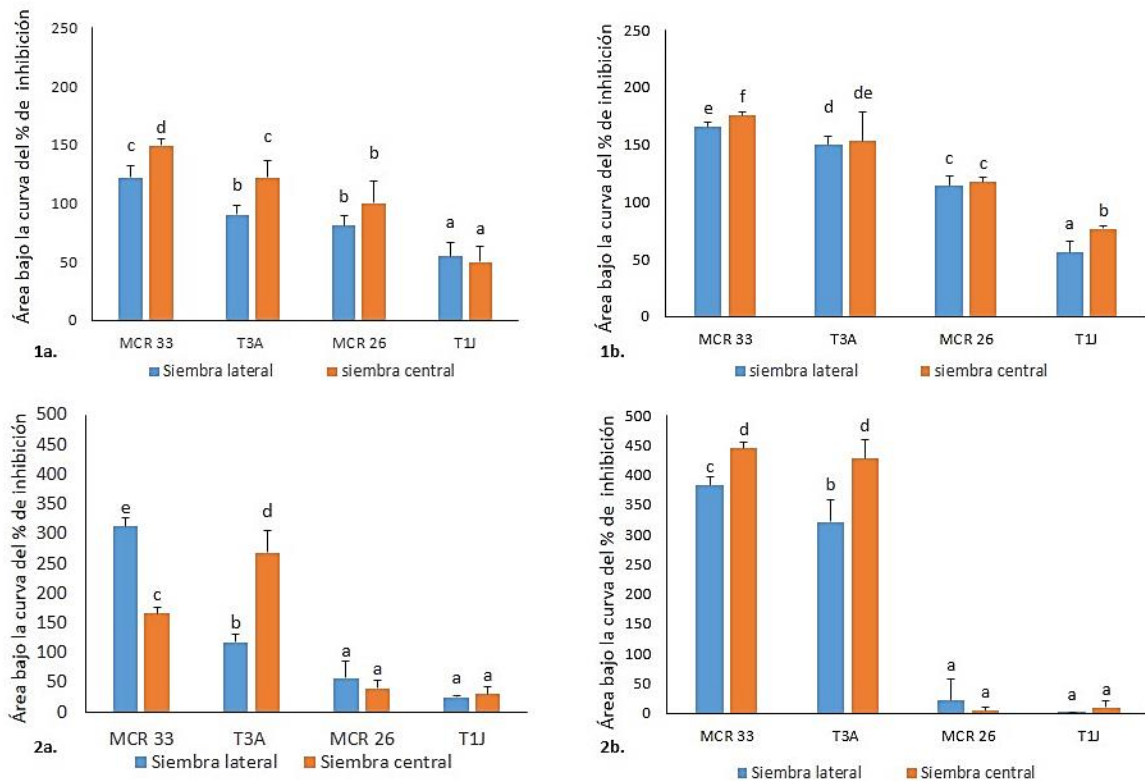


Figura 3. Área bajo la curva de los porcentajes de inhibición de los aislamientos MCR 33, T3A, MCR 26 y T1J frente a *R. solani* y *F. oxysporum*. **1a.** Actinobacterias incubadas 7 días antes de la inoculación con *R. solani* **1b.** Actinobacterias incubadas 14 días antes de la inoculación con *R. solani* **2a.** Actinobacterias incubadas 7 días antes de la inoculación con *F. oxysporum* **2b.** Actinobacterias incubadas 7 días antes de la inoculación con *F. oxysporum*. Las letras en la parte superior de cada barra, corresponden a las agrupaciones de Duncan.

En el caso de *F. oxysporum*, el antagonismo generado por los aislamientos MCR 33 y T3A mostraron diferencias significativas frente a MCR 26 y T1J a los siete y catorce días de incubación, siendo MCR 33 el aislamiento que inhibe en mayor medida el desarrollo de la colonia fúngica en ambos tiempos de evaluación.

Las figuras 4 y 5 ilustran el desarrollo de *F. oxysporum* frente a MCR 26, MCR 33, T3A y T1J en medio PDA mediante las dos técnicas de enfrentamiento dual utilizadas.

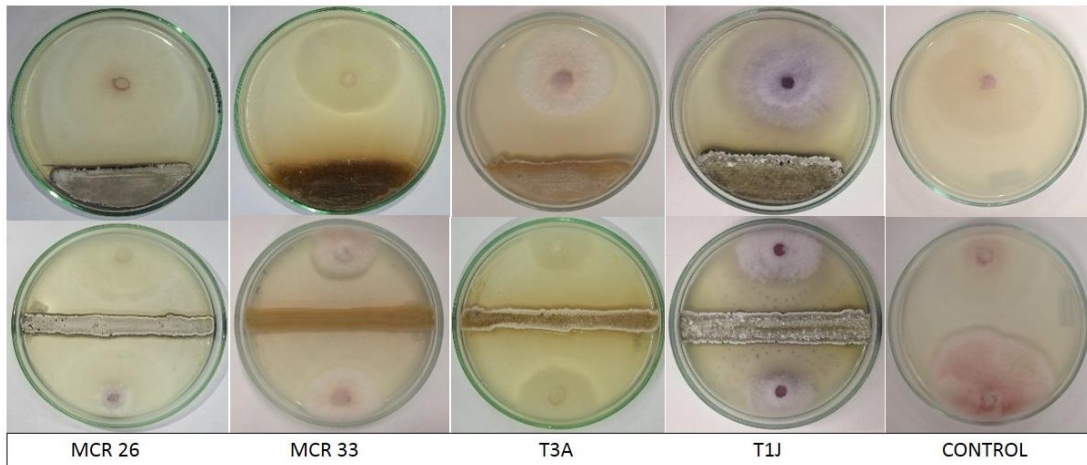


Figura 4. Técnica de enfrentamiento dual entre *F. oxysporum* y los aislamientos de actinobacterias, *MCR 26*, *MCR 33*, *T3A* y *T1J*, de izquierda a derecha, incubadas 7 días antes de la inoculación del hongo

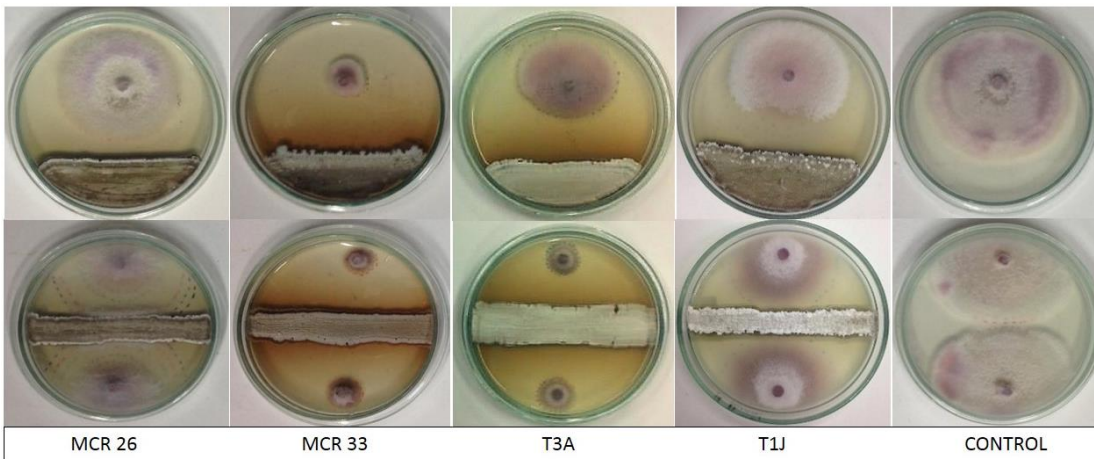


Figura 5. Técnica de enfrentamiento dual entre *F. oxysporum* y los aislamientos de actinobacterias, *MCR 26*, *MCR 33*, *T3A* y *T1J*, de izquierda a derecha, incubadas 14 días antes de la inoculación del hongo

Cuando las actinobacterias son sembradas siete días antes de la inoculación del hongo (Figura 4) se observa que hay actividad antifúngica porque la colonia deja de ser concéntrica con respecto al control, mientras que cuando son sembradas 14 días previos a la inoculación con el fitopatógeno (Figura 5) la inhibición del crecimiento micelial se incrementa observando colonias con diámetro mucho menor con respecto a la que no está influenciada por la actinobacteria; adicionalmente, se observa mayor pigmentación en el medio.

Aunque los aislamientos *MCR 26* y *T1J* no demostraron tener efecto inhibitorio sobre *F. oxysporum*, se puede observar ciertas modificaciones sobre la zona de la colonia que está directamente influenciada por estas actinobacterias. En la figura 5 se puede apreciar de forma más detallada que aunque hay crecimiento, el micelio deja de ser algodonoso y pierde pigmento. Esto podría relacionarse con la acción de enzimas líticas como

glucanasas y quitinasas que se pueden producir y difundir en una mínima proporción en PDA, éstas tienen un efecto negativo sobre la pared celular de hongos fitopatógenos, específicamente sobre polímeros de glucano y quitina respectivamente (Abd-Allah, 2001; Gonzalez et al, 2003). La producción de enzimas líticas es considerado un mecanismo de antagonismo por parte de las actinobacterias en virtud de su potencial biocontrolador sobre hongos fitopatógenos (Poomthongdee et al, 2015), sin embargo no siempre existe correlación entre la actividad enzimática y el efecto antagónico que tienen sobre hongos patógenos de plantas como *Fusarium* sp. y *Rhizoctonia* sp. (Farfán & Gutiérrez, 2009), de manera que se puede considerar la acción de otro tipo de metabolitos con esta actividad.

Al igual que en *F. oxysporum*, se realizó un análisis estadístico de varianza para *R. solani* demostrando que MCR 33 también es el aislamiento que mantiene el mayor efecto inhibitorio en los dos tiempos de siembra de las actinobacterias (Figura 3) pronunciándose más cuando se ha incubado por 14 días antes de la inoculación con el hongo (Figura 7).

Cabe anotar que a diferencia de *F. oxysporum*, *R. solani* se desarrolla más rápido (tal como se describió en el apartado de la evaluación de crecimiento) ocupando toda la caja de Petri en término de tres días, por lo que en el enfrentamiento dual se observa más diferenciado el antagonismo dado que se evidencia una línea paralela, correspondiente al límite del crecimiento fúngico con respecto a la siembra de la actinobacteria; sin embargo, cuando el grado de inhibición es mayor, el crecimiento de la colonia de *R. solani* está más limitada a una forma circular (Figura 7). Las figuras 6 y 7 ilustran el desarrollo de *R. solani* frente a MCR 26, MCR 33, T3A y T1J en medio PDA mediante las dos técnicas de enfrentamiento dual utilizadas en diferentes tiempos de incubación de las actinobacterias. También se puede apreciar que *Streptomyces* sp. MCR 26 tuvo un notorio efecto inhibitorio sobre *R. solani*, no obstante, después de cierto tiempo de evaluación se desarrollan colonias satélite en el espacio donde hay influencia directa de la actinobacteria. Por su parte, T1J no indica ser agente antagónico sobre este hongo puesto que la colonia fúngica hace contacto con la actinobacteria al final del tiempo de evaluación.

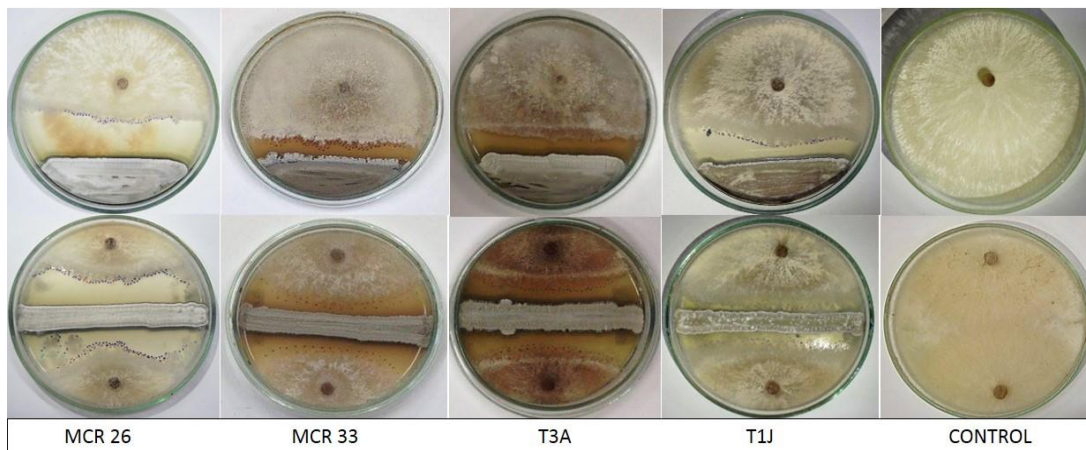


Figura 6. Técnica de enfrentamiento dual entre *R. solani* y los aislamientos de actinobacterias, MCR 26, MCR 33, T3A y T1J, de izquierda a derecha, sembradas 7 días antes de la inoculación con el hongo

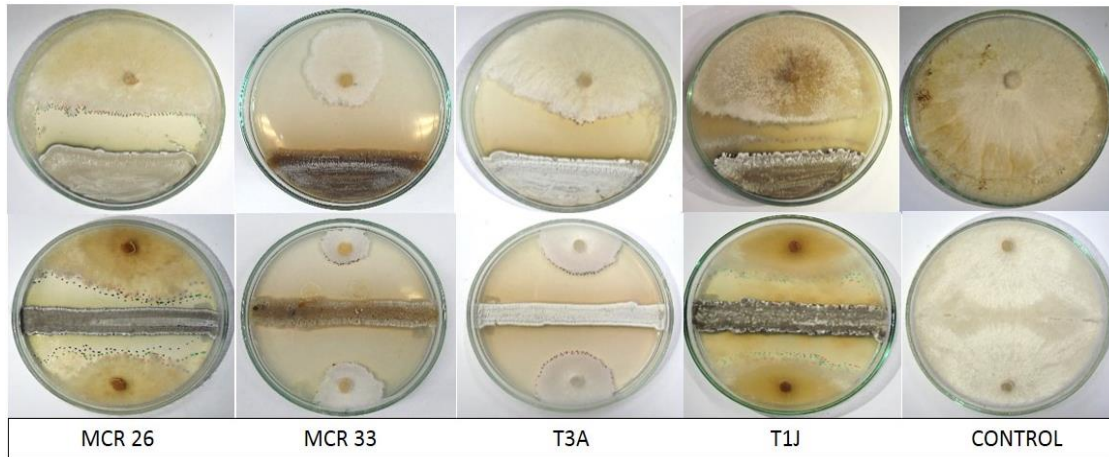


Figura 7. Técnica de enfrentamiento dual entre *R. solani* y los aislamientos de actinobacterias, MCR 26, MCR 33, T3A y T1J, de izquierda a derecha, sembradas 14 días antes de la inoculación con el hongo.

Esta interacción actinobacteria-hongo es definida como antibiosis o amensalismo, en el cual un organismo antagonista (actinobacteria) produce moléculas que contribuyen a la inhibición o reducción del crecimiento de otro microorganismo. Este fenómeno es el mecanismo de antagonismo más utilizado por las actinobacterias (Errakhi et al, 2009) dado su especial potencial de producir compuestos bioactivos con actividad antifúngica (Harikrishnan et al, 2014).

Los resultados de las técnicas de enfrentamiento dual hacen evidente la alta actividad antagónica de los aislamientos MCR 33 y T3A frente a *F. oxysporum* y *R. solani*, lo cual es atribuido a su capacidad de producir metabolitos secundarios que se difunden en el medio de cultivo y actúan de forma negativa sobre el crecimiento del fitopatógeno (Evangelista, 2014). La producción de estos metabolitos podría reflejarse en la pigmentación marrón que toma el medio PDA a medida que aumenta el tiempo de incubación de estas actinobacterias, estos pigmentos son melaninas compuestas por polifenoles y polímeros multifuncionales que tienen actividad antibacteriana y antifúngica, además de tener funciones biológicas como protección de los rayos UV, antioxidantes y quelantes de cationes (Muangham et al, 2014). De este modo, se asocia que a mayor pigmentación, mayor efecto inhibitorio sobre el hongo; lo anterior coincide con el estudio de Pezet y colaboradores (1999), quienes demuestran que existe una fuerte correlación entre la cantidad de metabolitos producidos y el efecto inhibitorio que tienen sobre el crecimiento micelial.

La evidencia de la producción de pigmentos y el alto grado de inhibición de MCR 33 y T3A sobre *F. oxysporum* y *R. solani* por medio de las técnicas de enfrentamiento dual, conllevan a la selección de estos aislamientos como los más promisorios para la evaluación de su potencial biocontrolador a nivel de invernadero. Esto, apoyado con el análisis estadístico de todos los tratamientos, que además indica que no hay diferencias entre siembra lateral y central del mayor antagonismo generado por los aislamientos MCR 33 y T3A frente a MCR 26 y T1J.

Prueba de toxicidad con ácido salicílico en plántulas de frijol

El ácido salicílico (AS) es una molécula involucrada en la inducción de resistencia sistémica adquirida (RSA) como mecanismo de señalización y consecuente defensa de la planta frente al ataque de patógenos; esta vía puede ser activada por microorganismos patógenos o por aplicaciones exógenas de AS y sus análogos químicos o funcionales (Tuzun & Bent, 2006). Diversos estudios demuestran que la aplicación de AS a las raíces o al follaje inducen resistencia sistémica aumentando la protección de la planta frente a la acción de patógenos como *Fusarium* (Ojha & Chatterjee, 2012; Sorahinobar et al, 2016; Xue et al, 2013), por lo que su uso puede constituir un método alternativo en un plan de manejo integrado de enfermedades (Sillero et al, 2012).

Se evaluó el efecto tóxico de cinco concentraciones de AS en comparación con los controles durante siete días después de la última aplicación foliar. La figura 8 ilustra que el AS es tóxico para las plántulas a partir de la concentración 4 mM, evidenciando pérdida de turgencia y necrosis en el borde de las hojas basales, siendo más severo cuando se incrementa la concentración a 20 mM; sin embargo no se observa algún efecto negativo sobre las plántulas tratadas con las concentraciones inferiores. Lo anterior indica que altas concentraciones de AS tienen un efecto fitotóxico que podría desencadenar en la disminución de los niveles de respuesta en la planta como baja actividad de peroxidasas, polifenol oxidasas y fitoalexinas, las cuales actúan en la inducción de resistencia sistémica en la planta (Durango et al, 2013).

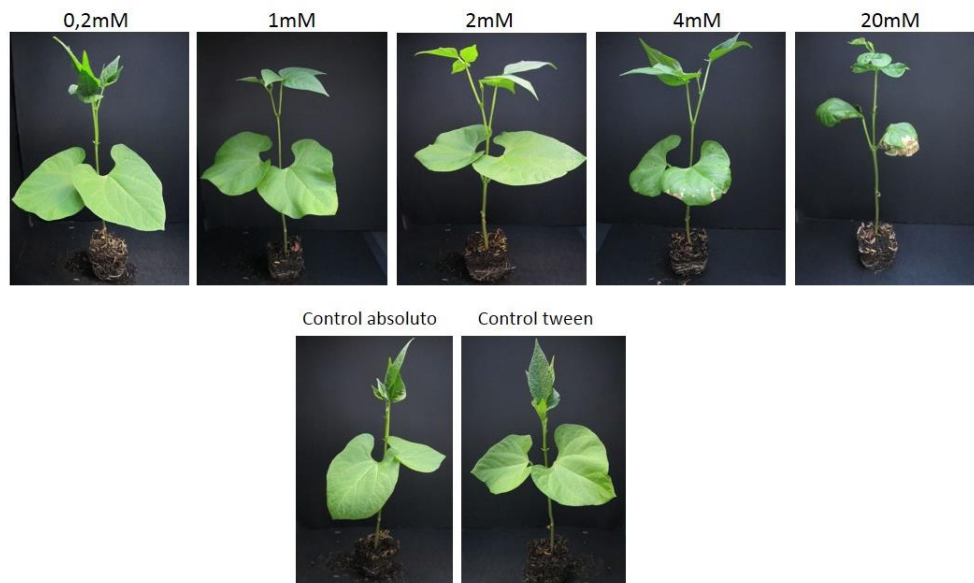


Figura 8. Efecto tóxico de diferentes concentraciones de ácido salicílico después de siete días de la última aplicación foliar.

Teniendo en cuenta la inducción de resistencia sistémica por medio de aplicaciones exógenas de AS y la evaluación de su efecto tóxico en plántulas de frijol, se seleccionó la

concentración 2mM de AS para ser aplicada en las plántulas de la prueba de evaluación del potencial biocontrolador de actinobacterias contra *F. oxysporum* a nivel de invernadero, esperando que haya algún control de la enfermedad cuando se inocule el patógeno en el sistema radicular, tal como lo describe Xue y colaboradores (2013) cuando evaluaron el papel del AS en el control de *F. oxysporum* con plántulas de frijol común.

Pruebas de patogenicidad de aislamientos de *F. oxysporum* y *R. solani*

La evaluación de marchitamiento vascular causado por *F. oxysporum* en plantas de frijol, se llevó a cabo bajo las condiciones del invernadero de fitopatología de la Universidad Javeriana definiendo así una escala de severidad de la enfermedad (figura 9) en base a las descripciones de Schoonhoven & Pastor Corrales (1987).



Figura 9. Escala de severidad del marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* en plántulas de frijol común. Adaptado de Schoonhoven & Pastor Corrales (1987). **1.** No hay síntomas visibles. **3.** Menos del 10% del follaje presenta clorosis. **5.** Alrededor del 25% de hojas y ramas presentan marchitamiento y clorosis. **7.** Más del 50 % de las hojas y ramas presentan marchitamiento, clorosis y necrosis limitada, las plantas presentan retraso en el crecimiento. **9.** Más del 75% de hojas y ramas presentan marchitamiento, necrosis y defoliación prematura, las plantas tienen retraso severo en el crecimiento.

Los primeros síntomas se presentaron a los nueve días después de la inoculación con el patógeno. Se observó amarillamiento en las hojas basales y luego en las hojas trifoliadas, seguido de marchitamiento en el follaje hasta observar retraso en el crecimiento. Aunque en la escala propuesta por Schoonhoven & Pastor Corrales (1987) se indica que hay defoliación prematura de las hojas en la escala 9 de la enfermedad, sólo se observó defoliación prematura en algunas plantas y únicamente de hojas basales.

Los síntomas de la enfermedad se presentaron de forma severa, al punto de evidenciar signo en la base del tallo como micelio blanco algodonoso, al cual se realizó impronta y se observó en el microscopio la presencia de macroconidios típicos de *F. oxysporum* (figura 10), lo que indica la agresividad del aislamiento de *F. oxysporum* para causar la enfermedad.

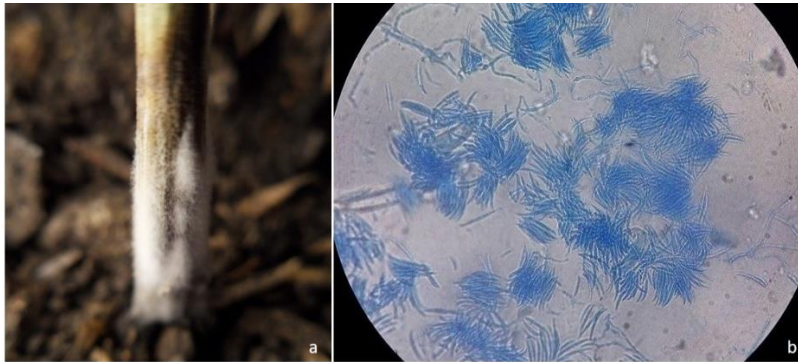


Figura 10. Signo de infección por *F. oxysporum* en plantas de frijol común. **a.** Micelio blanco algodonoso en la base del tallo **b.** Macroconidios, fragmentados fusiformes (400x).

La sintomatología causada por *R. solani*, se indujo con un disco de agar micelio puesto sobre la base del tallo y, por otro lado, adicionando un inóculo primario de suelo. Las dos metodologías se evaluaron después de diez días mostrando que el 67% de las plantas inoculadas con disco presentaban síntomas de la enfermedad, mientras que un 33% de las plantas inoculadas con inóculo primario manifestaron los síntomas de pudrición radical. La figura 11 ilustra la pudrición desarrollada en el tallo en forma de depresiones o chancros de color café rojizo comparado con una planta sin inocular, estos chancros se presentaron de forma más severa en plantas inoculadas con disco de agar micelio.



Figura 11. Síntomas causados por *R. solani* en frijol común. **a.** Control negativo de infección, **b.** Infección con inóculo primario, **c.** Infección con disco de agar micelio.

Evaluación del potencial biocontrolador de las actinobacterias seleccionadas contra *F. oxysporum* bajo condiciones de invernadero en plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* var. Bachué)

La evaluación *in vivo* del potencial biocontrolador de los aislamientos MCR 33 y T3A contra *F. oxysporum* en comparación con el control positivo mostró diferencias significativas ($p\text{-valor}=5 \times 10^{-11}$), donde se evidencia que el AS no indujo algún efecto de control sobre el desarrollo de enfermedad y al mismo tiempo mostró la mayor severidad de la enfermedad respecto a los otros tratamientos (Figura 12).

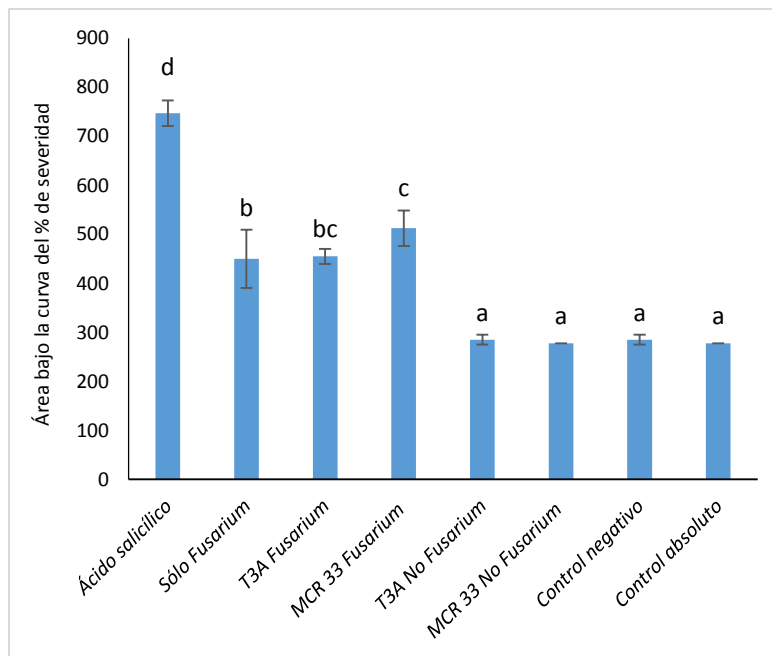


Figura 12. Área bajo la curva del porcentaje de severidad de marchitamiento vascular por *F. oxysporum* en plantas de frijol. Las letras diferentes indican diferencia significativa en la severidad de la enfermedad según las agrupaciones Duncan. Las barras sobre cada columna hacen referencia a la desviación estándar de cada tratamiento.

A pesar que MCR 33 y T3A fueron los aislamientos que presentaron los mayores porcentajes de inhibición micelial en el laboratorio, no se evidenció algún efecto controlador en el experimento *in vivo*; incluso la severidad de la enfermedad en el tratamiento *MCR 33-Fusarium* mostró ser mayor comparado con el grupo de plantas inoculadas únicamente con *F. oxysporum*. Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal actúan como elicitores induciendo resistencia sistémica inducida (RSI) a través del aumento de moléculas señales como el ácido jasmónico y el etileno (Choudhary et al, 2007; Liu et al, 1995). La mayor severidad observada con la inoculación del aislamiento MCR 33 podría ser evidencia del estrés causado por éste, aumentando los niveles de etileno, que en altas cantidades, genera clorosis y acelera la senescencia y caída de las hojas (Jordán & Casaretto, 2006).

Este experimento del potencial biocontrolador de las actinobacterias seleccionadas se llevó a cabo en el invernadero de fitopatología de la Universidad Javeriana, al igual que la prueba de patogenicidad con *F. oxysporum*, sin embargo la severidad de la enfermedad no se manifestó de manera similar en ambos experimentos siendo evaluados durante el mismo número de días. La sintomatología de la enfermedad causada por *F. oxysporum* puede variar dependiendo de las condiciones ambientales (CIAT, 1981), de esta manera se podría atribuir que dado que el invernadero no cuenta con un sistema para regular la temperatura y humedad, los síntomas de la enfermedad no se presentaron de la misma forma cuando se realizó la prueba de patogenicidad (días soleados) y la evaluación biocontroladora *in vivo* (días lluviosos). Adicionalmente, la diferencia de días de desarrollo de las plántulas inoculadas, hace más vulnerable a las plántulas destinadas a la prueba de patogenicidad debido a su menor cantidad de días post-germinación a la que fueron inoculadas con respecto a las del experimento del potencial biocontrolador.

En la figura 13 se puede observar que la mayor severidad se presentó en las plantas del tratamiento con AS. A pesar de observar marchitamiento del follaje y defoliación de hojas, el tallo permaneció erguido sin observar presencia de signo en la base del tallo. Aunque se esperaba control de la enfermedad por la adición de AS, la aplicación foliar de esta molécula no indujo resistencia sistémica a la planta para contrarrestar el ataque del patógeno; pudiera pensarse que se generó una saturación de respuesta al estrés después de seguidas aplicaciones de AS ya que los sistemas de inducción de resistencia al estrés son muy sensibles a la presencia de compuestos inductores (Tao et al, 2003).



Figura 13. Experimento de control de marchitamiento por *F. oxysporum* en frijol. De izquierda a derecha los tratamientos corresponden a: **a.** ácido salicílico + *F. oxysporum* **b.** *F. oxysporum* **c.** T3A + *F. oxysporum* **d.** MCR 33 + *F. oxysporum* **e.** T3A **f.** MCR 33 **g.** control negativo **h.** control absoluto **1.** Longitud de necrosis en los tallos de frijol para cada tratamiento **2.** Severidad de la enfermedad en plantas de frijol después de 30 días de evaluación para cada tratamiento.

La longitud de necrosis en el tallo (figura 13) también evidenció el mayor desarrollo de la enfermedad en el tratamiento con AS, pero no se presentaron diferencias significativas frente a los tratamientos en los que se inoculó *F. oxysporum* (figura 14). (p-valor = $2,85 \times 10^{-9}$)

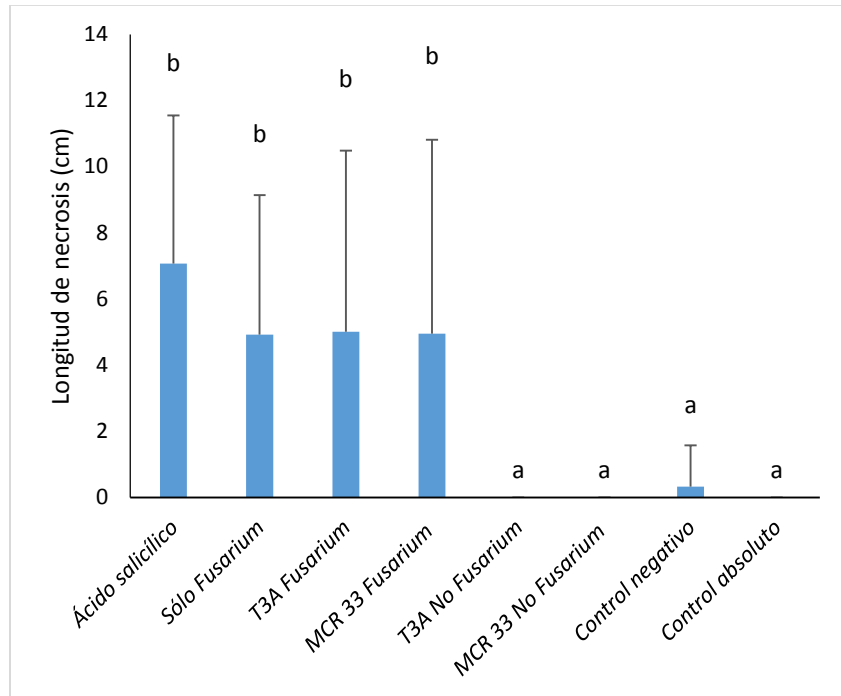


Figura 14. Longitud de necrosis de haces vasculares en plantas de frijol. Las letras diferentes indican diferencias significativas en la longitud de necrosis según agrupaciones Duncan.

Diferentes autores (Cardona et al, 1982; Buruchara & Camacho, 2000) describen un oscurecimiento o tejido necrosado en los haces vasculares como una sintomatología típica en frijol causado por *F. oxysporum*. La longitud de necrosis registrada en centímetros en este montaje hace evidente el avanzado proceso infeccioso del patógeno y confirma que no hubo control de la enfermedad por parte de las actinobacterias.

Por otra parte, cabe resaltar que este proceso infeccioso también se evaluó por medio de los resultados obtenidos en el avance del patógeno, el cual demuestra el establecimiento del hongo en su hospedero para los cuatro tratamientos que implicaban su inoculación, sin presentar diferencias significativas entre estos cuatro tratamientos (figura 15). Sin embargo, se determinó el avance de otra especie de *Fusarium* en los tratamientos sin inoculación del patógeno, dada la diferencia en el color naranja de la colonia respecto al color morado que caracteriza al patógeno. Pese a esto, no se encontró presencia de colonias fúngicas en medio PDA, donde se sembraron diluciones seriadas del suelo utilizado en el experimento, el cual se sometió a tres ciclos de esterilización en autoclave. La colonización de las plantas de frijol por una especie diferente de *Fusarium* a la

evaluada en este experimento, sugiere la presencia de clamidosporas como estructuras de resistencia de algunas especies del género *Fusarium*, las cuales le permiten sobrevivir durante años en el suelo hasta que condiciones favorables estimulen su proceso germinativo (Dhingra & Netto, 2001).

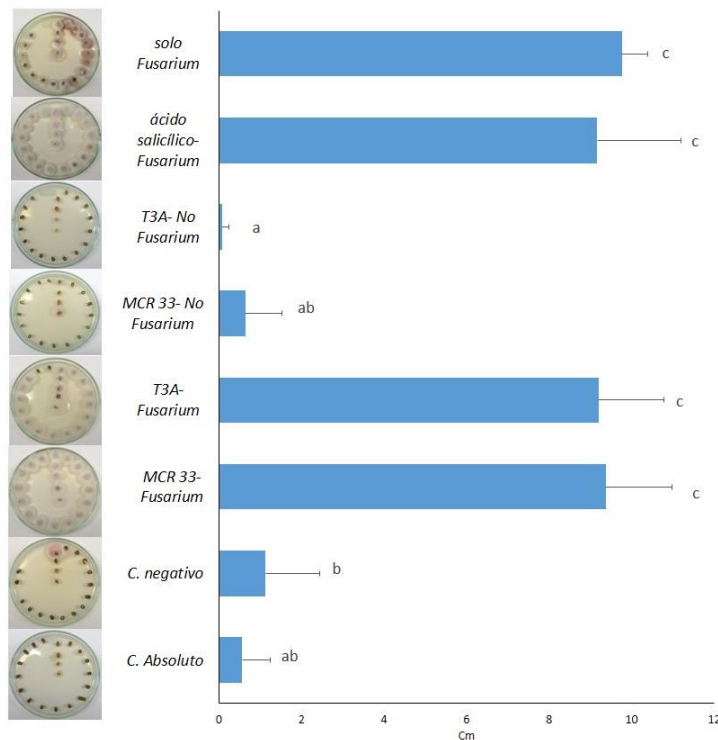


Figura 15. Avance de *F. oxysporum* en el sistema vascular de plantas de frijol. Las letras diferentes indican diferencias significativas en la longitud de necrosis según agrupaciones Duncan.

Kloeppler y Schroth (1981) afirman que la habilidad de las PGPR para inducir promoción de crecimiento en la planta está relacionada, en parte, a la antibiosis que ocurre en la rizósfera y el consecuente desplazamiento de ciertos microorganismos colonizadores de la raíz, aunque es necesario garantizar una efectiva colonización de las PGPR en el sistema radicular (Kloepper et al, 1980). De esta manera, la falta de control del desarrollo de *F. oxysporum* en plantas de frijol por parte de los aislamientos MCR 33 y T3A podría indicar que en realidad estas actinobacterias no tienen el potencial antagónico frente al patógeno o que no hubo suficiente colonización en la raíz del frijol para generar el efecto controlador esperado. La posible ausencia de colonización efectiva de la rizósfera de las plantas de frijol por partes de las actinobacterias, estaría influenciada por varios factores como la baja viabilidad de los aislamientos al ser inoculados, temperatura y humedad del suelo e incluso que las PGPR tengan especificidad por la planta hospedero (Kloepper et al, 1980), lo que reduce la posibilidad de caracterizar un aislamiento capaz de mantener su actividad antagónica en condiciones de invernadero.

En ocasiones resulta confuso diferenciar entre control biológico y promoción del crecimiento vegetal dado que no siempre el término biocontrol implica ser PGPR (Doubou et al, 2016), sin embargo cabe destacar la característica PGPR de los aislamientos evaluados gracias a su capacidad de promover el desarrollo radicular en plantas de frijol. La figura 16 muestra leves diferencias en desarrollo del sistema radicular de plantas inoculadas con actinobacterias frente a aquellas que estuvieron sometidas al estrés ocasionado por los cortes en la zona apical de la raíz, al patógeno mismo y a la adición de ácido salicílico. Dichas diferencias, demuestran que la promoción del crecimiento vegetal de los aislamientos MCR 33 y T3A, no sólo se limita al control de *F. oxysporum* por antibiosis en relación a los resultados de las pruebas de antagonismo *in vitro*.

Kloepper (1996) indica que podría ser más beneficioso emplear organismos que tienen tanto actividad biocontroladora como actividad de promoción directa de crecimiento vegetal, en el momento de desarrollar un producto comercial destinado a sistemas agrícolas. Este planteamiento hace necesario evaluar la dinámica de colonización de la raíz del frijol por parte de las actinobacterias analizadas, para confirmar su actividad biocontroladora, y dar continuidad al estudio de éstas como candidatas para prevenir la infección y desarrollo de enfermedades generadas por patógenos del suelo en frijol común.



Figura 16. Sistema radicular de plantas de frijol en el experimento del control de marchitamiento vascular por *F. oxysporum*, de izquierda a derecha los tratamientos corresponden a: **a.** Ácido salicílico + *F. oxysporum*, **b.** *F. oxysporum*, **c.** T3A + *F. oxysporum*, **d.** MCR 33 + *F. oxysporum*, **e.** T3A, **f.** MCR 33, **g.** Control negativo, **h.** Control absoluto.

Pese a que no se incluyen los resultados de la evaluación del potencial biocontrolador de los aislamientos MCR 33 y T3A contra *R. solani*, debido a que no se alcanzó a registrar todos los datos, se esperaría control de pudrición radical en plantas de frijol si se aumenta el tiempo de interacción actinobacteria-sistema radicular con respecto al intervalo de días establecido en el experimento con *F. oxysporum*. Esto con el fin de incrementar la

posibilidad de colonizar efectivamente la rizósfera dado el metabolismo más lento de las actinobacterias en comparación con bacterias no filamentosas, con las que se han realizado más estudios.

CONCLUSIONES

- El medio PDA es el más apropiado para realizar pruebas de antagonismo *in vitro* dada su característica traslúcida que permite realizar un seguimiento detallado del desarrollo del hongo y la posibilidad de difusión de metabolitos secundarios con actividad antifúngica.
- Los aislamientos MCR 33 y T3A presentaron la mayor actividad antagónica frente a *F. oxysporum* y *R. solani* en pruebas de antagonismo por la técnica de enfrentamiento dual, lo que se puede relacionar con la mayor producción de pigmentos o melaninas por parte de estas actinobacterias en medio PDA.
- La inoculación con disco de agar micelio induce de forma más severa la enfermedad por *R. solani* en plantas de frijol, seleccionando esta metodología para la inoculación de plántulas de frijol en el experimento de la evaluación del potencial biocontrolador de los aislamientos MCR 33 y T3A frente a *R. solani* en condiciones de invernadero
- La aplicación foliar de ácido salicílico a 2mM no indujo resistencia sistémica; por el contrario, el estrés generado evidenció mayor grado de severidad de marchitamiento vascular frente a los demás tratamientos.
- No existe relación entre la actividad antagónica evidenciada en el análisis *in vitro* y el potencial biocontrolador evaluado en condiciones de invernadero.
- Es necesario asegurar una colonización efectiva de la rizósfera por parte de las actinobacterias para evidenciar su efecto antagónico en plantas de frijol.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abawi G, Pastor-Corrales M (1990) *Root rots of beans in Latin America and Africa: diagnosis, research methodologies, and management strategies*. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)

Abd-Allah E.F (2001) *Streptomyces plicatus* as a Model Biocontrol Agent. *Folia Microbiology* 46(4): 309- 314

Akter S, Kadir J, Juraimi AS , Saud H , Elmahdi S (2014) Isolation and identification of antagonistic bacteria from phylloplane of rice as biocontrol agents for sheath blight. *Journal of Environmental Biology* 35: 1095-1100

Alvarado A. M (2014) Caracterización molecular por AFLP y evaluación de factores de patogenicidad de *Fusarium* spp. aislados de humanos, animales y plantas como herramientas para el planteamiento de un modelo multihospedero. Tesis maestría. Facultad de ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia

Anacona A, Sabogal S, Garcés E (2005) Distribución de las especies de hongos asociadas al abrigo de hojas. En *Estrategias adaptativas de plantas del páramo y del bosque altoandino en la Cordillera Oriental de Colombia* (pág. 111). Bogotá D.C: Universidad Nacional de Colombia

Bach T, Díaz M (2009) Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) en la agricultura. *XXIV reunión latinoamericana de rizobiología (XXIV RELAR) y I conferencia iberoamericana de interacciones beneficiosas microorganismo-planta-ambiente (I IBEMPA)* Cuba, pp 35-38.

Buruchara R. A , Camacho L (2000) Common bean reaction to *Fusarium oxysporum* f. sp. phaseoli, the cause of severe vascular wilt in Central Africa. *Journal of Phytopathology*, 148: 39-45

Brick M, Byrne P, Schwartz H, Ogg J, et al. (2006) Reaction to three races of *Fusarium* Wilt in the *Phaseolus vulgaris* core collection. *ProQuest Agriculture Journals* 46(3): 1245-1252

Broughton W, Hernández, Blair G, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J (2003) Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes *Plant and Soil* 252:55-128

Cardona C, Flor C, Morales F, Pastor Corrales M (1982) *Problemas de campo en los cultivos de frijol en América Latina* (Segunda ed.) Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali

Castellanos G, Jara C, Mosquera G (2011) Guías prácticas de laboratorio para el manejo de patógenos del frijol. *Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)*

Chacón M (2009) Darwin y la domesticación de plantas en las américas: el caso del maíz y el frijol. *Acta Biológica Colombiana* 14:351-364

Choudhary D.K, Prakash A, Johri B.N (2007) Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian Journal of microbiology* 47: 289-297

Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT (1981). *Técnicas para el aislamiento, identificación y conservación de hongos patógenos del frijol (Phaseolus vulgaris L.)*. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical.

Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT (1994) Problemas de producción del Frijol en los Trópicos. 2 ed, Pastor-Corrales M y Schwartz H. F. (eds.). Cali, Colombia

De la Fuente M, López M, Alonso J, Santalla M, De Ron A, et al. (2012) In-depth characterization of the phaseolin protein diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) based of two dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Food Technology biotechnology* 50(3):315-325

De Ron A, Santalla M (2013) *Phaseolus vulgaris* (Beans). *National Spanish Research Council (CSIC)* 3:1444-1445

Dhingra O.D , Netto R.A (2001) Reservoir and Non-reservoir Hosts of Bean-Wilt Pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp.phaseoli. *Journal Phytopathology* 49: 463-467

Doumbou C.L, Hamby M.K, Crawford D.L (2001) Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection* 82(3): 85-102

Duque C , Quintana M.A (2008) Determinación preliminar de la actividad promotora de crecimiento vegetal de actinomycetes aislados de suelo. Facultad de ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia

Durango D, Pulgarin N, Echeverri F, Escobar G, Quiñones W (2013) Effect of salicylic acid and structurally related compounds in the accumulation of phytoalexins in cotyledons of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Cultivars. *Molecules* 18: 10609-10628

Dynowska M, Góralaska K, Barańska G, Troska P, Ejdyś E (2011) Importance of Potato-Dextrose Agar medium in isolation and identification of fungi of the genus *Fusarium* obtained from clinical materials. *Mikologia Lekarska* 18(3): 119-124

El-Fiki I, Shaheen S, Youness H, Kamel S (2014) Evaluation of some bioagents for controlling damping off and root rot diseases of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 24:275-282

El-Tarabily K (2006) Rhizosphere-competent isolates of streptomycete and non-streptomycete actinomycete capable of producing cell wall degrading enzymes to control *Phytophthora blight* damping off disease of cucumber. *Canadian Journal of Botany* 84:211-222

Errakhi R, Lebrihi A, Barakate M (2009) *In vitro* and *in vivo* antagonism of actinomycetes isolated from Moroccan rhizospheric soils against *Sclerotium rolfsii*: a causal agent of root rot on sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Applied Microbiology* 107: 672-681

Evangelista Z (2014) Isolation and characterization of soil *Streptomyces* species as potential biological control agents against fungal plant pathogens. *World Journal Microbiology Biotechnology* 30: 1639-1647

FAOSTAT (2015). Recuperado el Diciembre de 2015, de <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>

Farfán D.M , Gutierrez C (2009) Determinación de la actividad quitinolítica de cepas nativas de actinomicetos y su efecto antagónico sobre microorganismos fitopatógenos. Facultad de ciencias, Pontificia universidad Javeriana, Colombia.

Fenalce (2010). Recuperado el 2014, de <http://www.fenalce.org/nueva/pg.php?pa=88>

Fernández F, Gepts P, López M (1986) Etapas de desarrollo de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Cali: Centro de Internacional de Agricultura Tropical

Ferroni J (2009) Evaluación de respuestas sistémicas inducidas en plantas de frijol *Phaseolus vulgaris* por la interacción con actinomicetos nativos colombianos. Facultad de ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia

Franco M (2008) Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Tesis doctoral. Facultad de ciencias, Universidad de Granada, España

Franco M (2009) Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización. *Revista Peruana de Biología* 16(2): 239-242

Gális I, Smith J, Jamenson P (2004) Salicylic acid, but not cytokinin-induced, resistance to WCIMV is associated with increased expression of SA-dependent resistance genes in *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Plant Physiology* 161(4): 459-466

Gonzalez A, Deobald L, Spivak A, Crawford D (2003) Actinobacterial chitinase-like enzymes: profiles of rhizosphere versus non-rhizosphere isolates. *Canadian Journal of Microbiology* 49, 682-698

Guerrero M, Rodríguez M, Rodríguez L, González M, Simpson J, et al. (2011) Differential expression of *Phaseolus vulgaris* genes induced during the interaction with *Rhizoctonia solani*. *Plant Cell Rep* 1465–1473

Griffith G, Easton G, Detheridge A, Roderick K, Edwards A et al. (2007) Copper deficiency in potato dextrose agar causes reduced pigmentation in cultures of various fungi. *Federation of European Microbiological Societies*, 165-171

Grönemeyer J, Burbano C.S, Hurek T, Reinhold-Hurek B (2012) Isolation and characterization of root-associated bacteria from agricultural crops in the Kavango region of Namibia. *Plant Soil* 356: 67-82

Harikrishnan H, Shanmugaiah V, Balasubramanian N, Sharma M, Kotchoni S (2014) Antagonistic potential of native strain *Streptomyces aurantiogriseus* VSMGT1014 against sheath blight of rice disease. *World Journal Microbiology Biotechnology* 30: 3149-3161

Istifadah N, Saleeba J, McGee P (2006) Isolates of endophytic *Chaetomium* spp. inhibit the fungal pathogen *Pyrenophora tritici-repentis* *in vitro*. *Canadian Journal of Botany* 1148-1155

Jordán M , Casaretto J (2006) Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Etileno, Ácido Abscísico, Brasinoesteroides, Poliaminas, Ácido Salicílico y Ácido Jasmónico. En *Fisiología vegetal* (págs. 1-28). La Serena : Universidad de la Serena

Kaur N, Sharma P (2013) Exploitation of rhizobacteria for functional traits in mungbean. *International Journal of Agriculture, Environment & Biotechnology* 6(4):533-543

Kloepper J. W., Schroth M. N. , Miller, T. D (1980) Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Ecology and Epidemiology* 70(11): 1078-1082

Kloepper J.W , Schroth M.N (1981) Relationship of *in vitro* antibiosis of plant growth-promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. *Phytopathology* 71(10): 1020-1024.

Kloepper J.W. (1996) Host specificity in microbe-microbe interactions. *Bioscience* 46(6): 406-409

Lahoum A, Bouras N, Bouznada K, Holtz M, Spröer C, et al. (2015) *Saccharothrix* sp. ABH26, a new actinobacterial strain from algerian saharan soil: isolation, identification and antimicrobial activity. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences* 4(5): 415-420

Learn L, Nurulhudda Z, Adzzie A, Shu E, Bey G, et al. (2014) Diversity and antimicrobial activities of actinobacteria isolated from tropical mangrove sediments in Malaysia. *The scientific world journal* 1-14

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

Madigan M, Martinko J, Dunlap P, Clark D (2009) *Brocke. Biología de los microorganismos*. España : Pearson

Márquez M, Martínez M , Franco M (2002) Aislamiento de *Trichoderma* sp. y actinomycetes a partir de suelos de clavel (*Dianthus caryophyllus*) y evaluación de su capacidad antagónica *in vitro* sobre *Fusarium oxysporum*. f. sp. dianthi. *Agronomía colombiana* 19: 81-87

Muangham S, Pathom-aree W, Duangmal K (2014) Melanogenic actinomycetes from rhizosphere soil - antagonistic activity against *Xanthomonas oryzae* and plant-growth-promoting traits. *Canadian Journal of Microbiology* 61: 164-170

Narrea M , Malpartida J (2006) Evaluación de medios de cultivo en la producción de conidias y crecimiento diametral de cuatro cepas del hongo entomopatógeno *Beauveria brongniartii*. *Revista peruana de entomología* 45: 145-147

Nerey Y, Pannecoucq J, Hernandez H.P, Diaz M, Espinoza, et al. (2010) *Rhizoctonia* spp. causing root and hypocotyl rot in *Phaseolus vulgaris* in Cuba. *Journal Phytopathology* 158, 236–243

Nishimura T, Meguro A, Hasegawa S, Nakagawa Y, Shimizu M , Kunoh H (2002) An endophytic actinomycete, *Streptomyces* sp. AOK-30, isolated from mountain Laurel and its antifungal activity. *Journal General Plant Pathology* 68: 390-397

Ojha S , Chatterjee N (2012) Induction of resistance in tomato plants against *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici mediated through salicylic acid and *Trichoderma harzianum*. *Journal of plant protection research* 52(2): 220-225

Palma F, Lluch C, Iribarne C, García-Garrido J, Tejera N (2009) Combined effect of salicylic acid and salinity on some antioxidant activities, oxidative stress and metabolite accumulation in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Growth Regulation* 58: 307-316

Padder B, Sharma P, Kapil R, Pathania A, Sharma O (2010) Evaluation of Bioagents and Biopesticides against *Colletotrichum lindemuthianum* and its Integrated Management in Common Bean. *Notulae Scientia Biologicae* 2(3):72-76

Pereira J, Queiroz R, Charneau S, Felix C, Ricart C, et al. (2014) Analysis of *Phaseolus vulgaris* response to its association with *Trichoderma harzianum* (ALL-42) in the presence or absence of the phytopathogenic fungi *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani*. *Plos one* 9(5)

Pezet R, Pont V, Tabacchi R (1999) Simple analysis of 6-pentyl-alpha-pyrone, a major antifungal metabolite of *Trichoderma* spp., useful for testing the antagonistic activity of these fungi. *Phytochemical analysis* 10: 285-288

Pliego C, Ramos C, De Vicente A , Cazorla F (2011) Screening for candidate bacterial biocontrol agents against soilborne fungal plant pathogens. *Plant Soil* 340: 505-520

Poomthongdee N, Duangmal K, Pathom-aree W (2015) Acidophilic actinomycetes from rhizosphere soil: diversity and properties beneficial to plants. *The Journal of Antibiotics* 68: 106-114

Prada LD (2013) Identificación de ácidos orgánicos causantes de la solubilización de fósforo inorgánico sintetizados por actinomicetos aislados de suelos en los Andes orientales colombianos. Tesis maestría. Facultad de ciencias, Universidad Nacional, Colombia

Quilambaqui M, Zavaleta E, Mora G (2004) Patogenicidad de Tres Especies de *Fusarium* Asociadas con el declinamiento del espárrago Declinamiento del Espárrago (*Asparagus officinalis* L.) en Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22: 30-36

Ramos M (2013) Inducción de genes de defensa por acibenzolar-s-metil y su efecto en el control del marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* en uchuva (*Physalis peruviana*). Tesis maestría. Facultad de ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia

Ronquillo M, Grau C, Nienhuis J (2010) Variation in reaction to *Fusarium* spp. identified in a common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) population developed for field-based resistance to root rot and wilt. *Crop Science Society of America* 50: 2303–2309

Rojas L , Vargas J (2009) Evaluación de la actividad enzimática de quitinasas en plantas de frijol *Phaseolus vulgaris* inoculadas con actinomicetos nativos colombianos. Tesis pregrado. Facultad de ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia

Ryu C, Hu C, Locy R, Kloepper J (2005) Study of mechanisms for plant growth promotion elicited by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and soil* 268: 285-292

Sarria G, Torres G, Aya H, Ariza J, Rodriguez J et al. (2008) Microorganismos asociados a la Pudrición del cogollo de la Palma de aceite y su inoculación en palmas de vivero. *Palmas* 19-30

Senaratna T, Touchell D, Bunn E, Dixon K (2000) Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Regulation* 30: 157-161

Shekhar N, Bhattacharya D, Kumar D , Gupta R (2006) Biocontrol of wood-rotting fungi with *Treptomyces violaceusniger* XL.2. *Canadian Journal of Microbiology* 805-808

Shoonhoven A , Pastor-Corrales M (1987) *Standard system for the evaluation of bean germplasm*. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)

Sillero J.C , Molina M.M , Avila C.M, Rubiales D (2012) Induction of systemic acquired resistance against rust, ascochyta blight and broomrape in faba bean by exogenous application of salicylic acid and benzothiadiazole. *Crop Protection* 65-69

Sorahinobar M, Niknam V, Ebrahimzadeh H, Soltanloo H, Behmanesh M, et al. (2016) Central role of salicylic acid in resistance of wheat against *Fusarium graminearum*. *Journal Plant Growth Regulation* 35: 477–491

Sylvia D, Fuhrmann J, Hartel P, Zuberer D (2005) *Principles and applications of soil microbiology*. New Jersey: Prentice-Hall

Tao Y, Xie Z, Chen W, Glazebrook J, Chang H.S et al. (2003) Quantitative Nature of Arabidopsis Responses during Compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant cell* 15(2): 317-330

Tuzun S , Bent E (2006) *Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants*. USA: Springer

Ulloa A, Ulloa P, Ramirez J, Ulloa B (2011) El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. *Revista Fuente Año* 3(8):5-9

Velásquez R , Medina M.M (2002) Patogenicidad de aislamientos de *Rhizoctonia* spp. sobre plántulas de Chile (*Capsicum annuum* L.) y Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 79-82

Xue R, Wu J, Wang L, Blair M, Wang X, et al. (2013) Salicylic acid enhances resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Growth Regulation* 33:470–476

Xue R, Wu J, Zhu Z, Wang L, Wang X, et al. (2015) Differentially expressed genes in resistant and susceptible common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes in response to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Plos one* 10(6):1-20

ANEXOS

Anexo 1

Etapas de desarrollo de la planta de frijol común.

Fase	Etapa		Evento
	Código	Nombre	
Vegetativa	V0	Germinación	La semilla está en condiciones favorables para iniciar la germinación
	V1	Emergencia	Los cotiledones del 50% de las plantas aparecen al nivel del suelo
	V2	Hojas basales	El 50% de las plántulas tiene desplegadas las hojas basales
	V3	Primer trifolio	El 50% de las plántulas tiene desplegadas las hojas del primer trifolio
	V4	Tercer trifolio	El 50% de las plántulas tiene desplegadas las hojas del tercer trifolio
Reproductiva	R5	Prefloración	Aparecen los primeros botones florales en el 50% de las plantas
	R6	Floración	En la mitad de las plantas ha abierto la primera flor
	R7	Formación de las vainas	Aparece al menos una vaina en el 50% de las plantas
	R8	Llenado de las vainas	Llenado de semillas en la primera vaina en el 50% de las plantas
	R9	Maduración	Cambio de color de verde a amarillo en una vaina en el 50% de las plantas

Adaptado de Fernández et al, 1986.