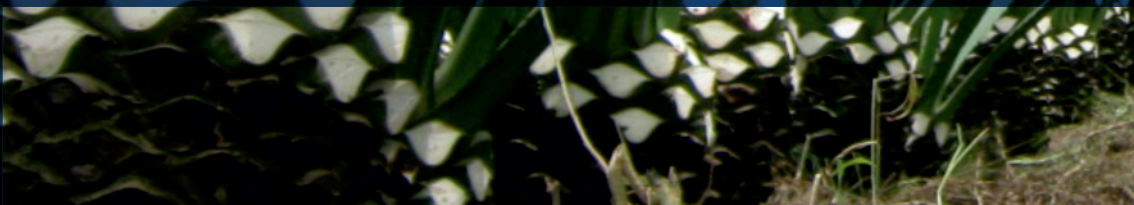




**AVANCES EN EL ESTUDIO DEL VIRUS DE LA MACANA
EN EL CULTIVO DE FIQUE (*Furcraea* spp.). COMPILACIÓN
DE ARTÍCULOS TÉCNICOS**





MinAgricultura
Ministerio de Agricultura
y Desarrollo Rural



**PROSPERIDAD
PARA TODOS**



COADEP LTDA.

Avances en el estudio del virus de la macana en el cultivo de fique (*Furcraea* spp.)

COMPILACIÓN DE ARTÍCULOS TÉCNICOS

Editores técnicos

Alexander Smith, Camilo Beltrán-Acosta, Alba Marina Cotes*

* Investigadores del Laboratorio de Control Biológico, Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB). Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica, km 14, vía Bogotá - Mosquera (Cundinamarca).

Smith, A.; Beltrán-Acosta, C. y Cotes, A. M. (Eds.). Avances en el estudio del virus de la macana en el cultivo de fique (*Furcraea* spp.). Mosquera. Corpoica, 2013. 96 p.

Palabras clave: fique, vector, *Olpidium virulentus*, virus, bioplaguicidas, rizobacteria, *Pseudomonas fluorescens*.

Proyecto de investigación

*Generación de una estrategia de control biológico de *Olpidium brassicae* como posible vector del virus de la raya necrótica o macana del fique (*Furcraea* spp.)*

Convenio: 507/07 IICA-MADR, Contrato: 2007J4761-492-589/2007.

Líder del proyecto: Alba Marina Cotes Prado, *Ph.D.*

Equipo técnico Corpoica: Camilo Beltrán-Acosta, (c) *M.Sc.*; Alexander Smith May, *B.Sc.*; Leonardo Sastoque Cala, *M.Sc.*; Laura Villamizar Rivero, *Ph.D.*; Andrés Díaz García, *M.Sc.*, Carolina González Almario, *Ph.D.*; María Caridad Cepero de García, *M.Sc.*; Inés Toro Suárez, *Ph.D.*; Martha Isabel Gómez, *Ph.D.*; María Consuelo Tabares, *M.Sc.*; Reinel Flórez, *M.Sc.*; Milton Forero, *M.Sc.*; Mauricio Cruz Barrera, I.Q.; Manabu Kusunoki, *Ph.D.*, y cooperante de la Agencia de Cooperación Internacional del Japón, JICA. Carlos Alberto Mazabuel, Guillermo Pulido asistentes técnicos de Empaques del Cauca S.A., EMPACA S.A.

Estudiantes - Microbiología Industrial: Lina del Pilar Rada Martínez, María Alejandra Cely Hoyos, Jenny Carolina Ruiz Moreno y Johan Sáenz. Ingeniería Agronómica: Daniel Osorio Parga.

Auxiliares técnicos - Darwin Vásquez, Gabriela Perdomo, Hugo Cárdenas, Claudia Milena Mesa, Corina Martínez y Deyanira Perdomo.



Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica

ISBN: 978-958-740-139-4

CA: 1373

CUI: 1424

Primera edición: Marzo de 2013

Tiraje: 450 ejemplares

Línea de atención al cliente: 018000121515

atencionalcliente@corpoica.org.co

www.corpoica.org.co

Impreso en Colombia

Printed in Colombia

La presente publicación ha sido elaborada con la cofinanciación del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, MADR. El contenido de la misma es responsabilidad exclusiva de los investigadores y en ningún caso debe considerarse que refleja los puntos de vista del MADR.

AGRADECIMIENTOS

Al MADR por la financiación del proyecto.

Al Dr. Diego Fernando Fernández B., Gerente general de Empaca S. A., que participó activamente en el desarrollo del proyecto.

Al Dr. Víctor Núñez Zarantes, del Laboratorio de Micropropagación de Plantas del Centro de Biotecnología y Bioindustria de Corpoica.

A los productores Ernesto Zambrano, Pedro Caldón, Gentil Quintana, Juan de Dios Cometa y Evelio Quira, que participaron en el mantenimiento y las evaluaciones de las parcelas experimentales establecidas en el corregimiento de Paniquitá, Totoró, Cauca.

A los productores de fique de las zonas del estudio y a la Cooperativa de Agricultores de Paniquitá, Coadep.

TABLA DE CONTENIDO

Introducción	5
Conocimiento del agente causal: virus y vector de la enfermedad de la macana	8
Análisis económico e impacto del virus de la macana en el cultivo de fique	21
Pruebas de demostración del modo de transmisión del virus de la raya necrótica del fique	30
Producción <i>in vitro</i> de plántulas de fique para la producción rápida y masiva de material de siembra	39
Rizobacterias con actividad biocontroladora de <i>Olpidium virulentus</i> , como posible vector del virus de la macana del fique (<i>Furcraea</i> spp.)	44
Diseño y validación del proceso de producción por fermentación de biomasa de <i>Pseudomonas fluorescens</i> Ps006	59
Diseño y desarrollo de un prototipo de formulación a base de <i>Pseudomonas fluorescens</i> Ps006	82

INTRODUCCIÓN

Alba Marina Cotes

*Directora del Centro de Biotecnología y Bioindustria, CBB
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica
amcotes@corpoica.org.co*

El fique es la fibra dura natural por excelencia de Colombia. La planta de la cual se obtiene es originaria de Colombia y del norte de Venezuela, perteneciente al orden Liliiflorae, familia Agavaceae y género *Furcraea*. Su producción se desarrolla en un contexto de economía campesina y de la producción de esta planta viven aproximadamente 70.000 familias colombianas (Castellanos *et al.*, 2009). El departamento del Cauca tiene la mayor superficie sembrada con fique; en el año 2010 se cosecharon 8.639 ha y se estima una producción aproximada de 10.349 toneladas métricas en fibra (MADR, 2010), producida en nueve municipios, actividad que beneficia a aproximadamente 17.000 familias.

Los cultivadores son campesinos, muchos de ellos indígenas que siembran y cosechan el fique en la propia finca donde residen, como cerca viva o como un cultivo asociado al café, la caña de azúcar, el maíz, el frijol, la papa, la arracacha, el plátano y el pasto, que les permita contar con un sustento adicional, ya que los ingresos obtenidos por la actividad fiquera son bajos. La venta del fique representa aproximadamente el 50% de los ingresos de estas familias (ingresos económicos), lo cual es equivalente a aproximadamente el 25% del salario mínimo legal colombiano. Los ingresos económicos diferentes al cultivo y beneficio del fique, como la producción de quesos y algunas frutas como mora, y la venta de su fuerza de trabajo, no superan los \$120.000 al mes (generalmente en especie), lo que sumado a la venta de las fibras no alcanza a completar un salario mínimo legal vigente. Cabe resaltar que los agricultores de fique actualmente reciben un subsidio gubernamental en el caso en el que este cultivo reemplace los cultivos ilícitos. Esto le da al fique un valor social adicional.

Pese a su gran importancia económica y social, la cadena de fique en el país presenta algunas limitaciones que le restan competitividad en los mercados nacional e internacional, tales como la baja tecnificación del cultivo. El cultivo del fique en Colombia se lleva a cabo de forma rústica y tradicional en terrenos agrestes o altamente quebrados.

En la zona del Cauca en donde se llevó a cabo la presente investigación, un actor clave es el sector industrial representado por la empresa Empaques del Cauca S.A. (Empaca S.A.), en la cual el 56% de las acciones corresponde a 176 trabajadores que administran su propia fuente de empleo bajo la premisa "esfuerzo industrial con compromiso social". Empaca S.A. utiliza las fibras naturales de fique para fabricar hilos, tutores y cuerdas bananeras; sacos para empacar café, cereales, tubérculos y hortalizas; telas o biomantos y saco-suelos para los procesos de revegetación de las laderas de montañas en obras viales y civiles que se adelanten en el suroccidente del país.

En la actualidad, el sector fiquero enfrenta dos problemas importantes relacionados: el primero, la comercialización, dado su limitado mercado con valor agregado, y el segundo, por factores de producción. En este sentido, se estiman pérdidas del 10% anual causadas por el ataque de plagas y enfermedades, destacándose el virus de la rayadilla del fique o macana, la cual está diseminada en todas las regiones productoras del país (Morales *et al.*, 2003).

El patógeno causal de la macana, según Morales y colaboradores (1992), es el virus de la raya necrótica del fique, que corresponde a un Dianthovirus. Este virus consiste en partículas isométricas de 34 nm de diámetro; es un virus ARN de entre 4.000 y 1.600 bases y contiene una especie única de proteína con peso molecular de 40.000 daltons. La macana es considerada como la enfermedad más común, limitante y de mayor impacto en este cultivo, encontrándose diseminada en las principales regiones productoras de Colombia, donde la presencia del hongo *Olpidium sp.*, posible vector del virus, dificulta el manejo de la enfermedad en condiciones de campo. Las hojas sintomáticas se pudren y se rompen al momento de procesarlas para extraer la fibra, siendo esta de menor calidad y tamaño. Eventualmente, las plantas afectadas por macana mueren, constituyendo una pérdida económica para los productores. El problema más grave con la macana es que el único control realizado es la eliminación de las plantas afectadas, lo cual es un gran problema para los fiqueros, ya que una nueva planta se puede demorar cuatro años en ser productiva.

La erradicación de *Olpidium sp.* es difícil por su condición de parásito obligado intracelular de raíces, además de tener estructuras de resistencia. El hongo se encuentra distribuido en todo el mundo, logrando infectar una gran variedad de plantas hospederas, incluyendo a malas hierbas que actúan como reservorios naturales. Este vector es económicamente importante, debido a que transmite

virus causantes de enfermedades destructivas en plantas. Presenta tres estados de desarrollo en su ciclo de vida: zoosporas móviles, esporangios y esporas de reposo que pueden sobrevivir hasta por veinte años en terrenos cultivables, siendo difícil erradicarlo una vez establecido. Una zoospora con un único flagelo posterior se enquistada en las células epidérmicas de la raíz del huésped y el protoplasma del quiste se inyecta dentro del citoplasma hospedero, aparentemente lleva el virus en su protoplasto y se transmite a raíces sanas. Tres a siete días después de la infección, los zoosporangios maduros descargan zoosporas por medio de tubos de descarga o salida al exterior de la raíz y repite así su ciclo de vida; el virus también puede estar contenido dentro de esporas de reposo del vector, sobreviviendo por años en ausencia de plantas hospederas.

Dada la complejidad de esta enfermedad, pues involucra tanto a un hongo vector como a un virus, con el ánimo de generar una propuesta de manejo se propuso una estrategia que permitiera contar con plantas libres de virus y disminuir la colonización de las raíces por el hongo *Olpidium* sp., posible vector del virus. Para esto se propuso el uso de vitroplántulas tratadas tanto en invernadero como en postrasplante con microorganismos biocontroladores capaces de colonizar la rizósfera de la planta de fique. Es el caso de rizobacterias de los géneros *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp. provenientes del fique y de un prototipo de bioplaguicida desarrollado por investigadores del Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de Corpoica en estudios previos, a base de la cepa Th003 del hongo antagonista *Trichoderma koningiopsis*, que ha demostrado una alta eficacia en el control de diferentes patógenos de raíz en una variedad de cultivos.

Referencias bibliográficas

1. Castellanos, O. Torres, L. & Rojas, J. 2000. Análisis de la cadena productiva de fique. En: *Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de fique en Colombia*. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Proyecto Transición de la Agricultura. Universidad Nacional de Colombia. Grupo de investigación y desarrollo en gestión, productividad y competitividad BioGestión. Pp. 21-96
2. MADR. 2010. *Anuario estadístico del sector agropecuario y pesquero 2010*. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. República de Colombia. Pp. 94-96.
3. Morales, F. Castaño, M. Calvert, L. & Arroyave, A. 1992. *Furcraea Necrotic Streak Virus: An apparent new member of the Dianthovirus Group*. *Journal of Phytopathology*. 134. Pp. 247-254.
4. Morales, F. Castaño, M. & Martínez, A.K. 2003. *La macana o radilla del fique (Furcraea sp.): Avances de la investigación y caracterización molecular del agente causal 1977-2003*. Documento interno. Unidad de Virología Vegetal. Centro Internacional De Agricultura Tropical (CIAT).

CONOCIMIENTO DEL AGENTE CAUSAL: VIRUS Y VECTOR DE LA ENFERMEDAD DE LA MACANA

Daniel Osorio¹, Camilo Beltrán-Acosta², Leonardo Sastoque²,
María Caridad Cepero de García², Alba Marina Cotes² y Carolina González¹

¹Laboratorio de Microbiología Molecular, Centro de Biotecnología y Bioindustria, CBB
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica

²Laboratorio de Control Biológico, CBB, Corpoica
cgonzaleza@corpoica.org.co

Introducción

Actualmente, la enfermedad de la macana o rayadilla es la limitante más común y de mayor impacto en el cultivo del fique; es causada por un virus que es posiblemente transmitido por el hongo *Olpidium* sp., (Cepero de García *et al.*, 2006). El hongo *Olpidium* spp. se encuentra distribuido en todo el mundo, es parásito obligado intracelular en raíces y logra infectar una gran variedad de plantas hospederas, monocotiledóneas y dicotiledóneas, incluyendo malas hierbas que actúan como reservorios naturales. Este vector es económicamente importante debido a que transmite virus causantes de enfermedades destructivas en plantas (Rochon *et al.*, 2004; Koganezawa *et al.*, 2005).

Estudios realizados por Gálvez y colaboradores (1977), citado por Morales y colaboradores (2003), demostraron que el patógeno causal de la macana es un virus isométrico, aunque sin determinar con precisión su posición taxonómica ni su modo de transmisión. Gracias a estudios realizados por Morales y colaboradores (1992) se caracterizó el virus y lo denominaron *Virus de la raya necrótica del fique*, perteneciente al género *Dianthovirus*, de la familia Tombusviridae, del cual no se conocía un vector biológico. Estudios realizados por Cepero de García y colaboradores (2006) han demostrado la asociación entre el virus y un hongo vector subterráneo que puede transmitir virus vegetales. Dichas investigaciones confirmaron que el posible vector es el hongo *Olpidium* spp.

Generalidades del vector (*Olpidium* spp.)

Taxonomía, ecología y patología

Los Chytridiomycetes patógenos de plantas, comúnmente conocidos como quítridos, carecen de un micelio verdadero y constan, en su mayor parte, de un rizomicelio irregular o redondeado que vive completamente en el interior de las células de su hospedante. Cuando ha llegado a la madurez, el soma vegetativo se transforma en muchas esporas latentes de pared gruesa o en esporangios. Los hongos pertenecientes a esta clase son acuáticos. Dado que producen zoosporas, requieren de agua o de una película acuosa en el suelo o sobre la superficie de la planta. Para el caso de *Olpidium* spp., este transmite virus desde los hospederos en los que se propaga, hasta los que posteriormente infecta. Debido a ello, *Olpidium* spp. es un vector de por lo menos seis virus que producen enfermedades en las plantas, como el virus de la necrosis del tabaco (TNV-A, TNV-D) y de la vena ancha de la lechuga (MiLV y LBVV) (Sasaya y Koganezawa, 2006; Colariccio *et al.*, 2005; Rochon *et al.*, 2004).

Ciclo de vida de Olpidium spp.

Olpidium spp. presenta tres estados de desarrollo en su ciclo de vida: plasmodio y zoosporangio, zoosporas móviles y esporas de resistencia, que pueden sobrevivir hasta por veinte años en terrenos cultivables, siendo difícil erradicarlo una vez establecido (Tomlinson y Garrett, 1964; Colariccio *et al.*, 2005).

Modo de infección

Una zoospora, con un único flagelo posterior, se enquista en las células epidérmicas de la raíz del huésped, y el protoplasma del quiste se inyecta dentro del citoplasma de la célula, el cual aparentemente lleva el virus en su protoplasto, transmitiéndose a raíces sanas. Siete días después de la infección, los zoosporangios maduros descargan zoosporas por medio de tubos de descarga o de salida al exterior de la raíz, repitiendo finalmente su ciclo de vida. El virus también puede encontrarse dentro de esporas de resistencia del vector, sobreviviendo por años en ausencia de plantas hospederas (Temmink y Campbell, 1968; Temmink, 1971; Rochon *et al.*, 2004; Koganezawa *et al.*, 2005).

Plasmodio y zoosporangio

Cada uno de los plasmodios aparentemente germina de una zoospora, la cual, después de enquistarse sobre la superficie de la célula huésped, penetra en cuestión de pocas horas. El plasmodio joven puede llegar a ser inapreciable en algunas células huésped, después de 12 a 24 horas. Estos organelos son esféricos, de estructuras granulares que alcanzan rápidamente un diámetro igual al eje corto de la célula vegetal y que continúan su

crecimiento, alargándose, hasta adquirir una forma ovoide u elipsoide. Cuando el plasmodio madura a zoosporangio toma una forma granular en su interior y el protoplasma es separado dando lugar a las zoosporas. Cuando el zoosporangio germina, las zoosporas salen al agua circundante, pero, justo antes de su salida, las zoosporas pueden observarse en movimiento dentro del zoosporangio. Estas zoosporas pueden escapar a través de pequeños poros de la pared de la célula huésped y no a través de un tubo de salida definido (Tomlinson y Garrett, 1964) (Figura 1).



Figura 1. Zoosporangios cargados con zoosporas, visualizados en un microscopio de contraste de fases con el objetivo 100x-Ph3. **A.** Con la presencia del tubo de descarga. **B y C.** Sin la presencia de tubo de descarga.

Zoosporas

La zoospora es generalmente de forma esférica, de aproximadamente tres micras de diámetro y con un flagelo posterior pequeño. Poco después de su desarrollo nadan en direcciones aleatorias. Algunas zoosporas son biflageladas y presentan un mayor tamaño, dos veces más grandes que el de una zoospora uniflagelada. La presencia de los dos flagelos está asociada a la fusión de dos zoosporas en su fase sexual (Tomlinson y Garrett, 1964) (Figura 2).

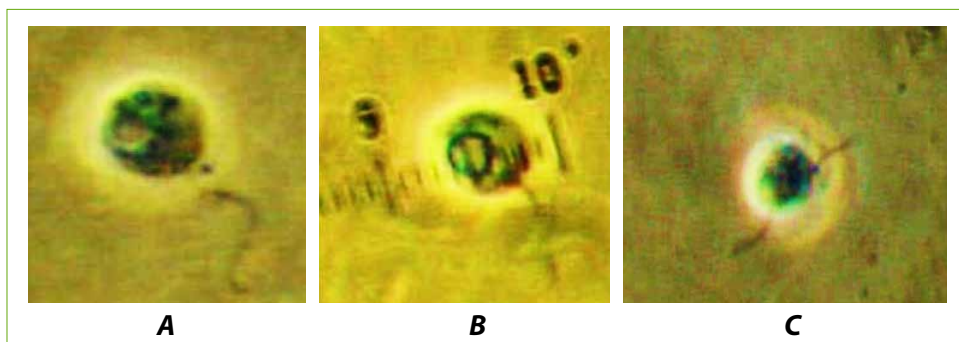


Figura 2. Zoosporas visualizadas en un microscopio de contraste de fases con el objetivo 100x-Ph3. **A.** Zoospora flagelada. **B.** Zoospora con tamaño de 6 μ (micras). **C.** Zoospora biflagelada.

Esporas de resistencia

Las esporas de resistencia se observan en las células de la epidermis de la raíz, cinco días después de la infección, en cantidades considerables y particularmente sobre las raíces más viejas. Al microscopio, ellas presentan una forma estrellada y un diámetro entre $14\ \mu$ y $25\ \mu$ (Tomlinson y Garrett, 1964). La pared de esta estructura es verdaderamente rígida y le permite al hongo sobrevivir en el suelo por más de 20 años. Bajo condiciones adecuadas de humedad y una vez dentro de las células huésped, las esporas entran a su fase asexual, pierden su pared gruesa, toman una forma granular y expulsan las zoosporas para reanudar así su ciclo de vida (Figura 3).

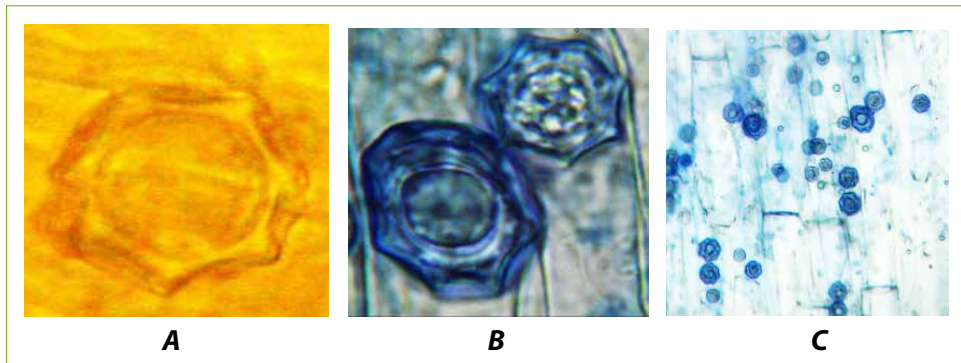


Figura 3. Esporas de resistencia. **A.** Espora de resistencia visualizada en un microscopio de contraste de fases con el objetivo 100x-Ph3. **B.** Esporas de resistencia teñidas con azul de tripan visualizadas en un microscopio de luz con el objetivo 100x. **C.** Tejido vegetal infectado con estructuras de resistencia de *Olpidium* spp.

Distribución

Olpidium spp. presenta una amplia distribución y se extiende en todas las áreas templadas del mundo (Koganezawa *et al.*, 2005). El rango de hospederos es muy extenso, por lo que se encuentran reportes de especies susceptibles, distribuidas en varias familias, entre ellas: Cucurbitaceae, Leguminosae, Chenopodiaceae, Compositae, Umbelliferae, Solanaceae, Cruciferae, Malvaceae, Liliaceae y Gramineae (Koganezawa *et al.*, 2005).

Síntomas y signos de la infección por *Olpidium* spp.

El hongo no presenta ninguna sintomatología externa; se determina su presencia cuando hay síntomas del virus. Para detectar la presencia del hongo se debe llevar a cabo el procedimiento de tinción de raíces con azul de Tripán, según la metodología descrita por Phillips y Hayman (1970) y modificada por Cepero de García y colaboradores (2006), en donde se observan y diferencian fácilmente las estructuras como las esporas de resistencia y los zoosporangios.

Identificación molecular de *Olpidium* spp.

El ADN ribosomal (ADNr) ha demostrado ser una región útil para estudiar relaciones evolutivas entre hongos y ha desempeñado un papel importante en la taxonomía de hongos (White *et al.*, 1990). Sin embargo, actualmente los genes 5.8S, 18S y 28S de esta región han mostrado relativamente pocas diferencias entre especies (Kularatne *et al.*, 2004). Ante esto, otras regiones han sido estudiadas y han demostrado ser mucho más variables, como es el caso de las regiones correspondientes al espaciador transcrito interno (ITS) entre los genes 18S y 28S del ADNr. Estas regiones para el caso de *Olpidium* spp. han arrojado resultados interesantes.

Estudios realizados por Herrera-Vásquez y colaboradores (2009), permitieron a partir de una PCR múltiple detectar tres especies de *Olpidium* spp. (*O. bornovanus*, *O. brassicae*, *O. virulentus*) utilizando cebadores que amplifican solo la región específica ADNr del hongo, a partir tanto de zoosporas como de raíces de la planta huésped. Estos cebadores fueron utilizados como la herramienta de identificación molecular del hongo *Olpidium* sp. detectado en raíces de plantas de fique.

PCR múltiple

La PCR múltiple se basa en la reacción en cadena de la ADN polimerasa (Polymerase Chain Reaction), con la única diferencia de que se utilizan varios juegos de cebadores en su proceso. Con esta técnica se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN. Sus únicos requerimientos son la existencia de nucleótidos que son la materia prima para fabricar el ADN, y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula "molde" de ADN que queremos copiar para que sirva como cebador (primer) (Crueger y Crueger, 1993).

Metodología

Producción masiva del inóculo de *Olpidium* sp.

Con el objetivo de establecer un protocolo para el aislamiento de las zoosporas de *Olpidium* sp. se utilizaron plántulas de lechuga (*Lactuca sativa*) que presentaban entre 3 y 5 hojas verdaderas empleadas como cultivo modelo, dada la susceptibilidad que presenta esta hortaliza frente al vector del patógeno (Cepero de García *et al.*, 2006). Estas fueron trasplantadas a materas plásticas de 600 g de capacidad, a cada una de las cuales se le agregó una mezcla de suelo turba como sustrato base y en el centro de la misma se le adicionó suelo que contenía una cepa virulenta de *Olpidium* sp. en proporción 10:1.

Después de 30 a 40 días se extrajeron las plantas y se detectó la presencia del hongo en las raíces, gracias al protocolo de tinción de raíces que se describe a

continuación. Se lavaron las raíces con agua destilada estéril y se sumergieron en hidróxido de potasio (KOH) al 10%; esta solución se calentó en baño de María a 90°C, durante 10 minutos, y se lavaron con abundante agua. Luego se acidificó con HCl por 10 min, se descartó y por último se agregó azul de Tripán por 24 horas.

Montaje de las raíces infectadas y observación de las estructuras del hongo

Con el fin de verificar la infección del hongo en la raíces de la planta, se ubicaron e identificaron bajo el microscopio las estructuras, tales como las esporas de resistencia y los zoosporangios. Para ello, en primera instancia se sumergió un grupo de las raíces teñidas en agua destilada (Figura 4A), de tal forma que se pudieran cortar en segmentos de 2 cm, las cuales fueron colocadas de a 10 en un montaje lámina-laminilla. Para confirmar la presencia del hongo se analizaron 10 campos por cada raíz, usando el objetivo 10x (Figura 4). Posteriormente, se diferenció la morfología de las estructuras presentes bajo el objetivo 40x y para el caso de evidencia fotográfica se utilizó el objetivo 100x (Figura 4).

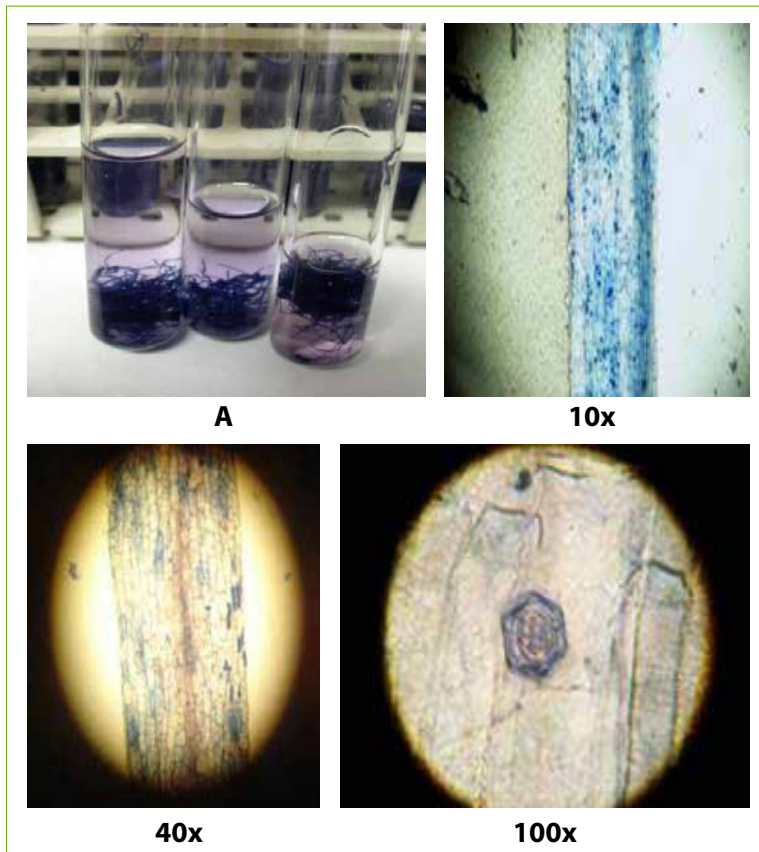


Figura 4. A. Raíces infectadas con *Olpidium* sp. **B.** Observación de las estructuras del hongo al microscopio (10x, 40x y 100x).

Con el propósito de aislar las zoosporas vivas del hongo, se realizó el montaje en fresco de las raíces, como se mencionó anteriormente, pero sin ningún tipo de tinción. El aislamiento fue efectuado según la metodología propuesta por Herrera-Vásquez y colaboradores (2009) con algunas modificaciones, para extraer un ADN puro y concentrado para la identificación molecular de *Olpidium* spp.

Aislamiento de las zoosporas de *Olpidium* sp.

Después de 17 días del trasplante, la mitad de las plantas fueron extraídas de los recipientes y el suelo adherido a las raíces fue retirado cuidadosamente para conservar en buen estado las estructuras del hongo. Una vez obtenidas las raíces, se lavaron con abundante agua corriente estéril y se mantuvieron a una temperatura entre 15°C y 20°C para evitar la expulsión de las zoosporas. Luego se colocaron sobre cajas de Petri y en ellas se continuaron los lavados con agua estéril, bajo las condiciones anteriormente mencionadas, mínimo cuatro veces más o hasta que los residuos del sustrato se eliminaran por completo.

Obtención y purificación de las zoosporas en suspensión

La siguiente fase experimental se focalizó en la purificación de la suspensión de zoosporas, ya que los aislamientos provienen de suelo donde la microbiota es muy extensa y la contaminación con bacterias es constante, lo cual puede afectar la identificación molecular.

La purificación de las zoosporas se realizó mediante una metodología que permitiera purificar la solución sin afectar las estructuras móviles de *Olpidium* sp. Para ello se utilizaron antibióticos de amplio espectro en concentraciones bajas, con el fin de evitar el daño de las estructuras del hongo. Se realizó la inmersión de las raíces en una mezcla de antibióticos (combinación de estreptomycin, penicilina y cloranfenicol a una concentración final de 4,5 mg/mL) durante 10 min aproximadamente, seguida de cuatro enjuagues con agua corriente estéril y mantenida entre 15°C y 20°C para eliminar los residuos de antibióticos (Figura 5). Una vez realizados los lavados se utilizó una solución de sacarosa al 1% y glicina 0,5 M 1:1 (v/v), sugerida por Herrera-Vásquez y colaboradores (2009), en la cual se incubaron las raíces lavadas a una temperatura de 25-30°C, durante 24h, con lo cual se redujo la presencia de bacterias contaminantes y se favoreció la expulsión de las zoosporas (Figura 5). Esto fue demostrado después de observar las muestras bajo el microscopio de contraste de fases, previa incubación y centrifugación a 10.000 rpm (Figura 6)

Identificación molecular de *Olpidium* sp.

Extracción de ADN: Para la identificación molecular de *Olpidium* sp. se realizaron extracciones de ADN ajustando el protocolo de Denman y McSweeney (2005). Este protocolo se aplicó a partir de una suspensión de

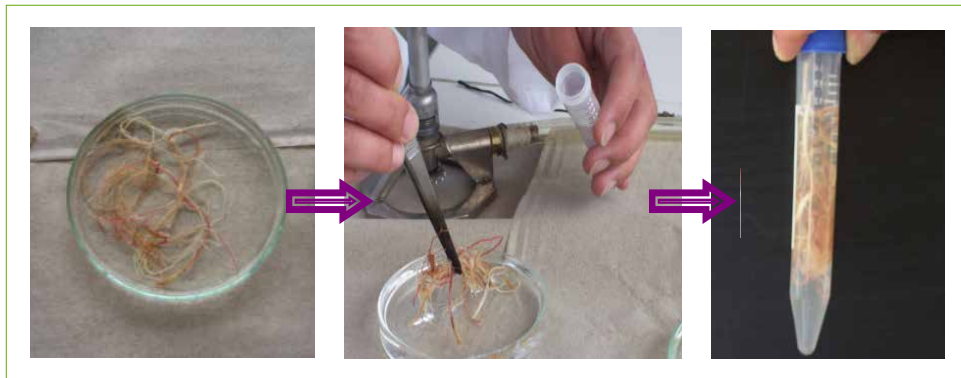


Figura 5. Inmersión de las raíces de lechuga de 17 días después del trasplante, infectadas con *Olpidium* spp. en una solución de antibióticos (Estreptomicina, Penicilina y Cloranfenicol a 4,5 mg.mL⁻¹), seguida de una solución de glicina (0,05 M glicina y 1% sacarosa).

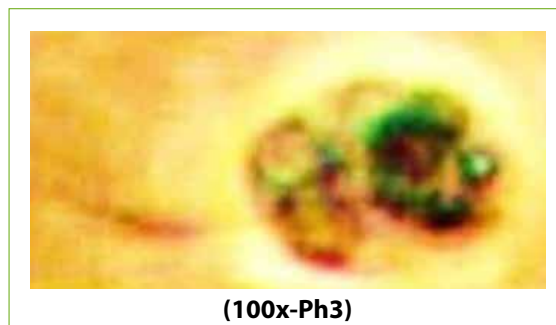


Figura 6. Observación de las zoosporas bajo microscopio de contraste de fases, 24 horas postincubación de las raíces a 30°C.

zoosporas y de raíces infectadas con el hongo, con el fin de encontrar la cantidad y la calidad óptima de ADN para la amplificación. La concentración de ADN y la pureza del mismo fue estimada por la medida de la absorbancia a longitudes de onda de 260 y 280 nm en un espectrofotómetro NanoDrop® 1000 (Thermo Scientific).

Amplificación por PCR para *Olpidium* sp.: Con el fin de determinar la especie de *Olpidium* sp. presente en las muestras de Cauca (Colombia), se recurrió a la técnica de PCR-múltiple, utilizando los cebadores específicos para *Olpidium* spp. sugeridos por Herrera-Vázquez y colaboradores (2009), tales como: OLPbor (*Olpidium bornovanus* sp.) (Accesión GenBank N°AB205215, tamaño 977 bp), OLPbra (*Olpidium brassicae* sp.) (N° AB205213, 204 bp) y OLPvir (*Olpidium virulentus* sp.) (N° AB205208, 579 bp). La amplificación específica de la región ADNr se realizó a partir de la suspensión de las zoosporas como de las raíces infectadas. Estos productos de PCR fueron corridos en geles de agarosa para su análisis y su posterior secuenciación.

Resultados

Producción masiva del inóculo

Para la reactivación del ciclo de vida y la producción masiva de *Olpidium* sp. se trasplantaron 70 plantas de lechuga, de acuerdo con la metodología descrita, de las cuales 10 fueron sembradas en suelo estéril como control positivo y 60 fueron sembradas en suelo inoculado con *Olpidium* sp. A 30 plantas inoculadas se les realizó la tinción de las raíces con azul de Tripán, con el fin de verificar la presencia de *Olpidium* spp., y las 30 restantes se dejaron en invernadero como inóculo primario para los siguientes bioensayos.

Bajo observación en microscopio de contraste de fases se verificó la presencia del hongo en el 100% de las raíces analizadas, mediante la identificación de las esporas de resistencia. Dos tipos de esporas características del género *Olpidium* spp. fueron identificadas: esporas de pared lisa características de *O. bornovanus* y esporas de pared hexagonal propias *O. brassicae*, según Herrera-Vásquez y colaboradores (2009) (Figura 7). Este tipo de esporas se observó en todas las raíces analizadas.

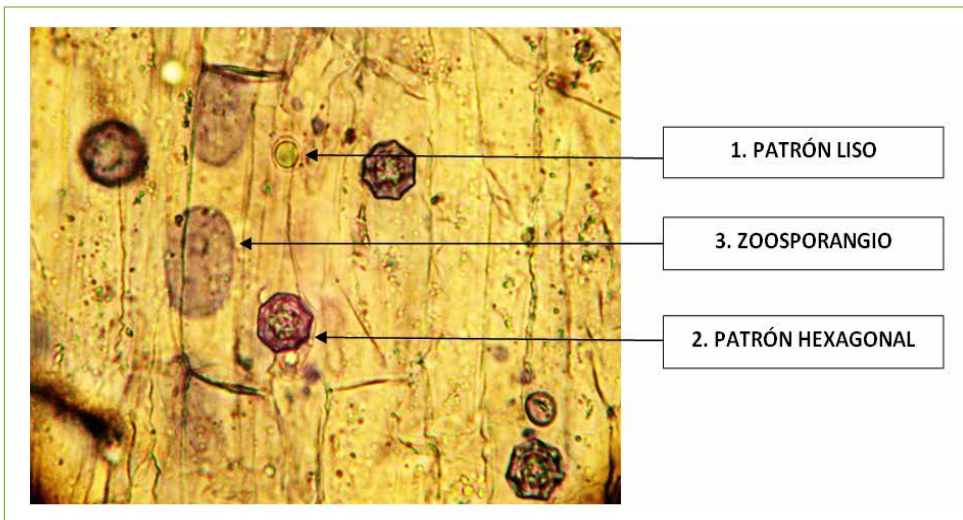


Figura 7. 1. Patrones de esporas de resistencia observadas en microscopio de contraste de fases 40x-Ph2, teñidas con azul de Tripán.

Identificación morfológica de las zoosporas de *Olpidium* sp.

Para la identificación taxonómica de *Olpidium* sp. es muy importante conocer la complejidad de la estructura interna y la organización de la zoospora. Para ello se realizó un montaje en fresco a partir de una suspensión de zoosporas,

en la cual se observaron las estructuras características de este hongo bajo microscopio de contraste de fases, objetivo 100x-Ph3, confirmando que se trata de *Olpidium* sp. (Figura 8).

Identificación molecular de *Olpidium* sp.

Extracción de ADN: Los ADN extraídos a partir de la suspensión de zoosporas y de raíces maceradas fueron cuantificados por espectrofotometría con la ayuda del NanoDrop®. De los resultados obtenidos, las muestras de ADN provenientes de raíces maceradas presentaron mejor concentración y pureza. Estas fueron elegidas para las pruebas de amplificación por PCR.

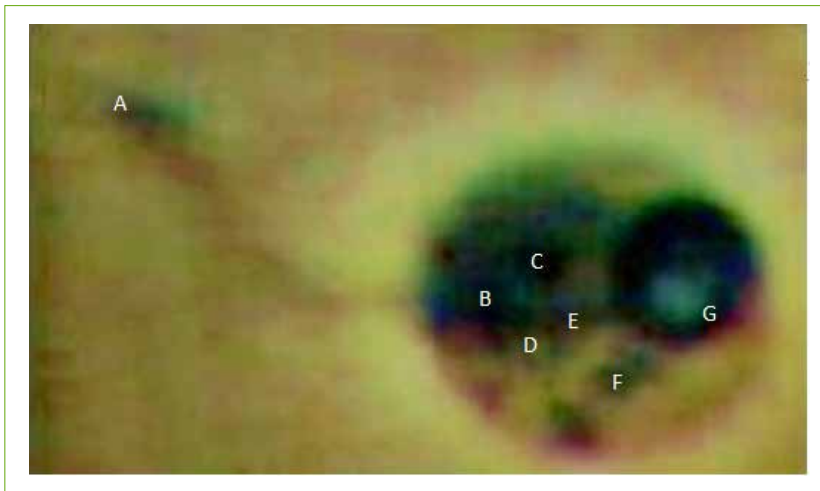


Figura 8. Estructura interna de la zoospora observada bajo microscopio de contraste de fases, 100x-Ph 3, a partir de zoosporas de *Olpidium* sp. **A.** Flagelo. **B.** Blefaroplasto funcional. **C.** Núcleo. **D.** Cápsula nuclear. **E.** Rizoplasto. **F.** Gránulos extranucleares, y **G.** Cuerpo lipídico.

Amplificación por PCR para *Olpidium* sp.

Para la identificación molecular a nivel de especie se empleó la técnica de PCR-múltiple, utilizando las tres parejas de cebadores correspondientes, cada una de ellas, a la región ITS del ADNr de tres especies de hongos pertenecientes a este género: *O. bornovanus* (OLPbor), *O. brassicae* (OLPbra) y *O. virulentus* (OLPvir). Las amplificaciones fueron realizadas con cada par de cebadores de manera independiente y así mismo de manera múltiple en una sola reacción de amplificación. Para ambos casos se determinó que la especie presente en las zonas figueras del departamento del Cauca podría ser *Olpidium virulentus*, dado que la pareja de cebadores (OLPvir) fue la única que permitió amplificar esta región en la totalidad de las muestras evaluadas (Figura 9).

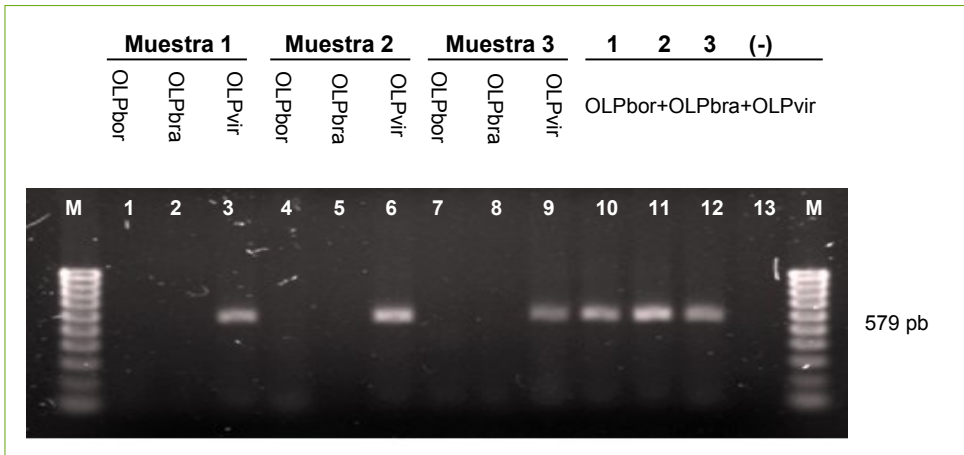


Figura 9. Amplificación PCR obtenida con cada una de las parejas de cebadores (carril 1 al 9) y con la mezcla de las tres parejas (carriles 10, 11 y 12) a partir de ADN de tres muestras de raíces infectadas con el hongo. Carril 13: Control (-), M: Marcador de peso molecular: 100 pb.

Con el ánimo de confirmar este resultado, se procedió a realizar la secuenciación de los productos obtenidos con la pareja de cebadores OLPvir. Los resultados de secuencia fueron analizados contra dos bases de datos públicas: la base de datos GenBank del Centro Nacional para Información en Biotecnología (NCBI) y la base de datos del Centro de Biodiversidad Fúngica (CBS). Con estas bases de datos y la herramienta de alineamiento BlastN, las muestras analizadas mostraron una alta homología con la especie *O. brassicae* (cepa HY-1 GenBank: AB205204.1). La cepa HY-1 corresponde a la especie *O. virulentus*, de acuerdo con las investigaciones realizadas por Sasaya y Koganesawa (2006). Un alineamiento de la secuencia obtenida en este estudio con la cepa HY1 reportada en el GenBank, confirmó este resultado por medio de la herramienta bioinformática CLUSTALW.

Resultados y conclusiones

Con el ánimo de identificar la especie de *Olpidium* sp., posible vector del virus de la macana del fique, se realizaron estudios morfológicos de los zoosporangios bajo el microscopio. Dichas observaciones demostraron que estas estructuras no permiten establecer con certeza ninguna discriminación a nivel de especie, razón por la cual procedimos a estudiar las esporas de resistencia, las cuales son un factor determinante para este tipo de identificación.

Bajo el microscopio se observaron esporas de resistencia con dos patrones diferentes a partir de una misma muestra, uno de pared lisa, propio de *O. bornovanus*, y otro de pared hexagonal, propio de *O. brassicae*, e incluso se observó la ausencia total de ellas en algunas muestras analizadas. Por lo que

se demuestra que no fue una aproximación precisa para diferenciar especies dentro de este género.

Todo lo anterior llevó a recurrir a técnicas más finas, de tipo molecular, y menos complejas que pudieran identificar con mayor precisión la especie del hongo de este estudio. Para ello se utilizó la PCR múltiple, mediante la cual fue posible identificar, a partir de regiones ITS específicas del genoma de tres especies de *Olpidium* spp. (*O. bornavanus*, *O. brassicae* y *O. virulentus*), que la especie del hongo presente en las regiones productoras de fique en el departamento del Cauca es *O. virulentus*. Este resultado fue corroborado por el análisis de la secuencia.

Cabe destacar que la metodología molecular arrojó resultados satisfactorios que requirieron de procesos arduos de normalización, tanto para la obtención de la muestra (producción masiva de zoosporas), como para la purificación de la misma (baja carga bacteriana), pues para lograr una identificación precisa, la fuente y pureza del ADN, así como la especificidad de los cebadores, fueron fundamentales para la detección y diferenciación de la especie del hongo.

Referencias bibliográficas

1. Cepero de García, M.C. Beltrán, C.R. & Cotes, A.M. 2006. Detección de *Olpidium brassicae* en raíces de fique (*Furcraea* sp.), como posible vector del virus de la raya necrótica del fique. En: *Estudios micológicos para determinar la posible presencia del hongo O. brassicae en muestras de suelo procedentes de la rizosfera de plantas infectadas y no infectadas con el virus de la macana*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica. Documento interno.
2. Colariccio, A. Chaves, A.L.R. Eiras, M. Chagas, C.M. & Roggero, P. 2005. Detection of Varicosavirus and Ophiovirus in lettuce associated whit Lettuce Big-Vein symptoms in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*. 30(4). Pp. 416-419.
3. Crueger, W. & Crueger, A. 1993. *Biotecnología. Manual de Microbiología Industrial*. Zaragoza, España: Ed. Acribia.
4. Herrera-Vásquez, J.Á. Cebrián, M.C. Alfaro-Fernández, A. Córdoba-Sellés, M.C. & Jordá, C. 2009. Multiplex PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Olpidium bornovanus*, *O. brassicae* and *O. virulentus*. *Mycological Research*. 113. Pp. 602-610.
5. Koganezawa, H. Inoue, H. & Sasaya, T. 2005. Host specificity and multiplication of eight isolates of *Olpidium brassicae* sensu lato and its related *Olpidium* sp. *Bulletin of the National Agricultural Research Center*. 4. Pp. 39-59.
6. Kularatne, H.A. Lawrie, A.C. Barber, P.A. & Keane, P.J. 2004. A specific primer PCR and RFLP assay for the rapid detection and differentiation in planta of some *Mycosphaerella* species associated with foliar diseases of *Eucalyptus globulus*. *Mycological Research*. 108. Pp. 1476-1493.
7. Denman, S.E. & McSweeney, C.S. 2005. Quantitative (real-time) PCR. En: *Methods in gut microbial ecology for ruminants*. Makkar, H. & McSweeney, C. (eds.). International Atomic Energy Agency. IAEA. Springer. The Netherlands. Pp. 105-115.

8. Morales, F. Castaño, M. Calvert, L. & Arroyave, A. 1992. Furcraea Necrotic Streak Virus: An apparent new member of the Dianthovirus group. *Journal of Phytopathology*. 134. Pp. 247-254.
9. Morales, F. Castaño, M. & Martínez, A.K. 2003. *La macana o radilla del fique (Furcraea sp.): Avances de la investigación y caracterización molecular del agente causal 1977-2003*. Documento interno. Unidad de Virología Vegetal. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
10. Phillips, J.M. & Hayman, D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*. 55 (1). Pp. 158-161.
11. Rochon, D. Kakani, K. Robbins, M. & Reade, R. 2004. Molecular aspects of plant virus transmission by *Olpidium* and plasmodiophorid vectors. *Annual Review of Phytopathology*. 42. Pp. 211-241.
12. Sasaya, T. & Koganezawa, H. 2006. Molecular analysis and virus transmission tests place *Olpidium virulentus*, a vector of Mirafiori lettuce big-vein virus and tobacco stunt virus, as a distinct species rather than a strain of *Olpidium brassicae*. *Journal of General Plant Pathology*. 72. Pp. 20-25.
13. Temmink, J.H.M. & Cambell, R.N. 1968. The ultrastructure of *Olpidium brassicae*. I. Formation esporangia. *Canadian Journal of Botany*. 46. Pp. 951-956.
14. Temmink, J.H.M. 1971. An ultrastructural study of *Olpidium brassicae* and its transmission of tobacco necrosis virus. *Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen*. Pp. 1-135.
15. Tomlinson, J.A. & Garret, R.G. 1964. Studies on the lettuce big-vein virus and its vector *Olpidium brassicae* (Wor.) Dang. *Annals of Applied Biology*. 54. Pp. 45-61.
16. White, T.J. Bruns, T. Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for Phylogenetics. En: Innis, M.A. Gelfand, D.H. Sninsky, J.J. & White, T.J. (eds). *PCR Protocols: a guide to methods and amplifications*. San Diego, USA: Academic Press. Pp. 315-322.

ANÁLISIS ECONÓMICO E IMPACTO DEL VIRUS DE LA MACANA EN EL CULTIVO DE FIQUE

Reinel Flórez¹, Camilo Beltrán-Acosta², Inés Toro Suárez³

¹Unidad de Valorización, Centro de Biotecnología y Bioindustria, CBB
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica

²Laboratorio de Control Biológico, CBB, Corpoica

³C.I. Tibaitatá, Corpoica
itoro@corpoica.org.co

Introducción

El fique (*Furcraea* spp.) es una especie nativa, ampliamente distribuida en Colombia y de la cual viven 420.000 productores distribuidos en los diferentes departamentos fiqueros (Castellanos *et al.*, 2009). En el momento, la única entrada que perciben los productores proviene de la venta de la fibra. Sin embargo, la macana, una de las enfermedades más comunes en este cultivo, por el tipo de daño que ocasiona en la hoja y en la planta, afecta directamente la cantidad y la calidad de la fibra que se produce.

Los productores de fique utilizan, al establecer el cultivo, tres formas de siembra: dispersa, asociada o compacta (SIPSA, 1998). En la siembra dispersa, las plantas se ubican en una o dos líneas en los linderos de los predios o separando las parcelas de otros cultivos o potreros, como cerca viva. En el sistema asociado, se usan distancias entre surcos muy amplias, permitiendo la siembra entre ellos de cultivos de pan coger como maíz, frijol, papa, etc. En la siembra compacta, se dedica una gran parte de la superficie del terreno para establecer el cultivo, que puede tener diferentes densidades, dependiendo de las distancias de siembra que acostumbre el agricultor, siendo las más comunes de 2 a 3 m entre surcos y de 1,20 a 1,50 m entre plantas. Lo anterior significa que el número de plantas por hectárea y, por consiguiente los ingresos, dependen de la forma de siembra utilizada.

En el Cauca, en cultivos de fique ubicados por debajo de los 1.900 msnm, no se observa la presencia de la raya necrótica de la macana, mientras que a altitudes mayores a 2.300 msnm se han presentado síntomas de la enfermedad en las plantas sembradas, que oscilan entre un 26% y un 50% (Gómez, 2003). En el corregimiento de Paniquitá (Cauca), parte de la zona de investigación realizada entre los años 2010 y 2011, los agricultores y los investigadores en campo han coincidido en que el porcentaje de incidencia y afectación del virus es de un 30%. Este factor provoca una disminución de igual proporción en la cantidad de fibra de primera calidad producida, ya que la fibra afectada por la macana se quiebra fácilmente durante el beneficio, produciendo fibra corta, clasificada como de tercera. Esto afecta los ingresos del productor, porque el precio de un kilogramo de cabuya de primera calidad es de \$1.528 (precios a octubre de 2011) y el de fibra corta, desperdicio o de tercera categoría es de \$724 por kilogramo, es decir, que el productor deja de percibir \$804 por kilogramo de fibra vendida, lo cual significa que la presencia de macana en los cultivos tiene un impacto económico serio.

Para determinar de forma precisa cuál es el monto de dicho impacto, se va a comparar la rentabilidad por hectárea que tiene el productor, por la venta de la fibra de fique durante los primeros 20 años después de establecido un cultivo, sin presencia de macana, con la que obtiene, en las mismas circunstancias, pero con la presencia del virus, usando para ello un porcentaje de afectación de un 30%. Lo anterior se va a obtener comparando los parámetros financieros más comunes, como son la Tasa Interna de Retorno (TIR) y el Valor Presente Neto (VPN), que trae a precios de hoy las ganancias que se lograrán en 20 años, y midiendo luego su impacto en el flujo efectivo de caja.

Con estos resultados se quiere mostrar, de forma objetiva, las pérdidas en que puede incurrir un agricultor en su unidad productiva, si no toma las medidas necesarias para el control de la enfermedad. A su vez, se pretende que mediante capacitación, los productores empiecen a tomar decisiones utilizando indicadores obtenidos mediante métodos o herramientas técnicas y así reducir la incertidumbre inherente al sector agrícola.

En el presente documento se establecen los supuestos de trabajo y se presenta la metodología utilizada para calcular los parámetros que miden los impactos económicos del virus de la macana. Se presentan las tablas con los costos de producción, el flujo de caja, base para los cálculos realizados, así como algunas recomendaciones y conclusiones.

Metodología empleada para el análisis económico

Con el objetivo de comparar el cultivo con y sin presencia de la macana y así demostrar la importancia y ventajas para el agricultor, en la parte económica, de

tener un cultivo libre del virus, a continuación se describen los pasos seguidos en este análisis financiero.

Establecimiento de los supuestos de trabajo

Se seleccionó un escenario optimista, es decir, un cultivo compacto con una Unidad Técnica Productiva (UTP) de una hectárea y una densidad de 2.000 plantas. Se asume que la única fuente de ingresos proviene de la venta de la fibra, que corresponde a un 4% de la hoja. Para los cálculos realizados, se adopta como cierto que a la bodega de compra llega fibra de diferentes calidades, por tanto, cuando un cultivo no tiene macana, la calidad de la fibra está distribuida como sigue: de primera calidad en un 92%, de segunda en un 5% y de tercera en un 3%; pero cuando la fibra procede de un cultivo con macana, la proporción adoptada es de 62% para fibra de primera calidad, 5% de segunda y 33% de tercera, es decir, que la proporción de fibra de segunda permanece constante y se incrementa notablemente la de tercera.

Se fijó un horizonte de producción a 20 años, asumiendo que en los primeros seis años los costos son variables, debido a que el cultivo aún no entra en su etapa de producción máxima. A partir del año siete y hasta el año 20 de establecido el cultivo, los costos de producción serán constantes. También se asume que para estos años la producción por hectárea sea óptima, es decir, de 2 kg por planta al año, lo cual resulta en un total de fibra por hectárea de 4.000 kg/año.

Determinación de los costos de producción

Para determinar los costos de producción se partió del estudio realizado por Romero en 2007, que para la obtención de estos valores recurrió a información de diversas fuentes, como entrevistas a técnicos relacionados con la actividad, cultivadores, comercializadores y transformadores del fique. A los valores logrados por Romero se les adicionó el costo de mantenimiento y la depreciación de los equipos utilizados en el beneficio de la fibra.

Un aspecto que también se ha tenido en cuenta es la adquisición de la máquina desfibradora, la cual debe hacerse al cuarto año de establecido el cultivo, para iniciar el ciclo productivo con la extracción de la cabuya. Lo anterior, considerando, como ya se dijo, que por cada UPT hay que beneficiar 2.000 plantas.

Flujo de caja

Para la obtención de las proyecciones financieras se utilizaron premisas conservadoras que aseguran, como mínimo, el análisis de los elementos básicos del costo, como son: la mano de obra empleada en los procesos de establecimiento del cultivo, el control fitosanitario y de malezas, la cosecha y el

beneficio; insumos como la compra de abono orgánico, de fungicidas y los costos indirectos de producción, que son aquellos gastos diferentes a los materiales y a la mano de obra, en los que se incurre para la producción y comercialización de la fibra. Entre ellos tenemos: servicios y arriendos, depreciación y mantenimiento de la máquina desfibradora, el tanque de fermentación, el secadero aéreo y la bodega para el almacenamiento de los insumos.

Determinación de los indicadores financieros

Los indicadores financieros de decisión utilizados fueron, como ya se dijo, la tasa que permite identificar el tiempo de recuperación y el rendimiento de una inversión, denominada Tasa Interna de Retorno (TIR), y el indicador que permite evaluar una ganancia, teniendo en cuenta la pérdida de poder adquisitivo del dinero con el paso del tiempo o Valor Presente Neto (VPN).

Resultados

Sin macana

En la Tabla 1 se presenta el análisis de costos de producción, según los supuestos establecidos en la metodología. La estructura de costos muestra que en promedio el impacto por depreciación y mantenimiento de la máquina asciende a un 34% de los costos indirectos y a un 38% de los costos totales.

Al igual que el flujo de caja proyectado (Tabla 2), durante los seis primeros años se debe incurrir en gastos cercanos a los \$7.348.810, los cuales serían recuperados durante el ciclo productivo del cultivo y se obtendrían ingresos netos, es decir, descontando los gastos incurridos en los seis primeros años, por valor de \$22.879.760, lo que permite calcular una TIR de 15,1% y evaluar los ingresos bajo un VPN, con una tasa de descuento del 5%, que es la meta de inflación promedio proyectada por el Banco de la Republica de Colombia para los próximos años. Por consiguiente, se tendrían ingresos netos de \$ 9.075.226, lo cual es equivalente a que el agricultor depositara esa cantidad, en el año cero, a un interés del 5% anual y recibieran el pago en cuotas desde el año siete al 20, como se aprecia en el flujo de caja.

Con macana

En términos financieros, los ingresos del agricultor en un cultivo con macana se ven disminuidos durante el ciclo productivo del cultivo (6-20 años) a \$ 9.613.760, esto nos indica que deja de recibir por la venta de fibra de calidad \$13.266.000, lo cual provoca que las expectativas en la tasa de rendimiento (TIR) para esta unidad técnica llegue al 8,44%, es decir, una diferencia en la disminución de la rentabilidad cercana al 6,66% frente a un cultivo libre de macana (Tablas 3 y 4).

Tabla 1. Costos de producción para una Unidad Productiva Técnica (UPT), 2,000 plantas/ha. Cifras en pesos colombianos

ACTIVIDADES	PRECIO	Año 0			Año 1			Año 2			Año 3			
		UNIDAD	CANT.	Valor	%	CANT.	Valor	%	CANT.	Valor	%	CANT.	Valor	%
MANO DE OBRA														
Establecimiento (siembra)		Jornal	20,0	\$ 20.000	42%	2,0	\$ 40.000	15%	2,0	\$ 40.000	15%	2,0	\$ 40.000	15%
Control fitosanitario (semillero cultivo)		Jornal	14,0	\$ 280.000	49%	1,0	\$ 20.000	29%	1,0	\$ 20.000	29%	1,0	\$ 20.000	29%
Control de malezas		Jornal	7,0	\$ 140.000	34%	4,0	\$ 80.000	14%	4,0	\$ 80.000	14%	4,0	\$ 80.000	14%
Cosecha		Jornal	0,0	\$ 0	17%	0,0	\$ 0	57%	0,0	\$ 0	57%	0,0	\$ 0	57%
Beneficio		Jornal	0,0	\$ 0	0%	0,0	\$ 0	0%	0,0	\$ 0	0%	0,0	\$ 0	0%
INSUMOS														
Abono orgánico		Kilo	1.200,0	\$ 600.000	31%	1.000,0	\$ 500.000	56%	1.000,0	\$ 500.000	53%	1.000,0	\$ 500.000	53%
Oxícloruro de cobre		Kilo	3,0	\$ 10.500	98%	3,0	\$ 10.500	98%	3,0	\$ 10.500	98%	3,0	\$ 10.500	98%
COSTOS INDIRECTOS														
Servicios y arriendos														
Transporte de fibra		Kilo	0,0	\$ 0	26%	0,0	\$ 0	29%	0,0	\$ 0	32%	0,0	\$ 0	32%
Transporte de insumos		Global	3,5	\$ 350.000	100%	1,0	\$ 100.000	100%	1,5	\$ 150.000	100%	1,5	\$ 150.000	100%
Gastos varios		Año	1,0	\$ 100.000	0%	1,0	\$ 100.000	0%	1,0	\$ 100.000	0%	1,0	\$ 100.000	0%
Cuota de asociación		Año	1,0	\$ 60.000	0%	1,0	\$ 60.000	0%	1,0	\$ 60.000	0%	1,0	\$ 60.000	0%
Depreciación														
Herramientas de cosecha y beneficio		Global		\$ 375.000	0%		\$ 0	0%		\$ 0	0%		\$ 0	0%
Máquina desfibadora		Global		\$ 3.500.000	0%		\$ 0	0%		\$ 0	0%		\$ 0	0%
Tanque de fermentación		Global		\$ 350.000	0%		\$ 0	0%		\$ 0	0%		\$ 0	0%
Secadero aéreo		Global		\$ 450.000	0%		\$ 0	0%		\$ 0	0%		\$ 0	0%
Bodega de almacenamiento		Global		\$ 500.000	0%		\$ 0	0%		\$ 0	0%		\$ 0	0%
Mantenimiento														
Mantenimiento de la máquina		Año		\$ 350.000	0%		\$ 0	0%		\$ 0	0%		\$ 0	0%
Mantenimiento del secadero		Año		\$ 45.000	0%		\$ 0	0%		\$ 0	0%		\$ 0	0%
Mantenimiento del tanque		Año		\$ 35.000	0%		\$ 0	0%		\$ 0	0%		\$ 0	0%
Insumos indirectos														
ACPM		Galón	0,0	\$ 5.100	0%		\$ 0	0%		\$ 0	0%		\$ 0	0%
Grasa y aceite		Global	0,0	\$ 25.000	0%		\$ 0	0%		\$ 0	0%		\$ 0	0%
Guantes		Global	0,0	\$ 12.000	0%		\$ 0	0%		\$ 0	0%		\$ 0	0%
TOTAL COSTOS														
				\$ 1.940.500	100%		\$ 910.500	100%		\$ 960.500	100%		\$ 960.500	100%

Continuación Tabla 1. Costos de producción para una Unidad Productiva Técnica (UPT), 2,000 plantas/ha. Cifras en pesos colombianos

ACTIVIDADES	PRECIO	Año 0			Año 1			Año 2			Año 3		
		UNIDAD	CANT.	Valor	%	CANT.	Valor	%	CANT.	Valor	%	CANT.	Valor
MANO DE OBRA				\$ 280.000	9%	\$ 280.000	8%	\$ 280.000	8%	\$ 280.000	8%	\$ 280.000	7%
Establecimiento (resiembría)		Jornal	2,0	\$ 40.000	14%	2,0	\$ 40.000	14%	2,0	\$ 40.000	14%	2,0	\$ 40.000
Control fitosanitario (semillero cultivo)		Jornal	1,0	\$ 20.000	7%	1,0	\$ 20.000	7%	1,0	\$ 20.000	7%	1,0	\$ 20.000
Control de malezas		Jornal	4,0	\$ 80.000	29%	4,0	\$ 80.000	29%	4,0	\$ 80.000	29%	4,0	\$ 80.000
Cosecha		Jornal	4,0	\$ 80.000	29%	4,0	\$ 80.000	29%	4,0	\$ 80.000	29%	4,0	\$ 80.000
Beneficio		Jornal	3,0	\$ 60.000	21%	3,0	\$ 60.000	21%	3,0	\$ 60.000	21%	3,0	\$ 60.000
INSUMOS				\$ 510.500	16%	\$ 510.500	15%	\$ 510.500	14%	\$ 510.500	14%	\$ 510.500	13%
Abono orgánico		Kilo	1.000,0	\$ 500.000	98%	1.000,0	\$ 500.000	98%	1.000,0	\$ 500.000	98%	1.000,0	\$ 500.000
Oxcloruro de cobre		Kilo	3,0	\$ 10.500	2%	3,0	\$ 10.500	2%	3,0	\$ 10.500	2%	3,0	\$ 10.500
COSTOS INDIRECTOS				\$ 2.392.000	75%	\$ 2.623.000	77%	\$ 2.854.000	78%	\$ 3.085.000	80%	\$ 3.316.000	82%
SERVICIOS Y ARRIENDOS				\$ 540.000	23%	\$ 720.000	27%	\$ 900.000	32%	\$ 1.080.000	35%	\$ 1.260.000	39%
Transporte de fibra		Kilo	1.000,0	\$ 180.000	33%	2.000,0	\$ 360.000	50%	3.000,0	\$ 540.000	60%	4.000,0	\$ 720.000
Trasporte de insumos		Global	2,0	\$ 200.000	37%	2,0	\$ 200.000	28%	2,0	\$ 200.000	22%	2,0	\$ 200.000
Gastos varios		Año	1,0	\$ 100.000	19%	1,0	\$ 100.000	14%	1,0	\$ 100.000	11%	1,0	\$ 100.000
Cuota de asociación		Año	1,0	\$ 60.000	11%	1,0	\$ 60.000	8%	1,0	\$ 60.000	7%	1,0	\$ 60.000
DEPRECIACION				\$ 1.035.000	43%	\$ 1.035.000	39%	\$ 1.035.000	36%	\$ 1.035.000	34%	\$ 1.035.000	31%
Herramientas de cosecha y beneficio		Global		\$ 75.000	7%		\$ 75.000	11%		\$ 75.000	7%		\$ 75.000
Máquina desfibadora		Global		\$ 700.000	68%		\$ 700.000	68%		\$ 700.000	68%		\$ 700.000
Tanque de fermentación		Global		\$ 70.000	7%		\$ 70.000	7%		\$ 70.000	7%		\$ 70.000
Secadero aéreo		Global		\$ 90.000	9%		\$ 90.000	9%		\$ 90.000	9%		\$ 90.000
Bodega de almacenamiento		Global		\$ 100.000	10%		\$ 100.000	10%		\$ 100.000	10%		\$ 100.000
MANTENIMIENTO				\$ 430.000	18%	\$ 430.000	16%	\$ 430.000	15%	\$ 430.000	14%	\$ 430.000	13%
Mantenimiento de la máquina		Año		\$ 350.000	81%		\$ 350.000	81%		\$ 350.000	81%		\$ 350.000
Mantenimiento del secadero		Año		\$ 45.000	10%		\$ 45.000	13%		\$ 45.000	13%		\$ 45.000
Mantenimiento del tanque		Año		\$ 35.000	8%		\$ 35.000	48%		\$ 35.000	10%		\$ 35.000
INSUMOS INDIRECTOS				\$ 387.000		\$ 438.000	17%	\$ 489.000	17%	\$ 540.000	18%	\$ 591.000	19%
ACPM		Galón	10,0	\$ 5.100	13%	20,0	\$ 102.000	23%	30,0	\$ 153.000	31%	40,0	\$ 204.000
Grasa y aceite		Global	12,0	\$ 300.000	78%	12,0	\$ 300.000	294%	12,0	\$ 300.000	61%	12,0	\$ 300.000
Guantes		Global	3,0	\$ 36.000	9%	3,0	\$ 36.000	12%	3,0	\$ 36.000	7%	3,0	\$ 36.000
TOTAL COSTOS				\$ 3.182.500	100%	\$ 3.413.500	100%	\$ 3.644.500	100%	\$ 3.875.500	100%	\$ 4.106.500	100%

* Los costos desde el año siete hasta el año 20 son constantes.

Tabla 2. Flujo de caja proyectado para una Unidad Productiva Técnica. 2.000 plantas/ha. Cifras en pesos colombianos

ACTIVIDADES	Año 0	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5	Año 6	Año 7
INGRESOS								
Venta de fibra de fique	\$ 0	\$ 0	\$ 0	\$ 0	\$ 1.493.730	\$ 2.987.460	\$ 4.481.190	\$ 5.974.920
TOTAL INGRESOS	\$ 0	\$ 0	\$ 0	\$ 0	\$ 1.493.730	\$ 2.987.460	\$ 4.481.190	\$ 5.974.920
COSTOS								
Mano de obra	\$ 820.000	\$ 140.000	\$ 140.000	\$ 140.000	\$ 280.000	\$ 280.000	\$ 280.000	\$ 280.000
Insumos	\$ 610.500	\$ 510.500	\$ 510.500	\$ 510.500	\$ 510.500	\$ 510.500	\$ 510.500	\$ 510.500
Costos indirectos	\$ 510.000	\$ 260.000	\$ 310.000	\$ 310.000	\$ 2.623.000	\$ 2.854.000	\$ 2.854.000	\$ 3.085.000
TOTAL COSTOS	\$ 1.940.500	\$ 910.500	\$ 960.500	\$ 960.500	\$ 3.413.500	\$ 3.644.500	\$ 3.644.500	\$ 3.875.500
FLUJO NETO	\$ -1.940.500	\$ -910.500	\$ -960.500	\$ -960.500	\$ -1.919.770	\$ -657.040	\$ 836.690	\$ 2.099.420
PRODUCCIÓN ANUAL	-	-	-	-	1.000	2.000	3.000	4.000
COSTOS POR KILO	\$ 0	\$ 0	\$ 0	\$ 0	\$ 3.414	\$ 1.822	\$ 1.215	\$ 969

TIR	15,10%
VPN*	\$ 9.075.226
INGRESOS TOTALES	\$ 22.879.760

* Estimación bajo una tasa de descuento del 5% por la inflación proyectada en promedio para los próximos años.

Tabla 3. Flujo de caja proyectado para una Unidad Productiva Técnica (UPT) afectada por el virus de la macana. 2.000 plantas/ha. Cifras en pesos colombianos

ACTIVIDADES	Año 0	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5	Año 6	Año 7
INGRESOS								
Fique	\$ 0	\$ 0	\$ 0	\$ 0	\$ 1.252.530	\$ 2.505.060	\$ 4.481.190	\$ 5.974.920
TOTAL INGRESOS	\$ 0	\$ 0	\$ 0	\$ 0	\$ 1.252.530	\$ 2.505.060	\$ 4.481.190	\$ 5.974.920
COSTOS								
Mano de obra	\$ 820.000	\$ 140.000	\$ 140.000	\$ 140.000	\$ 280.000	\$ 280.000	\$ 280.000	\$ 280.000
Insumos	\$ 610.500	\$ 510.500	\$ 510.500	\$ 510.500	\$ 510.500	\$ 510.500	\$ 510.500	\$ 510.500
Costos indirectos	\$ 510.000	\$ 260.000	\$ 310.000	\$ 310.000	\$ 2.623.000	\$ 2.854.000	\$ 2.854.000	\$ 3.085.000
TOTAL COSTOS	\$ 1.940.500	\$ 910.500	\$ 960.500	\$ 960.500	\$ 3.413.500	\$ 3.644.500	\$ 3.644.500	\$ 3.875.500
FLUJO NETO	\$ -1.940.500	\$ -910.500	\$ -960.500	\$ -960.500	\$ -2.160.970	\$ -1.139.440	\$ 836.690	\$ 2.099.420
PRODUCCIÓN ANUAL	-	-	-	-	1.000	2.000	3.000	4.000
COSTOS POR KILO	\$ 0	\$ 0	\$ 0	\$ 0	\$ 3.414	\$ 1.822	\$ 1.215	\$ 969

TIR	8,44%
VPN*	\$ 2.392.124
INGRESOS TOTALES	\$ 9.613.760

* Estimación bajo una tasa de descuento del 5% por la inflación proyectada en promedio para los próximos años.

En la Tabla 4 se presenta el comparativo de la TIR y el VPN, además de los ingresos totales con proyección a 20 años, según la estructura de costos de producción y teniendo en cuenta un cultivo sin la presencia del virus de la macana y un cultivo afectado con el virus.

Tabla 4. Comparativo de indicadores financieros de decisión para el cultivo de fique sin enfermedad y con el virus de la macana. Proyección de 0 - 20 años

Indicadores financieros	Cultivo sin virus de la macana	Cultivo con virus de la macana
TIR	15,10%	8,44%
VPN*	\$ 9.075.226	\$ 2.392.124
INGRESOS TOTALES. 20 años	\$ 22.879.760	\$ 9.613.760

* Estimación bajo una tasa de descuento del 5% por la inflación proyectada en promedio para los próximos años.

Recomendaciones

Para ser más eficiente con los costos anteriores se aconseja tener más de una hectárea cultivada, ya que los costos, al ser fijos, el impacto en la estructura de costos se puede ver disminuida con el paso del tiempo; porque con cada hectárea adicional de cultivo se pueden equilibrar, es decir, que si anualmente por una hectárea le corresponden \$1.050.000, para dos hectáreas de cultivo el costo sería de \$525.000, en tres hectáreas sería de \$350.000 y para cuatro hectáreas de cultivo sería de \$262.500, lo cual permitiría disminuir costos y aumentar la rentabilidad del cultivo. Por lo anterior, se aconseja tener cultivos mayores a cuatro hectáreas, en los cuales el impacto en los costos indirectos, en cuanto a depreciación y mantenimiento de equipos, se disminuiría en un 75%, debido a que son constantes, sin importar el nivel de producción.

Conclusiones

Si el productor de fique no toma las medidas necesarias para el control del virus de la macana, los porcentajes de pérdida con la incidencia del 30% provocan una disminución de ingresos y rentabilidad en el cultivo de fique de \$13.266.000 y 6,66%, respectivamente, en un periodo de 20 años, frente a un cultivo en el que la enfermedad no se presenta.

Igualmente, solo se contempló la extracción de fibra que corresponde al 4%, debido a que en Colombia el 96% del material, correspondiente a los residuos sólidos y líquidos obtenidos durante el beneficio del fique, en su gran mayoría no son aprovechados.

Al aumentar los ingresos por el aprovechamiento de los subproductos generados durante la extracción de la fibra, se mejoraría la relación costo-beneficio para los

agricultores. Actualmente, el material generado en el beneficio, simplemente se deja en el campo o va a parar a los ríos y quebradas, convirtiéndose así en un factor de contaminación del medio ambiente y de las corrientes de agua (Granados, 2009).

Referencias bibliográficas

1. Castellanos, O. Torres, L. & Rojas, J. 2009. Análisis de la cadena productiva de fique En: *Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de fique en Colombia*. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Proyecto Transición de la Agricultura. Universidad Nacional de Colombia. Grupo de investigación y desarrollo en gestión, productividad y competitividad BioGestión. Pp. 21-96.
2. Gómez, J. 2003. Estudios fitopatológicos de la macana del fique en Colombia. Informe interno. Documento interno. Popayán, Colombia: Corporación Colombiana de investigación agropecuaria, Corpoica. 25 p.
3. Granados, C. 2009. *Caracterización de la cadena de valor para la extracción de hecogenina a partir de jugo de fique en el departamento de Boyacá*. Tesis de Ingeniería Industrial. Facultad de Ingeniería. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 139 p.
4. SIPSA. 1998. El fique en Colombia. Sistema de información de precios del sector agropecuario. *Boletín mensual, precios de insumos y factores de producción agrícola*. Noviembre. Vol. 6 (11). Pp. 1-4.
5. Romero, E. 2007. *Estudio de factibilidad para el montaje de un centro de beneficio en el corregimiento de Ricaurte, municipio de El Tambo, Nariño*. Tesis de Ingeniería Agroindustrial. Universidad de Nariño. Pasto. 98 p.

PRUEBAS DE DEMOSTRACIÓN DEL MODO DE TRANSMISIÓN DEL VIRUS DE LA RAYA NECRÓTICA DEL FIQUE

Manabu Kusunoki¹ y Camilo Beltrán-Acosta²

¹Agencia de Cooperación Internacional del Japón, JICA¹

²Laboratorio de Control Biológico, Centro de Biotecnología y Bioindustria, CBB
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica
cbeltran@corpoica.org.co

Introducción

La producción de fique (*Furcraea* spp.) en Colombia se ve afectada principalmente por una enfermedad viral conocida como macana o raya necrótica, diseminada por las principales regiones productoras (Gálvez *et al.*, 1977; Cadefique *et al.*, 2006). Las plantas infectadas se caracterizan por la aparición inicial de manchas y rayas cloróticas en el haz y envés de las hojas que cambian a color rojo o marrón, necrosándose, seguido de la aparición de un mosaico sistémico. La fibra extraída de hojas afectadas es de menor calidad y tamaño, y adicionalmente la planta reduce su crecimiento a medida que la enfermedad avanza hasta que, eventualmente, muere, ocasionando así pérdidas económicas importantes para los productores. Morales y colaboradores (1992) señalan que el virus causal (*Furcraea Necrotic Streak Virus*) puede pertenecer al grupo de los Dianthovirus, de acuerdo con la caracterización molecular.

Eventualmente, el agente de la enfermedad puede ser transmisible con machetes y otras herramientas utilizados para la cosecha de las hojas y el mantenimiento del cultivo. Cepero de García y colaboradores (2006) encontraron el hongo *Olpidium* sp. en raíces de fique y de lechuga (planta indicadora), el cual es conocido como un agente transmisor de algunos virus fitopatógenos que se encuentran en las raíces de plantas de cultivo (Rochon *et al.*, 2004; Rochon, 2009). Las plantas infectadas pueden o no expresar síntomas, dependiendo de factores como temperatura, luminosidad y condiciones del suelo (Walsh,

1994). Osorio (2010) identificó por técnicas moleculares al hongo presente en las raíces de fique como *O. virulentus*, lo cual hace difícil manejar la enfermedad en condiciones de campo, por su condición de parásito obligado de raíces. Sin embargo, no existen reportes claros que demuestren el modo de transmisión del virus. Ante los daños y pérdidas causados por este patógeno, los agricultores realizan un control de tipo cultural mediante la destrucción, quema o aplicación de herbicidas a las plantas afectadas (Cadefique, 2006). De acuerdo con estos antecedentes se inició esta investigación con el objetivo de evaluar diferentes formas de transmisión del virus causal en plantas de fique y generar síntomas visibles y evidentes de la enfermedad.

Materiales y métodos

Material vegetal utilizado para inocular

Para las pruebas de inoculación se emplearon dos grupos de plantas de fique: el primero correspondió a plantas de fique propagadas *in vitro*, y el segundo, a bulbillos (semilla). Las plantas de fique de las que se obtuvieron los bulbillos presentaban síntomas típicos de la clorosis y necrosis generada por el virus. Plantas de lechuga con al menos tres hojas verdaderas al momento del trasplante.

Para las pruebas de detección del virus por inoculación de extractos se emplearon plantas indicadoras como *Nicotiana tabacum*, *N. glutinosa* y *Petunia hybrida*, muy utilizadas en ensayos con virus.

Obtención del inóculo

Para obtener el extracto con el cual se inocularon las plantas de fique se llevaron a cabo tres procedimientos. En primer lugar, se recolectaron hojas de fique provenientes de cultivos de fique en el corregimiento de Paniquitá, municipio de Totoró (Cauca), que mostraban los síntomas de la enfermedad. Estas hojas fueron maceradas en tampón fosfato y el extracto obtenido se empleó de forma inmediata para su inoculación en nuevo material vegetal libre de virus. Para el segundo procedimiento se emplearon plantas de fique propagadas *in vitro*, libres de virus, pero que al ser inoculadas con el extracto previamente obtenido presentaron leves síntomas, y finalmente, para el tercer procedimiento se emplearon hojas de plantas de lechuga que mostraron síntomas del virus (Figura 1), las cuales fueron inducidas por la siembra en suelo proveniente de cultivos de fique afectados por la enfermedad. Este modelo se utilizó con el fin de evaluar si había transmisión del virus desde el suelo a las plantas de lechuga, ya que como se mencionó anteriormente, el presunto agente vector de transmisión *Olpidium* spp. se encuentra principalmente en el suelo. El proceso de obtención de los extractos fue el mismo para los tres casos.



Figura 1. Lechuga que presenta en sus hojas clorosis en venas, síntoma de virus.

Inoculación mecánica de los extractos virales

Se tomaron fragmentos de hojas (5 g), de plantas enfermas con síntomas de virus y se maceraron en un mortero con aproximadamente 20 mL de tampón fosfato (0,1 M, pH: 7,0). Para las inoculaciones con extractos se agregó ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) al 0,01 M o sulfito de sodio a 0,2 M en el tampón. Posteriormente, se realizaron heridas pequeñas en las hojas de 42 plantas sanas de fique, con carburo de silicio (frotando sobre la planta con una bola de algodón seca y estéril), y luego se remojó una segunda bola de algodón en el extracto obtenido y se frotaron suavemente las hojas a las que se les había realizado la herida. Después se lavaron las hojas con abundante agua y se llevaron a incubar las plantas en condiciones de invernadero con temperatura y luz natural ambiental o en un fitotrón en el que se mantuvieron condiciones de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad a 14°C. La temperatura utilizada se mantuvo para favorecer la expresión de los síntomas (Daber y Castaño, 1978).

Transmisión del virus por áfidos

Se emplearon dos especies de áfidos diferentes para los ensayos de transmisión del virus. La primera especie fue *Myzus persicae*; la segunda, una especie de áfido de color marrón, no identificada. Ambas se hallaron de forma natural en plantas sanas de fique, mantenidas bajo condiciones de invernadero. Los áfidos fueron aislados en cajas de Petri y se dejaron en ayuno de una a tres horas.

Posteriormente se colocaron sobre plantas de fique infectadas con el virus durante dos a cinco minutos, para que comieran y fueron retirados nuevamente. Para la transmisión se tomaron de 10 a 20 áfidos y se colocaron en plantas sanas de fique propagadas *in vitro*. Los áfidos utilizados para la inoculación fueron exterminados de forma manual o con insecticida, dos o tres días después de la inoculación.

Transmisión mecánica por herida

En hojas de fique afectadas por el virus se realizaron heridas de un cm de largo aproximadamente con un bisturí (Figura 2). Posteriormente se hicieron heridas en hojas de plantas sanas propagadas *in vitro*, sin limpiar el bisturí. Esta acción fue repetida 20 veces en dos hojas por planta. Las plantas inoculadas fueron mantenidas durante cinco meses en invernadero, bajo observación constante.

Inoculación de un corte de tejido enfermo en una hoja de fique

Para garantizar que la enfermedad de la macana muestre síntomas de la raya necrótica y que este es causado por un virus, se realizaron pruebas de inoculación de tejido infectado con virus en hojas de plantas de fique sanas. Un pequeño segmento de tejido de hoja (alrededor de 1-2 x 4-5 mm) cortado de una muestra de hojas de fique con mosaico y síntomas necróticos se intercaló en una ranura cortada con un bisturí en la parte central del envés de una hoja de fique sana. Después de intercalar el tejido en la hoja, el corte se fijó con una cinta. Las plantas inoculadas se mantuvieron bajo condiciones de sombra en invernadero y observación constante.



Figura 2. Planta de fique afectada por el virus de la macana, en la que se observa un mosaico sistémico y zonas con manchas necróticas.

Transmisión por semilla (bulbillos)

Treinta y ocho semillas obtenidas de plantas afectadas por el virus en cultivos del Cauca fueron trasplantadas individualmente en materos, para observar si el virus se podía transmitir a través de las semillas o no. Los bulbillos fueron mantenidos en condiciones de invernadero o bajo condiciones controladas en el fitotrón.

Resultados

Inoculación mecánica de los extractos virales

De las plantas de fique (*in vitro* y bulbillos) y lechuga inoculadas con los extractos virales provenientes de plantas enfermas, ninguna evidenció síntomas luego del periodo de evaluación entre 3 y 10 meses en condiciones de invernadero y fitotrón. Estos resultados se resumen en las tablas 1 y 2, donde se adjuntan los datos de la fuente de inóculo, el lugar y las condiciones de crecimiento.

Tabla 1. Inoculación mecánica con extracto viral de plantas enfermas de fique*

Fecha de inóculo	Fuente de inóculo	Planta inoculada	Número de plantas inoculadas	Condición de crecimiento	Síntomas
Oct-01/2010	Original No. 1	<i>In vitro</i>	1	Invernadero	no
Dic-01/2010	Original No. 1	<i>In vitro</i>	1	Invernadero	no
Dic-01/2010	Original No. 1	<i>In vitro</i>	1	Fitotrón	no
Ene-18/2011	Cauca No. 3*1	<i>In vitro</i>	2	Invernadero	no
Ene-18/2011	Cauca No. 3*1	<i>In vitro</i>	2	Fitotrón	no
Abr-01/2011	Original No. 3	Bulbillo	4	Invernadero	no
Abr-01/2011	Original No. 3	<i>In vitro</i>	2	Invernadero	no
Abr-01/2011	Original No. 3	Bulbillo	4	Fitotrón	no
Abr-01/2011	Original No. 3	<i>In vitro</i>	2	Fitotrón	no
Abr-07/2011	Original No. 3	Bulbillo	1	Invernadero	no
Abr-07/2011	Original No. 3	Bulbillo	2	Fitotrón	no
Abr-13/2011	Original No. 1	Bulbillo	4	Invernadero	no
Abr-13/2011	Original No. 1	<i>In vitro</i>	2	Invernadero	no
Abr-13/2011	Original No. 1	Bulbillo	4	Fitotrón	no
Abr-13/2011	Original No. 1	<i>In vitro</i>	2	Fitotrón	no
Abr-19/2011	Cauca No. 1*1	Bulbillo	2	Invernadero	no
Abr-19/2011	Cauca No. 2*1	Bulbillo	2	Invernadero	no
Abr-19/2011	Cauca No. 1*1	Bulbillo	2	Fitotrón	no
Abr-19/2011	Cauca No. 2*1	Bulbillo	2	Fitotrón	no

*Evaluado hasta julio 7/2011. *1: Finca Los Arrayanes, Paniquitá (Cauca). *In vitro*: crecimiento por micropropagación.

Tabla 2. Inoculación mecánica con extracto viral de hoja de lechuga trasplantada en suelo proveniente de cultivos de fique*

Fecha	Fuente de inóculo	Planta inoculada	Número de plantas inoculadas	Condición de crecimiento	Síntomas
Feb-9/2011	Lechuga-5	Bulbillo	1	Invernadero	no
Feb-9/2011	Lechuga-5	Bulbillo	2	Fitotrón	no
Apr-07/2011	Lechuga-8	Bulbillo	1	Invernadero	no
Apr-07/2011	Lechuga-8	Bulbillo	1	Fitotrón	no
Apr-07/2011	Lechuga-8	<i>N. tabacum</i>	1	Invernadero	no
Apr-07/2011	Lechuga-8	<i>N. glutinosa</i>	1	Invernadero	no
Apr-07/2011	Lechuga-8	<i>Petunia hybrida</i>	1	Invernadero	no
Apr-14/2011	Lechuga-8	Bulbillo	4	Invernadero	no
Apr-14/2011	Lechuga-8	<i>In vitro</i>	2	Invernadero	no
Apr-14/2011	Lechuga-8	Bulbillo	4	Fitotrón	no
Apr-14/2011	Lechuga-8	<i>In vitro</i>	2	Fitotrón	no

*: Evaluado hasta julio 7/2011. *In vitro*: crecimiento por micropropagación.

Transmisión con áfidos

De 25 plantas de fique que fueron sometidas a la transmisión por virus, usando dos especies de áfidos, habitantes naturales en plantas, ninguna presentó los síntomas de la enfermedad después de evaluaciones periódicas desde la inoculación y entre cuatro a siete meses. Los datos de la inoculación y el número de áfidos empleados en la misma, fechas y condiciones de crecimiento, entre otros, se describen en la Tabla 3.

Transmisión por heridas

Luego de seis meses de haber realizado previamente heridas con un bisturí en hojas de plantas enfermas en los tejidos enfermos y posteriormente hacer cortes en plantas sanas, no se observaron síntomas de la enfermedad en las plantas de fique.

Inoculación de un corte de tejido enfermo en una hoja de fique sana

La observación de las plantas inoculadas de esta manera se llevó a cabo hasta el 30 de agosto de 2011. Una de las plantas inoculadas mostró los síntomas de mosaico (Tabla 4 y Figura 3). Pero por lo observado en previos ensayos y por no demostrar avances en el desarrollo de síntomas característicos, los experimentos deben tener un tiempo de evaluación más largo luego de realizada la inoculación y ser observados de forma continua.

Tabla 3. Inoculación con áfidos

Fecha	Fuente de inóculo	Número de áfidos inoculados	Planta inoculada	Condición de crecimiento	Síntomas
Ene-28/2011	Original No. 2	7*	<i>In vitro</i>	Fitotrón	no
Feb-1/2011	Original No. 2	6*	<i>In vitro</i>	Invernadero	no
Feb-10/2011	Original No. 2	10*	Bulbillo	Fitotrón	no
Feb-16/2011	Original No. 2	11*	Bulbillo	Invernadero	no
Feb-18/2011	Original No. 3	10*	Bulbillo	Invernadero	no
Feb-18/2011	Original No. 2	10*	Bulbillo	Invernadero	no
Feb-18/2011	Original No. 3	10*	Bulbillo	Fitotrón	no
Feb-18/2011	Original No. 2	10*	Bulbillo	Fitotrón	no
Feb-24/2011	Original No. 3	7*	Bulbillo	Invernadero	no
Feb-24/2011	Original No. 3	7*	Bulbillo	Fitotrón	no
Mar-1/2011	Original No. 3	10*	Bulbillo	Invernadero	no
Mar-11/2011	Original No. 4	9*	Bulbillo	Invernadero	no
Mar-24/2011	Original No. 2	9*	Bulbillo	Invernadero	no
Mar-24/2011	Original No. 2	10*	Bulbillo	Invernadero	no
Apr-1/2011	Original No. 4	10*	Bulbillo	Invernadero	no
Apr-1/2011	Original No. 4	20*	Bulbillo	Invernadero	no
Apr-6/2011	Original No. 4	12*	Bulbillo	Invernadero	no
Apr-6/2011	Original No. 4	20*	Bulbillo	Invernadero	no
Ene-7/2011	Original No. 2	5**	<i>In vitro</i>	Invernadero	no
Mar-1/2011	Original No. 3	10**	Bulbillo	Fitotrón	no
Mar-1/2011	Original No. 3	4**	Bulbillo	Invernadero	no
Mar-7/2011	Original No. 3	8**	Bulbillo	Invernadero	no
Mar-7/2011	Original No. 3	7**	Bulbillo	Invernadero	no
Mar-9/2011	Original No. 3	10**	Bulbillo	Invernadero	no
Mar-9/2011	Original No. 3	10**	Bulbillo	Invernadero	no

*: Evaluado en julio 7/2011. *1: Crecimiento por micropropagación, *2: Semilla; crecimiento por bulbillo; *3: F; Fitotrón; *4: I; invernadero. Inoculación con *Mizus persicae**. Inoculación con áfidos cuya especie no se identificó*.

Tabla 4. Inoculación de un corte de tejido enfermo en hoja de planta de fique sana

Fecha de inóculo	Origen del tejido	Plantas inoculadas	Síntoma
Julio-19/2011	Original No. 1	4	No
Julio-22/2011		5	No
Julio-22/2011	Original No. 4	5	Sí, 1 de 5
Agosto-5/2011	Original No. 3	10	no

Transmisión por semilla

De los 38 bulbillos utilizados para observar la transmisión del virus a las plantas incubadas en invernadero o en fitotrón, ninguna de las plantas mostró síntomas del virus.

Discusión

Para aclarar la transmisión del virus a través de extractos, tejido enfermo o por el uso de áfidos, en el presente estudio realizamos diferentes tipos de inoculaciones mecánicas. Sin embargo, después de varios meses de evaluación, los experimentos realizados no permitieron expresar los síntomas, probablemente porque el tiempo para la expresión de los síntomas no ha sido suficiente, o el inoculo viral de las muestras inoculadas ha sido a concentraciones bajas, o la temperatura fluctuante presentada en el invernadero o una temperatura muy baja en el fitotrón pudieron ser las causas de no obtener resultados positivos. Dabek y Castaño (1978) reportaron una tasa de transmisión mecánica que fue aumentada por una centrifugación diferencial con butanol. Este hallazgo indica que posiblemente la savia del fique contiene sustancias que podrían denaturar la capsida proteica del virus, inactivando así el virus., por tanto, conocer el modo de transmisión sería un factor clave para construir un manejo y el control de la enfermedad.



Figura 3. Planta de fique con mosaico y clorosis, por herida ocasionada con bisturí al inocular un fragmento de tejido infectado con síntomas del virus de la macana.

La enfermedad de la raya necrótica o macana del fique es prevalente en toda Colombia, causando pérdidas económicas y afectando la producción de fibra de calidad (Gálvez *et al.*, 1977; Dabek y Castaño, 1978). La incidencia de la enfermedad presenta una alta tasa aleatoria, por lo que el virus parece tener una alta transmisibilidad. Hasta el día de hoy, la literatura sugiere que el virus se transmite por los implementos de campo, tales como machetes y palas empleadas por los agricultores, sin embargo, algunos reportes dicen lo contrario.

Aunque la transmisión por áfidos del virus de la raya necrótica de *Furcraea* spp. ha sido reportada (Dabek y Castaño, 1978), no se conoce ningún vector para otros miembros del grupo de los Dianthovirus, si se habla de *Olpidium* spp. Sin embargo, los experimentos presentados aquí no mostraron resultados positivos para este tipo de transmisión. Esto puede deberse al tiempo corrido desde el momento de las inoculaciones, hasta la expresión de los síntomas lo cual pudo inactivar las partículas virales. De acuerdo con los datos y las propiedades del genoma del virus, Morales y colaboradores (1992) reportaron que el virus causal pertenece al grupo de los Dianthovirus. Los bulbillos obtenidos de plantas afectadas con el virus no presentaron

ningún síntoma ni en condiciones de invernadero ni en fitotrón, observaciones que indican parcialmente que la transmisión del virus por semilla puede no ocurrir. Por otra parte, algunas plantas producidas *in vitro* y sembradas en suelo de campos de fique mostraron síntomas de la raya necrótica 10 meses después de su siembra (Smith *et al.*, 2011). Esto indica la existencia de un vector altamente transmisible en el campo, por lo que se hace necesario realizar observaciones cuidadosas del cultivo y su confirmación mediante pruebas de transmisión de las mismas bajo condiciones de campo o con plantas modelo que permitan demostrar la transmisión del virus y la relación con el posible vector en condiciones controladas.

Referencias bibliográficas

1. Cadefique y MADR. 2006. *Guía ambiental del subsector fiquero*. Cadena productiva nacional del fique. Bogotá, D.C. 121 p.
2. Cepero de García, M.C. Beltrán, C.R. & Cotes, A.M. 2006. Detección de *Olpidium brassicae* en raíces de fique (*Furcraea* sp.), como posible vector del virus de la raya necrótica del fique. En: *Estudios micológicos para determinar la posible presencia del hongo O. brassicae en muestras de suelo procedentes de la rizósfera de plantas infectadas y no infectadas con el virus de la macana*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica). Documento interno.
3. Castaño, J.J. 1990. Observaciones sobre transmisión y manejo de la macana del Fique (*Furcraea* spp.). *Fitopatología Colombiana*. 14. Pp. 24-28.
4. Dabek, A.J. & Castaño, J.J. 1978. The occurrence, symptomatology, transmission and virus aetiology of macana disease of fique (*Furcraea* spp.) in Colombia. *Phytopathology*. 92. Pp. 57-69.
5. Gálvez, G.E. Castaño, M. Vesga, B. & Kitajima, E. 1977. Necrotic streak mosaic, a virus disease of cabuya (*Furcraea* spp.) in Colombia. *Plant Disease Report*. 61. Pp. 1017-1021.
6. Morales, F. Castaño, M. Calvert, L. & Arroyave, A. 1992. *Furcraea* Necrotic Streak Virus: An apparent new member of the Dianthovirus group. *Journal of Phytopathology*. 134. Pp. 247-254.
7. Osorio, D.L. 2010. Identificación molecular de aislamientos nativos de *Olpidium* spp. como posible vector del virus de la raya necrótica o macana del fique (*Furcraea* spp.). Tesis de Ingeniería Agronómica. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Programa de Ingeniería Agronómica. Universidad de Cundinamarca, sede Fusagasugá.
8. Rochon, D. Kakani, K. Robbins, M. & Reade, R. 2004. Molecular aspects of plant virus transmission by *Olpidium* and *Plasmodiophorid* vectors. *Annual Review of Phytopathology*. 42. Pp. 211-241.
9. Rochon, D. 2009. Fungal transmission of plant viruses. *Current Protocols in Microbiology*. 16B (12). Pp. 4.1-4.17.
10. Smith, A. Beltrán-Acosta, C. Mazabuel, C.A. Sastoque, L. & Cotes, A.M. 2011. *Evaluación de la eficacia de las rizobacterias seleccionadas para el control de O. virulentus en condiciones de campo*. Informe técnico final. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica. Mosquera, Cundinamarca.
11. Walsh, J.A. 1994. Effects of some biotic and abiotic factors on symptom expression of lettuce big-vein in lettuce (*Lactuca sativa*). *Journal of Horticultural Science*. 69(1). Pp. 21-28.

PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE PLÁNTULAS DE FIQUE PARA LA PRODUCCIÓN RÁPIDA Y MASIVA DE MATERIAL DE SIEMBRA

Patricia Martínez¹, Yolanda Torres¹ y Víctor Núñez^{1,2}

¹Laboratorio de Micropropagación Vegetal, Centro de Biotecnología y Bioindustria, CBB
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica

²Laboratorio de Genética Molecular Vegetal, CBB, Corpoica
vnuñez@corpoica.org.co

Introducción

El fique (*Furcraea* spp.) hace parte de un grupo de especies productoras de fibra importante para mercados nacionales e internacionales. Esta planta, además de la fibra, se caracteriza por el contenido de una serie de compuestos en los que se incluyen precursores de hormonas, corticoides, azúcares, ácidos grasos y biopesticidas (Martínez y Pacheco, 2006).

A pesar de su gran potencial económico, el fique, como cultivo, no cuenta con un proceso de mejoramiento genético de material de siembra. Esta situación se debe, posiblemente, primero al ciclo de vida tan largo, y segundo, a una forma muy limitada de reproducción sexual. Estos factores constituyen una gran limitante para la propagación masiva por métodos convencionales y para el proceso de producción de nuevos genotipos como variedades e híbridos.

Las plantaciones de fique se consiguen por propagación vegetativa, mediante la obtención de plántulas que se originan de bulbillos que aparecen como yemas axilares en las inflorescencias y a través de hijuelos que se producen en el tallo (Corpocauca, 2007). Esta forma de propagación es ampliamente utilizada de manera directa por los productores y aunque las plantas que se obtienen son idénticas a la madre, en el campo se observa una gran variabilidad en tamaño y vigor de las nuevas plantas.

Además, la producción de bulbillos e hijuelos por planta durante el año es muy ineficiente y la cantidad disponible no permite realizar una selección masiva que ayude a lograr una uniformidad aceptable. Otro problema relacionado con la propagación vegetativa utilizando bulbillos e hijuelos de manera tradicional es la transmisión de enfermedades a las nuevas plantas y la diseminación de esas enfermedades por los agricultores. Por medio de la propagación *in vitro*, comúnmente llamada micropropagación, es posible producir miles de plantas en pocos meses, partiendo de una sola planta madre (Robert *et al.*, 2006). Si la planta madre está libre de virus, todos sus clones estarán también libres de virus. Sin embargo, en casos en que la planta madre esté contaminada con virus, el cultivo *in vitro* ofrece la gran posibilidad de producir plantas libres de virus y de microorganismos dañinos. El propósito de este trabajo fue desarrollar una metodología de producción rápida de material de siembra para el agricultor, de tal manera que pueda contar con semilla de fique de alta calidad sanitaria, para contribuir con el establecimiento de cultivos altamente competitivos y sostenibles.

Materiales y métodos

Localización

El trabajo fue realizado en el Laboratorio de micropropagación de plantas del Centro de Biotecnología y Bioindustria de Corpoica.

Material vegetal

La calidad fitosanitaria, fisiológica y genética del material vegetal de inicio es esencial para garantizar el éxito del proceso de multiplicación. Se tomaron bulbillos e hijuelos libres del virus de la macana, de la variedad Uña de Águila proveniente de El Tambo (Nariño). Esta variedad es la más cultivada en las regiones productoras de fique y por tal motivo fue seleccionada para la producción de plantas *in vitro* en el laboratorio.

Desinfección de bulbillos

A los bulbillos seleccionados se les hizo un prelavado durante cinco minutos, en una solución de jabón y agua. Seguidamente se sumergieron en alcohol al 70% durante dos minutos e inmediatamente se transfirieron a una solución de hipoclorito de calcio al 5% durante 10 minutos y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Los bulbillos fueron pelados con un bisturí. La desinfección final se realizó en cabina de flujo laminar, sumergiendo los bulbillos en alcohol al 70% por un minuto; seguidamente se introdujeron en una solución de hipoclorito de calcio al 1% durante 10 minutos y se les aplicaron tres enjuagues en agua destilada estéril. Finalmente, el material se sumergió en alcohol al 70% por 20 segundos, luego en hipoclorito de calcio al 0,1% durante cinco minutos y se enjuagó tres veces con agua destilada estéril. Después del proceso de

desinfección, se eliminó todo el material de color verde, quedando los bulbillos de tres a cinco cm de largo y 1,5 cm de ancho.

Luego se realizaron cortes para eliminar la dominancia apical y se colocaron en el medio de cultivo a una temperatura promedio de 18°C con 16 horas luz, durante cinco semanas. En este tiempo se pasaron a medio de cultivo fresco, haciéndoles otro corte de dominancia apical con el fin de estimular el proceso de producción de varios brotes. Después de cinco semanas de la introducción se transfirieron a medio de multiplicación. Para este proceso se utilizaron contenedores o cubetas de 500 mL en las que se colocaron cinco bulbillos o hijuelos en cada uno de ellos.

Medios de cultivo

Se utilizó un medio compuesto por las sales minerales de Murashige y Skoog que incluyen macro y microelementos, suplementado con tiamina, quinetina, bencilaminopurina (BAP) y ácido indol acético (AIA), cisteína, inositol y sacarosa. Se utilizó Fitagel y se ajustó el pH a 5,7.

Enraizamiento

Se utilizó el mismo medio descrito anteriormente, con la adición de ácido 3-indolbutírico (IBA). Para esta fase se seleccionaron las plantas más grandes y una vez individualizadas se sembraron en el medio de enraizamiento. Para este proceso se utilizaron contenedores de 750 mL con cinco plántulas sembradas en cada uno de ellos. La buena calidad de las raíces de las plántulas *in vitro* pueden garantizar un buen estado de aclimatación y desarrollo en invernadero.

Endurecimiento

Las plantas que mostraron buen vigor después de cinco semanas de estar en el medio de enraizamiento, se sacaron de los contenedores, las raíces les fueron lavadas cuidadosamente, eliminando por completo todo el residuo del medio nutritivo en que estaban y llevadas a raíz desnuda. Las plantas se trasplantaron en bandejas con sustrato turba y mantenidas en invernadero para su aclimatación y luego trasplantadas a bolsas con suelo. Todo el proceso de invernadero se hizo manteniendo el riego, para que el suelo permaneciera a capacidad de campo.

Resultados y discusión

El fique como planta rústica que se adapta a varias condiciones de clima y suelo, responde de manera excelente al cultivo *in vitro*. Con la variedad Uña de Águila y bajo las condiciones de cultivo *in vitro* y de invernadero, se obtuvo una tasa

de multiplicación de dos a cuatro plántulas por cada bulbillo establecido. A partir de esta tasa de multiplicación inicial, cada planta se utilizó para continuar la multiplicación las veces requeridas, de acuerdo con el cronograma de producción y de demanda. Se demostró que en condiciones de laboratorio, partiendo de un bulbillo se pueden producir entre 100 a 120 plántulas en cuatro meses. Martínez y Pacheco (2006) desarrollaron un protocolo en *Furcraea*, en el que indican que logran plantas en invernadero a los ocho meses. Situación muy similar a lo observado en este trabajo. Los resultados de 100% de enraizamiento *in vitro* de las plantas multiplicadas en este trabajo y los de endurecimiento en invernadero del 100%, coinciden con los reportados por Martínez y Pacheco (2006), bajo la salvedad de que las condiciones en invernadero de este trabajo, respecto a sustratos y humedad relativa, fueron muy simples, lo cual facilita el proceso. Las plantas en invernadero, a diferencia de otras especies, no requieren de condiciones especiales de alta humedad relativa. Plantas con tamaño de 10-15 cm fueron entregadas en bolsas para llevarlas a sitio definitivo en campo. En este trabajo se partió de 200 bulbillos y se produjeron 3.000 plántulas *in vitro* en cuatro meses. El proceso total, incluyendo la fase de aclimatación y su desarrollo en invernadero, fue de ocho meses. El proceso de multiplicación *in vitro* se ilustra en la Figura 1, y el proceso de endurecimiento y desarrollo *ex vitro*, en la Figura 2.

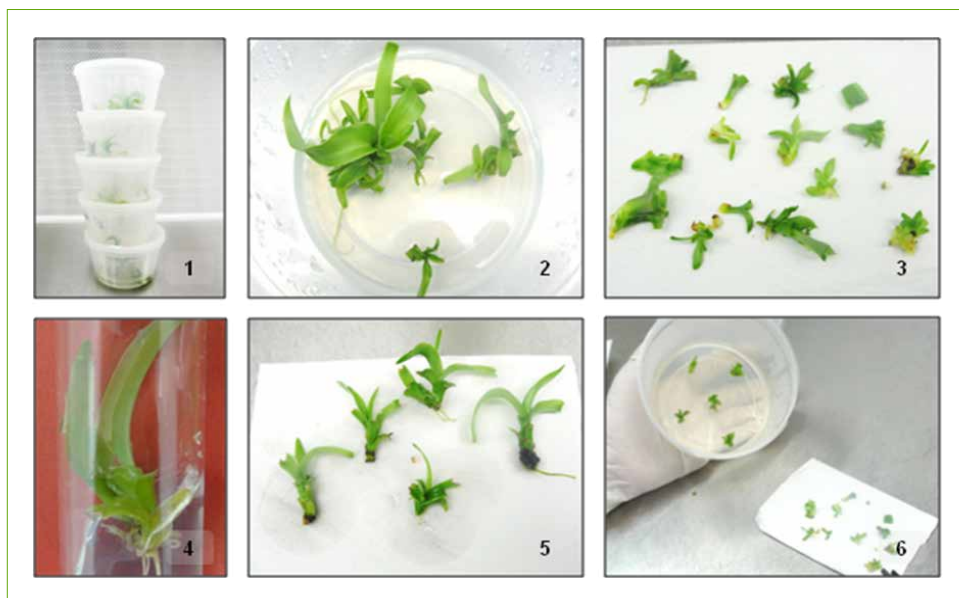


Figura 1. Proceso de multiplicación *in vitro* de plantas de fique. 1. Plantas introducidas y establecidas en condiciones *in vitro*; 2. Producción de brotes múltiples a partir de bulbillos establecidos; 3. Individualización de los brotes producidos; 4. Brote individualizado transferido a nuevo medio de cultivo para la multiplicación masiva y rápida; 5. Nueva individualización de brotes para su transferencia a medio de enraizamiento; 6. Planta en pleno crecimiento y enraizamiento.



Figura 2. Endurecimiento de plántulas de fique. 1. Plantas endurecidas en bandejas con turba; 2. Plantas completamente aclimatadas trasferidas a bolsas con suelo y listas para trasplantar en campo; 3. Plantas trasplantadas a sitio definitivo.

Conclusiones

La planta de fique es fácil y de rápida proliferación en condiciones *in vitro*; el endurecimiento y la aclimatación bajo condiciones de invernadero no son limitantes, puesto que la planta se adaptó bien y no requiere cuidados especiales en cuanto a la humedad relativa.

Referencias bibliográficas

1. Corporación para el desarrollo del Cauca (Corpocauca). 2007. *Alianza de los eslabones de la cadena productiva de fique para fortalecer el proyecto comunitario y empresarial del municipio de Guaitarilla en el departamento de Nariño*. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 135 pp.
2. Martínez, M. & Pacheco, J. 2006. Protocolo para la micropropagación de *Furcraea macrophylla* Baker. *Agronomía Colombiana*. 24. Pp. 207-213.
3. Robert, M. Herrera, J. Castillo, E. Ojeda, G. & Herrera, M. 2005. An efficient method for the micropropagation of agave species. *Methods in Molecular Biology*. 318. Pp. 165-178.

RIZOBACTERIAS CON ACTIVIDAD BIOCONTROLADORA DE *Olpidium virulentus*, COMO POSIBLE VECTOR DEL VIRUS DE LA MACANA DEL FIQUE (*Furcraea* spp.)

Alexander Smith¹, Camilo Beltrán-Acosta¹, Carlos Alberto Mazabuel²,
Leonardo Sastoque, y Alba Marina Cotes¹

¹Laboratorio de Control Biológico, Centro de Biotecnología y Bioindustria, CBB
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica

²Empaques del Cauca S.A.
amcotes@corpoica.org.co

La planta de fique (*Furcraea* spp.) es fuente de fibra natural (MADR, 2006), la cual se extrae de las hojas de la planta y de esta actividad de economía campesina depende su sustento económico un importante número de pequeños agricultores y familias, principalmente grupos étnicos indígenas del suroccidente de Colombia.

El cultivo de fique en Colombia se produce principalmente en los departamentos de Antioquia, Caldas, Cauca, Nariño y Santander. Entre los cuales, Nariño presenta la mayor superficie sembrada con más de 7.200 ha y como mayor productor Antioquia con más de 2.8 ton/ha anuales. El rendimiento anual nacional se calcula en 2.4 ton/ha y de fibra seca se calcula en 2 kg/planta/año (MADR, 2006; Cruz, 2008). Aunque existen plantaciones de fique en Ecuador, Venezuela y Costa Rica, Colombia es considerado el mayor productor.

Entre las principales limitantes fitosanitarias del cultivo Pérez (1963) reporta la incidencia de la enfermedad de la macana o rayadilla, la cual se presenta con necrosis y clorosis a lo largo del haz y el envés de la hoja. La sintomatología origina la ruptura de la fibra al momento de hacer la extracción, lo cual arroja pérdidas importantes para los agricultores.

No existen estudios sobre la epidemiología de la enfermedad, sin embargo, se estima que la incidencia en los cultivos del Cauca, principal productor de fique y

posible centro de origen de la macana, sea superior al 30%. En otros departamentos productores de la fibra como Antioquia, Cundinamarca y Santander, la incidencia de la macana es inferior al 5%. La enfermedad es de origen viral y el agente causal es probablemente un Dianthovirus de la familia Tombusviridae (Gálvez *et al.*, 1977; Morales *et al.*, 1992). Se desconoce el modo de transmisión del virus, sin embargo, asociado a los síntomas de la macana en plantas enfermas de fique se ha identificado el hongo *Olpidium virulentus* (Osorio, 2010), el cual está reportado como vector de virus en diferentes patosistemas (Castaño, 1990; Alfaro-Fernández *et al.*, 2010; Varanda *et al.*, 2011).

A partir de las diferentes investigaciones desarrolladas en Corpoica (Cepero de García *et al.*, 2006; Rada, 2009; Sastoque, 2009; Sastoque *et al.*, 2009), en este estudio se evaluó el efecto de las rizobacterias seleccionadas contra el potencial vector de la enfermedad *O. virulentus*.

Materiales y métodos

Cepas y medios de cultivo

Para este estudio, se utilizaron aislamientos bacterianos pertenecientes a *Pseudomonas* spp. (Ps) (16), *Bacillus* spp. (Be) (9), y actinomicetos (Ac) (6), previamente aislados de la rizósfera de plantas sanas de fique en cultivos comerciales del Cauca. Los microorganismos fueron crecidos en medio King B, caldo LB y agar avena, respectivamente, en condiciones estandarizadas de laboratorio.

Actividad biocontroladora

Control de *O. virulentus* bajo condiciones de invernadero: La evaluación de las rizobacterias contra *O. virulentus* se realizó en plantas de lechuga Batavia, variedad Colguard, utilizada como planta modelo por su ciclo de vida más corto que el de fique, siendo trasplantadas a materas plásticas de 500 g con una mezcla de suelo y turba en relación 10:1. Las raíces de plantas de lechuga se inocularon directamente con cada uno de los microorganismos antagonistas, a una concentración de 1×10^9 células.mL⁻¹. Las plantas fueron inoculadas con una cepa virulenta de *O. virulentus* a 1×10^5 esporas de resistencia.mL⁻¹ y se llevó a cabo en forma de inoculante líquido o sólido. Como testigo biológico se utilizó el bioplaguicida a base de *Trichoderma koningiopsis* Th003 la inoculación del bioplaguicida en polvo mojable (WP), desarrollado en el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria, CBB de Corpoica, y la aplicación de agua destilada estéril como testigo absoluto (Tabla 1). Cada experimento se replicó tres veces y se estableció bajo un diseño experimental completamente al azar.

Se evaluó la incidencia del posible vector en raíces y la severidad de la enfermedad en plantas de lechuga durante 60 días después del trasplante (ddt), mediante el uso de una escala de severidad de la enfermedad (Figura 1, Tabla 2).

Tabla 1. Descripción de tratamientos evaluados en plantas de lechuga bajo invernadero para el control de *O. virulentus*

No.	Tratamientos
1	Plantas de lechuga en suelo con <i>Olipidium virulentus</i> (Testigo patógeno).
2	Plantas de lechuga tratadas individualmente con cada una de las rizobacterias con posible actividad biocontroladora (31 rizobacterias) o <i>T. koningopsis</i> Th003.
3	Plantas de lechuga en sustrato sin ningún tipo de inoculación (Testigo absoluto).



Figura 1. Escala de severidad de la macana en plantas de lechuga.

Tabla 2. Escala de severidad del virus de la macana en plantas de lechuga, después de 90 días de evaluación

Nivel	Daño (%)	Síntomas
0	0	No hay presencia de síntomas
1	0 - 10%	Inicio de encrespamiento en hoja
2	10 - 25%	Leves
3	25 - 50%	Severos
4	50 - 70%	Muy severos
5	70 - 100%	Planta muerta

La incidencia de la enfermedad fue evaluada mediante la observación de esporas de resistencia de *O. virulentus* en las raíces de la planta, la biomasa vegetal, la formación de la cabeza de la lechuga y el aspecto de las hojas. Las rizobacterias seleccionadas con base en los resultados observados en lechuga, se evaluaron en nuevos experimentos con vitroplántulas de fique (libres de virus) del ecotipo Uña de Águila, previamente endurecidas (multiplicadas en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal del CBB) utilizando las mismas condiciones anteriormente descritas. Además, se evaluó el efecto de la concentración de rizobacterias seleccionadas (1×10^6 a 1×10^9 células.mL⁻¹) sobre la actividad biocontroladora del posible vector (Tabla 3). El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa estadístico Statistix 4. Las diferencias estadísticas para la incidencia y severidad se determinaron mediante el ANAVA y una prueba de LSD con un 95% de confianza.

Tabla 3. Descripción de tratamientos evaluados en plantas de fique, bajo condiciones de invernadero

Tratamiento	Dosis
Testigo patógeno	<i>O. virulentus</i> - 1×10^5 esporas de resistencia.mL ⁻¹ .
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Ps006	1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 y 1×10^9 células.mL ⁻¹ .
<i>Pseudomonas putida</i> Ps014	1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 y 1×10^9 células.mL ⁻¹ .
Th003 WP	<i>T. koningiopsis</i> - 1×10^6 conidios.mL ⁻¹ .
Ps006/Th003	Mezcla de Ps006 (1×10^7 células.mL ⁻¹) y Th003 (1×10^6 conidios.mL ⁻¹).
Ps014/Th003	Mezcla de Ps014 (1×10^7 células.mL ⁻¹) y Th003 (1×10^6 conidios.mL ⁻¹).
Ps006/Ps014	Mezcla de Ps006 y Ps014 - 1×10^7 células.mL ⁻¹ cada una.

Control de *O. virulentus* bajo condiciones de cultivo: Cinco parcelas experimentales se establecieron con plantas de fique en el corregimiento de Paniquita, Totoró (Cauca) (Septiembre de 2010). En cada una de las fincas se recolectó una muestra de suelo para el análisis físico-químico de macro y micronutrientes. De esta forma se incorporaron los elementos minerales necesarios para el cultivo, según las recomendaciones de fertilización. En la Tabla 4 se relacionan las fincas del experimento.

Microorganismos antagonistas

La rizobacteria seleccionada en la etapa de invernadero, con potencial biocontrolador, fue comparada en su eficacia con un producto químico y un testigo absoluto. En la Tabla 5 se describen los tratamientos evaluados.

Tabla 4. Descripción de las parcelas experimentales con plantas de fique en el municipio de Totoró (Cauca)

Finca	Ubicación parcela Paniquitá	Coordenadas geográficas	Altura (msnm)	Área (m ²)
La Granja	Vereda San Antonio,	2° 30.926' N 76° 28.023' O	2.263,44	1.272
Las Mercedes	Vereda San Antonio	2° 30.618' N 76° 27.751' O	2.229,91	1.300
Los Arrayanes	Vereda Hato Viejo	2° 33.225' N 76° 28.013' O	2.364,94	1.969
Las Delicias	Sector Las Delicias	2° 32.116' N 76° 27.794' O	2.247,29	1.300
El Guarandal	Sector El Guarandal	2° 32.175' N 76° 27.604' O	2.319,83	1.305

Tabla 5. Descripción de los tratamientos evaluados en campo para el control de *Olpidium virulentus*, posible vector del virus de la macana

No.	Tratamiento	Descripción de aplicación
1	<i>Trichoderma koningiopsis</i> Th003 WP	Aplicaciones en <i>drench</i> inmediatamente después del trasplante y 15, 30, 60 y 90 días después del trasplante. Se aplicaron 30 mL por planta aproximadamente, en concentración de 1×10^6 conidios.mL ⁻¹
2	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Ps006	Se aplicó en concentración de 1×10^7 células.mL ⁻¹ . Las frecuencias de aplicación fueron similares al tratamiento No. 1.
3	Mezcla: Th003 WP + Ps006	Frecuencias y concentraciones similares de aplicación, como en el tratamiento No. 1.
4	Testigo comercial: i.a. Benomilo WP	Dosis de 1 g.L ⁻¹ . Frecuencias similares de aplicación, como en el tratamiento No. 1.
5	Testigo absoluto	No se aplicó ningún producto para el control de <i>O. virulentus</i> .

Los microorganismos antagonistas: *P. fluorescens* Ps006, *T. koningiopsis* Th003 WP y el i.a. Benomilo al momento de la aplicación se diluyeron en agua corriente y se aplicaron con fumigadoras de espalda de cono hueco.

Los tratamientos se distribuyeron en un diseño de bloques completamente aleatorizados, donde el factor de bloqueo fue la pendiente del terreno (dado que la zona es altamente montañosa). El experimento se hizo con cinco repeticiones la unidad experimental consistió en surcos de 15 plantas de fique, sembradas a dos m de distancia entre plantas y 2,5 m entre surcos.

Evaluaciones

Después del establecimiento de las parcelas experimentales, periódicamente se efectuaron visitas para evaluar el desarrollo de las plantas de fique. Las evaluaciones incluyeron: registro de la incidencia de la enfermedad de la macana y promoción del crecimiento vegetal mediante el conteo del número de hojas en cada planta.

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa estadístico Statistix 4. Con los valores registrados de las variables evaluadas se calculó la desviación estándar. Diferencias estadísticas para la incidencia y severidad se determinaron mediante el ANAVA y el análisis de la LSD con un 95% de confianza.

Resultados y discusión

Control de *O. virulentus* en plantas de lechuga en condiciones de invernadero: 60 ddt, la incidencia del potencial vector fue determinada al observar las raíces de las plantas de cada tratamiento, mediante la presencia de zoosporangios y esporas de resistencia de *O. virulentus*, con base en la morfología de las estructuras bajo microscopio óptico. Entre las 597 muestras de raíces de lechuga analizadas para los 33 tratamientos, según el tipo de inóculo patogénico empleado, en un 44% se detectó la presencia de al menos una de las estructuras asociadas al vector. En todos los casos la incidencia de *O. virulentus* en las plantas del testigo patógeno fue del 100%.

En los tratamientos donde se aplicaron los seis aislamientos de los actinomicetos contra el inóculo patogénico líquido (extracto vegetal con esporas de resistencia de *O. virulentus*) se alcanzó una incidencia promedio entre el 77% - 88%. La incidencia se presentó entre 40% - 88% para las plantas inoculadas con los nueve aislamientos de *Bacillus*, 15% de incidencia para las inoculadas con *T. koningiopsis* Th003, y 10% - 60% para las plantas inoculadas con los aislamientos de *Pseudomonas*. De este grupo de rizobacterias, los aislamientos Ps002, Ps004, Ps005, Ps006, Ps012, Ps013 y Ps019, además de Th003, presentaron diferencias estadísticamente significativas, mostrando incidencias menores al 15%, comparado con el testigo patógeno (100%) (Figura 2).

En los tratamientos en los que se aplicó el inóculo patogénico sólido (suelo con esporas de resistencia de *O. virulentus*) y los aislamientos de los actinomicetos se alcanzó una incidencia promedio entre 33% - 66%, mientras que esta se presentó entre el 22% - 66% para las plantas inoculadas con los aislamientos de *Bacillus*, y el 10% para las inoculadas con *T. koningiopsis* Th003. Así mismo, la incidencia fue menor al 44% para las inoculadas con los aislamientos de *Pseudomonas*, destacándose los aislamientos Ps004, Ps005, Ps006, Ps012, Ps013, Ps019 y Th003, presentando diferencias estadísticamente significativas al expresar incidencias menores al 12%, comparadas con el testigo patógeno (Figura 3).

Cabe destacar que el tratamiento con *T. koningiopsis* Th003 y los realizados con las *Pseudomonas* spp. presentaron una incidencia menor de la enfermedad a lo largo del estudio, lo que podría indicar un positivo comportamiento en el ambiente de la raíz por parte de estos antagonistas (Figura 2 y 3).

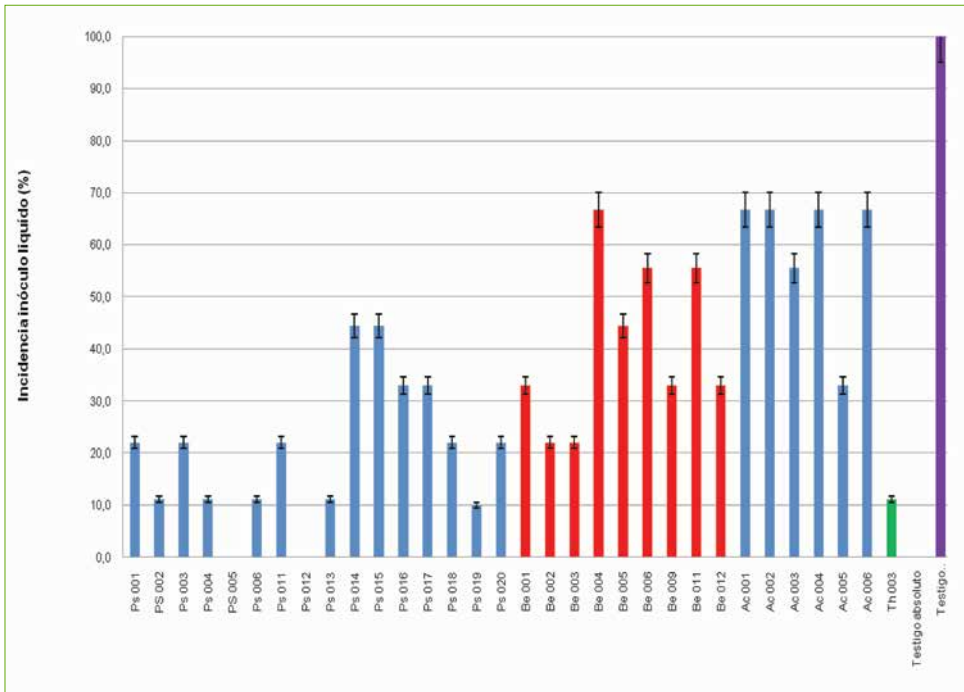


Figura 2. Incidencia observada para los 34 tratamientos evaluados con inóculo líquido de *O. virulentus* (extracto vegetal con esporas de resistencia). Las barras verticales indican la desviación estándar. Ps: *Pseudomonas* spp., Be: *Bacillus* spp., Ac: Actinomicetos.

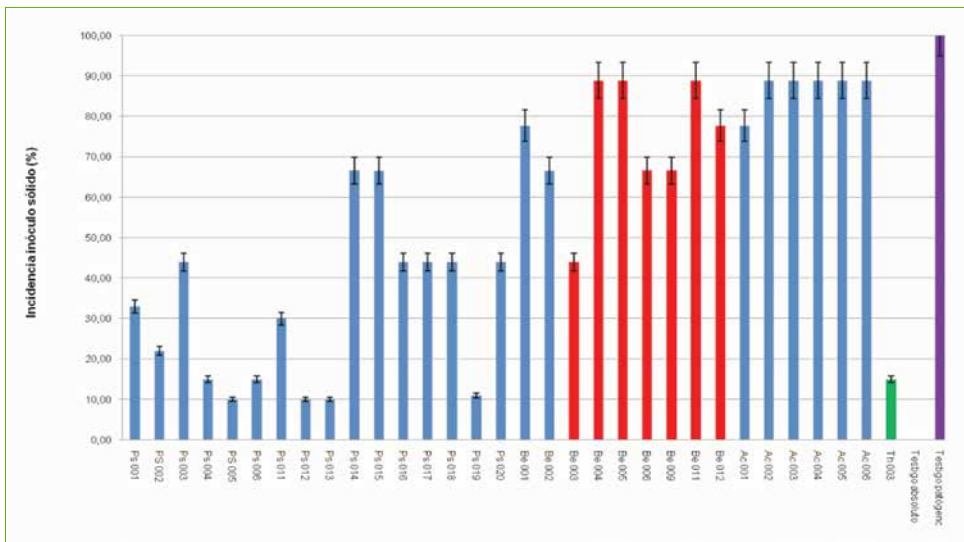


Figura 3. Incidencia observada para los 34 tratamientos evaluados con inóculo sólido de *O. virulentus* (suelo con esporas de resistencia). Las barras verticales indican la desviación estándar. Ps: *Pseudomonas* spp., Be: *Bacillus* spp., Ac: Actinomicetos.

El uso de la escala de severidad, construida a partir de plantas de lechuga como planta modelo, constituyó una herramienta útil al evaluar de forma más detallada la severidad de la enfermedad sobre los tratamientos aplicados.

En el testigo patógeno (60 ddt) se observó el grado 5 del índice de severidad (IS), el 100% de las hojas desarrollaron clorosis de las venas, siendo más notorio cerca de la base de las hojas. También se observó una reducción en el tamaño de la planta, un retraso en la formación de la cabeza de la lechuga y una pérdida de la turgencia de las hojas.

Aunque en todos los tratamientos con los antagonistas se evidenció en alguna medida la sintomatología típica de la enfermedad, esta fue alta en el testigo patógeno, en el que las raíces se observaron con una alta concentración de esporas de resistencia, de zoosporangios y una disminución significativa del volumen radical. Los daños observados consistieron en hojas marchitas, cloróticas y en encrespamiento anormal y leve de las mismas, malformación de las hojas, reducción del crecimiento de la planta de manera similar a lo obtenido por Cepero de García y colaboradores (2006) (Figura 4).



Figura 4. Plantas de lechuga inoculadas con *O. virulentus*. **A** y **B**. Plantas con síntomas iniciales de virosis, sembradas en suelos con esporas de *O. virulentus*, y **C**. Planta sembrada en suelo con un aislamiento virulento de *O. virulentus* y *Pseudomonas* spp.

En los tratamientos donde se aplicó el inóculo patógeno sólido y los aislamientos de actinomicetos se alcanzó un nivel de severidad entre 4 - 4,2 (daño entre 50% - 70%); para las plántulas inoculadas con los aislamientos de *Bacillus* se presentó un nivel de severidad entre 2,2 - 4,1; para *T. koningiopsis* Th003 se presentó un nivel de 1,2 (menor al 10% de daño) y para los tratamientos con los aislamientos de *Pseudomonas* se observó un índice entre el 1 - 3. Se seleccionaron los aislamientos Ps001, Ps002, Ps004, Ps005, Ps006, Ps011, Ps012, Ps013 y Ps019 de *Pseudomonas* spp. y Th003, presentando diferencias estadísticamente significativas y exponiendo un índice de severidad menor a 1,3, comparado con el testigo patógeno (IS de 4,8) (Figura 5).

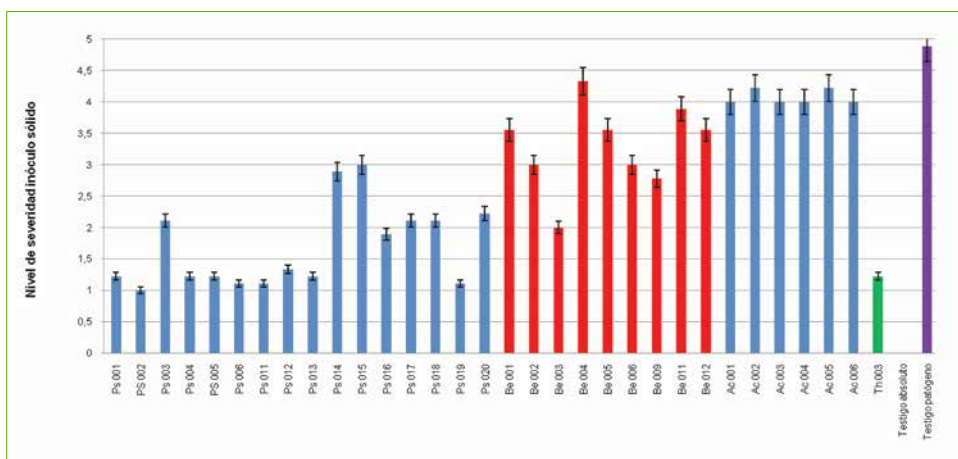


Figura 5. Índice de severidad de los 34 tratamientos evaluados con inóculo sólido de *O. virulentus*. Ps: *Pseudomonas* spp., Be: *Bacillus* spp. y Ac: Actinomicetos.

En los tratamientos que se empleó el inóculo patógeno líquido y los actinomicetos se alcanzó un índice de severidad entre 2-4,1 (50% - 70% de daño); para las plántulas inoculadas con cepas de *Bacillus* se observó un nivel de severidad entre el 2,2-4,1; para *T. koningiopsis* Th003 se registró un nivel de 1,2 (menor del 10% de daño), y para los aislamientos de *Pseudomonas*, un índice de severidad entre 0,5 y 3,2. Se destacaron los aislamientos Ps005, Ps006, Ps012 y Ps013, que presentaron diferencias estadísticamente significativas, mostrando un índice de severidad menor de 0,6, comparados con el testigo patógeno (IS de 4,7) (Figura 6).

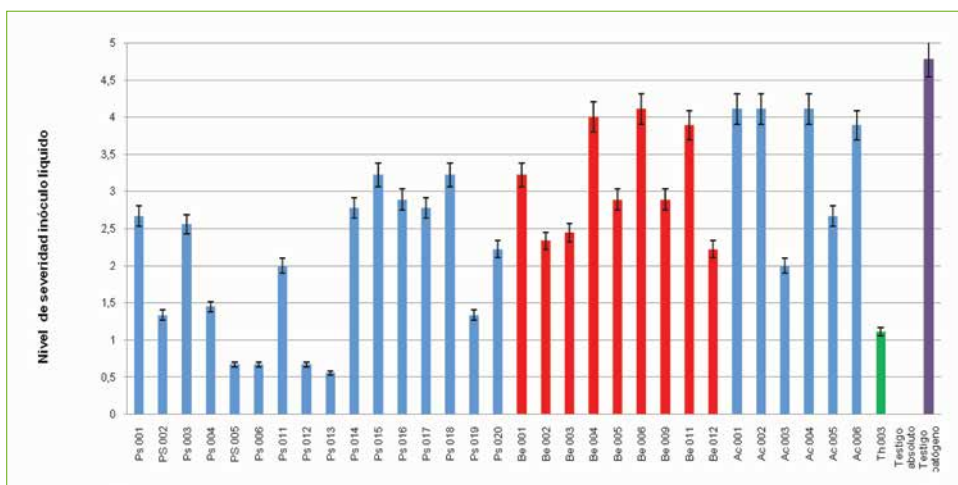


Figura 6. Índice de severidad de los 34 tratamientos evaluados con inóculo líquido de *O. virulentus*. Ps: *Pseudomonas* spp., Be: *Bacillus* spp. y Ac: Actinomicetos.

La inoculación con rizobacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* spp. y *T. koningiopsis* Th003 disminuyó la incidencia de la enfermedad, presentando sintomatologías poco severas con respecto al testigo patógeno. También se observó que el índice de severidad de la enfermedad se redujo con valores que oscilaron entre 1,2 - 1,3 por *Pseudomonas* spp. y *T. koningiopsis* Th003, en comparación con 4,8 para las plantas no tratadas. Los mejores aislamientos fueron Ps002, Ps004, Ps005, Ps006, Ps012, Ps013 y Ps019, que presentaron los síntomas más leves en las plantas (Figura 4). Los tratamientos con los aislamientos de *Bacillus* y actinomicetos presentaron un índice de severidad mayor a 2,2, ambos grupos de rizobacterias presentaron diferencias significativas con respecto al testigo patógeno.

Teniendo en cuenta los resultados encontrados por otros autores (Bailey *et al.*, 2006; Bashan y de Bashan, 2005; Marra *et al.*, 2006; Sette *et al.*, 2006; Woo *et al.*, 2006), *Pseudomonas* spp. y *Trichoderma* spp. tienen la capacidad de colonizar los tejidos de la planta, lo cual podría explicar los niveles de control obtenidos con estos microorganismos. Esta colonización puede traer numerosos beneficios a la planta (antibiosis, producción de metabolitos, competencia con otros organismos y mejoramiento de la estructura del suelo, entre otras). La planta en su zona rizosférica genera compuestos como azúcares y polisacáridos, aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos grasos, esteroides, factores de crecimiento, enzimas, flavonoides, auxinas, glucósidos y proteínas solubles, entre otros (Gregory, 2006), de los cuales las rizobacterias se pueden beneficiar en estados iniciales de crecimiento, por ser muchos de estas fuentes primarias de carbono. Este parece ser el caso de los aislamientos seleccionados en esta evaluación, de los cuales Ps004, Ps005, Ps006, Ps012, Ps013, Ps019 y Th003 fueron los más eficientes en la rizósfera de lechuga y tomate (Rada, 2009).

Control de *O. virulentus* en plantas de fíjico bajo condiciones de invernadero: Durante la evaluación de las plantas de fíjico hasta 90 ddt no se presentaron los síntomas característicos del virus de la macana (aparición de zonas cloróticas en las hojas de plantas infectadas y puntos necróticos estriados), aun en el testigo patógeno. Sin embargo, al evaluar algunas raíces de plantas de fíjico bajo microscopio se observaron esporas de resistencia del hongo vector, evidenciando su presencia en el suelo y por ende en la raíz. La ausencia de la sintomatología se puede atribuir a la ausencia del virus, a la latencia en el hongo vector o al corto tiempo para expresar síntomas en este material vegetal bajo las condiciones del estudio, así como a bajas concentraciones de inóculo del vector o a condiciones ambientales no favorables durante el ensayo para la expresión de los síntomas del virus.

De los tratamientos evaluados, solo la inoculación de Ps006, identificada metabólicamente y confirmada por análisis molecular como *P. fluorescens*

(Osorio, 2010), aplicada a una concentración de 1×10^7 células.mL⁻¹ favoreció e incrementó significativamente la longitud y ancho de las hojas, la biomasa seca de la parte aérea, al igual que el desarrollo en longitud y la biomasa seca de la raíz de las plantas de fique. Lo anterior se expresa como una relación positiva de Ps006 en la rizósfera de fique.

Estos resultados se ajustan a lo enunciado por Klopper y colaboradores (1989), que mencionaron que las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal como *P. fluorescens* se caracterizan por causar incremento en el desarrollo radical que repercute directamente en el rendimiento de los cultivos. Igualmente, los resultados observados podrían estar relacionados con la producción de fitohormonas, tales como el ácido indol acético (AIA) o derivados de AIA por parte de Ps006, ya que se ha reportado que la capacidad para promover el crecimiento por varias especies de *Pseudomonas* ha sido asociada con la producción de este compuesto (Patten y Glick, 2002). En investigaciones realizadas por Carlier y colaboradores (2008) se observó que la longitud radical de plantas de trigo inoculadas con *P. chlororaphis* fue significativamente mayor al testigo absoluto, con un incremento superior al 78%.

Por otra parte, la cepa Ps014, identificada como *P. putida*, no presentó resultados favorables al ser inoculada en diferentes concentraciones en plantas de fique, a pesar de haber presentado resultados favorables y significativos cuando se evaluó en plantas de lechuga y tomate, en las cuales presentó diferencias significativas en volumen y peso seco radical y en el desarrollo de la parte aérea, expresado en mayor altura y área foliar (Rada, 2009). Igualmente, Th003 aplicada sola y combinada en mezcla junto con Ps006 y Ps014, respectivamente, no presentó ventaja en el desarrollo de la planta crecida en suelo inoculado con *O. virulentus*. En etapas previas, se evaluó el efecto de promoción de crecimiento de *T. koningiopsis* Th003 en vitroplántulas de fique (etapa de endurecimiento), aplicado como conidios frescos en suelos libres de inóculo de *O. virulentus*, en las que se obtuvo como resultado el incremento en 28% del peso seco de la plántula y un aumento en la longitud radical y foliar del 7,1% y 26,2%, respectivamente, comparado con el testigo absoluto.

Los resultados sugieren que las rizobacterias aisladas fueron capaces de controlar la infección causada por *O. virulentus* en las plantas de fique. Basándose en los resultados, *P. fluorescens* Ps006 fue seleccionado para estudios posteriores. En la plantas de fique no se presentaron los síntomas típicos del virus de la macana. Sin embargo, cuando se evaluaron las raíces de las plantas, se observaron esporas de resistencia de *O. virulentus*. La ausencia de síntomas puede atribuirse a la ausencia de virus, al tiempo de latencia larga en el vector (esporas de resistencia) o a tiempos de larga incubación. La búsqueda de fuentes de control constituye una alternativa de gran importancia dentro del manejo del cultivo de fique.

Control de *O. virulentus* en condiciones de campo: Los primeros síntomas del virus de la macana en las plantas de fique aparecieron 260 ddt. Los síntomas más notorios se presentaron en la finca Los Arrayanes (Figura 7). Sin embargo, los valores promedio de incidencia de la enfermedad registrados a los 260 y 350 ddt fueron inferiores al 4%. Hubo mayor incidencia en el testigo absoluto (3,5%) con respecto al tratamiento con la mezcla de bioplaguicidas (*P. fluorescens* Ps006 + *T. koningiopsis* Th003 WP) de 1,6%, lo cual confirma el lento desarrollo en la expresión de los síntomas típicos del virus de la macana y un potencial de los microorganismos antagonistas aplicados.

Contrario a lo reportado por Pérez (1963), quien indica que la enfermedad de la macana afecta las plantas de fique desde los estados de bulbillo, hijuelo o planta trasplantada, la expresión de los síntomas de la macana se dio a 260 ddt. Dado que las cinco parcelas experimentales se ubicaron en zonas con alta incidencia de macana, el atraso en la aparición de los síntomas y el bajo valor de la incidencia de la macana pudo estar relacionado con el material vegetal sembrado, dado que consistió en plantas multiplicadas *in vitro* libres de virus.

Aunque pocos estudios en Colombia reportan la enfermedad de la macana como de origen viral (Gálvez *et al.*, 1977; Morales *et al.*, 1992), se desconocen los



Figura 7. Síntomas detectados del virus de la macana en plantas de fique en condiciones de cultivo. **A.** Planta sana; **B.** Planta con síntomas de macana; **C** y **D.** Síntomas de macana en el haz y el envés de las hojas.

mecanismos de transmisión de la enfermedad y los períodos de incubación y latencia del virus, ante lo cual es necesario adelantar estudios del mecanismo de transmisión de la enfermedad, bajo condiciones artificiales, y la caracterización molecular del virus.

Los microorganismos incluidos en los productos aplicados no indujeron un efecto promotor en el crecimiento vegetal de las plantas de fique. Durante los periodos evaluados (hasta 350 ddt), el número promedio de hojas (6) entre los tratamientos mantuvo un comportamiento similar. Sin embargo, en condiciones de semillero sí se logró un efecto relevante sobre el crecimiento de las plántulas (Rada, 2009; Rada *et al.*, 2009). Esto es coherente con lo reportado por varios autores, quienes han demostrado que el efecto promotor de crecimiento por rizobacterias se expresa principalmente en etapas tempranas de desarrollo vegetal y también hay mayor efecto bajo condiciones controladas, como en invernadero (Adesemoye y Kloepper, 2009; Adesemoye *et al.*, 2009; Krishna *et al.*, 2009).

En la zona del estudio se encontraron otras enfermedades en la planta de fique, como la antracnosis (*Colletotrichum agaves*), la pudrición negra basal de la hoja (*Leptosphaeria* spp.), el mal rosado (*Corticium salmonicolor*), la quemazón de las puntas de las hojas (*Verticillium* sp. y *Fusarium* sp.), la gotera (*Leptosphaeria* spp.), y la viruela, la viruela amarilla o verrugosis (de etiología posiblemente viral).

Teniendo en cuenta el nivel de daño de las enfermedades presentadas, es necesario efectuar estudios epidemiológicos en las principales zonas figueras del país.

Adicionalmente, es posible observar plantas de diferentes ecotipos de fique en diferentes municipios de Antioquia, Cundinamarca y Santander con síntomas típicos del virus de la macana y de otras enfermedades de tipo viral, por lo tanto presenta susceptibilidad a diferentes enfermedades. Se concluye que el seguimiento de los experimentos en campo relacionados con la macana se debe llevar a cabo durante mayor tiempo, con el fin de verificar el progreso en el desarrollo de síntomas típicos de la enfermedad. El potencial de aprovechamiento del cultivo del fique dependerá del desarrollo de investigaciones innovadoras que establezcan el real valor económico para los pequeños agricultores al optimizar su siembra y beneficio.

Referencias bibliográficas

1. Adesemoye, A.O. & Kloepper, J.W. 2009. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85. Pp. 1-12.
2. Adesemoye, A.O. Torbert, H.A. & Kloepper, J.W. 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microbial Ecology*. 58. Pp. 921-929.

3. Alfaro-Fernández, A. Córdoba-Selles, M.C. Herrera-Vásquez, J.A. Cebrián, M.C. & Jordá, C. 2010. Transmission of Pepino Mosaic Virus by the fungal vector *Olpidium virulentus*. *Journal of Phytopathology*. 158. Pp. 217-226.
4. Bailey, B.A. Bae, H. Strem, M.D. Roberts, D.P. Thomas, S.E.; Crozier, J. Samuels, G.J. Choi, I.Y. & Holmes, K.A. 2006. Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. *Planta*. 224. Pp. 1149-1164.
5. Bashan, Y. & de Bashan, L.E. 2005. Fresh-weight measurements of roots provide inaccurate estimates of the effects of plant growth-promoting bacteria on root growth: a critical amination. *Soil Biology and Biochemistry*. 37. Pp. 1795-1804.
6. Carlier, E. Rovera, M. Rossi, A. & Rosas, S. 2008. Improvement of growth, under field conditions, of wheat inoculated with *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *Aurantiaca* SR1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24. Pp. 2653-2658.
7. Castaño, J.J. 1990. Observaciones sobre transmisión y manejo de la macana del fique (*Furcraea* spp.). *Fitopatología Colombiana*. 14. Pp. 24-28.
8. Cepero de García, M.C. Beltrán, C.R. & Cotes, A.M. 2006. Detección de *Olpidium brassicae* en raíces de fique (*Furcraea* sp.), como posible vector del virus de la raya necrótica del fique. En: *Estudios micológicos para determinar la posible presencia del hongo O. brassicae en muestras de suelo procedentes de la rizosfera de plantas infectadas y no infectadas con el virus de la macana*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica. Documento interno.
9. Gálvez, G. Castaño, M. Vesga, B. & Kitajima, W. 1977. Necrotic Streak Mosaic, a virus disease of cabuya (*Furcraea* spp.) in Colombia. *Plant Disease Reporter*. 61 (12). Pp. 1017-1021.
10. Gregory, P. 2006. *Plant roots growth, activity and interactions with soils*. Blackwell publishing. 318 p.
11. Kloepper, J.W. Lifshitz, R. & Zablotowicz, R.M. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnology*. 7. Pp. 39-43.
12. Kumar, K.V.K. Raju, S.K. Reddy, M.S. Kloepper, J.W. Lawrence K.S. Groth, D.E. Miller, M.E. Sudini, H. & Du, B. 2009. Evaluation of commercially available PGPR for control of rice sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 3. Pp. 485-488.
13. MADR. 2006. *Guía ambiental del subsector fiquero*. Segunda edición. Bogotá, Colombia: Panamericana formas e impresos. 122 p.
14. Marra, R. Ambrosino, P. Carbone, V. Vinale, F. Woo, S.L. Ruocco, M. Ciliento, R. Lanzuise, S. Ferraioli, S. Soriente, I. Gigante, S. Turra, D. Fogliano, V. Scala, F. & Lorito, M. 2006. Study of the three-way interaction between *Trichoderma atroviride*, plant and fungal pathogens by using a proteomic approach. *Current Genetics*. 50. Pp. 307-321.
15. Morales, F. Castaño, M. Calvert, L. & Arroyave, J.A. 1992. *Furcraea* Necrotic Streak Virus: An apparent new member of the Dianthovirus group. *Journal Phytopathology*. 134. Pp. 247-254.
16. Osorio, D. 2010. *Identificación molecular de aislamientos nativos de Olpidium spp. como posible vector del virus de la raya necrótica o macana del fique (Furcraea spp.)*. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Programa de Ingeniería Agronómica. Universidad de Cundinamarca. Fusagasugá. Pp. 15-30.
17. Patten, Ch. & Bernard, G. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (8). Pp. 3795 - 3801.
18. Pérez, J. 1963. *El fique, su taxonomía, cultivo y tecnología*. Editorial Colina. 127 p.

19. Rada, L. 2009. *Selección de Pseudomonas spp. aisladas de la rizósfera de fique (Furcraea sp.) por su potencial en la promoción de crecimiento de diferentes especies*. Trabajo de grado de microbiología industrial. Facultad de Ciencias Básicas. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 122 p.
20. Rada, L. Sastoque, L. & Cotes, A.M. 2009. *Selección de Pseudomonas spp. aisladas de la rizósfera de fique (Furcraea sp.) por su potencial en la promoción del crecimiento de diferentes especies vegetales*. Memorias XXIX Congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines, Ascolfi. Medellín, Colombia. Junio 2-4 de 2009.
21. Ruiz, J.C. 2011. *Caracterización de un principio activo a base de Pseudomonas fluorescens Ps006 y estudio de su compatibilidad con soportes sólidos*. Trabajo de grado de microbiología industrial. Facultad de Ciencias Básicas. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 57 p.
22. Sette, L.D. Passarini, M. Delarmelina, C. Salati, F. & Duarte, M. 2006. Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22. Pp. 1185-1195.
23. Varanda, C.M. Silva, M.S. Félix, M.R. & Clara, M.I. 2011. Evidence of olive mild mosaic virus transmission by *Olpidium brassicae*. *European Journal Plant Pathology*. 130. Pp. 165-172.
24. Woo, S.L. Scala, F. Ruocco, M. & Lorito, M. 2006. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi and plants. *Phytopathology*. 96. Pp. 181-185.

DISEÑO Y VALIDACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN POR FERMENTACIÓN DE BIOMASA DE *Pseudomonas fluorescens* Ps006

Andrés Díaz¹, Johan Sáenz¹ y Alba Marina Cotes¹

¹Laboratorio de Control Biológico, Centro de Biotecnología y Bioindustria, CBB
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica
adiaz@corpoica.org.co

Introducción

El diseño de un bioproceso para la producción a escala laboratorio de biomasa de cualquier microorganismo implica el conocimiento previo del proceso en sí (condiciones típicas de fermentación tales como temperatura, pH, agitación, aireación y condiciones nutricionales tales como concentraciones de fuentes de carbono, nitrógeno, sales, inductores de crecimiento, etc.) y de la experticia y la experiencia del personal involucrado en este tipo de desarrollos. A medida que se cuenta con mayor información de calidad se minimiza el tiempo y el esfuerzo (logístico, de personal y de tiempo) requerido para alcanzar el objetivo de producción. Este último está relacionado directamente con los requerimientos o condiciones de las operaciones unitarias “aguas abajo” del proceso de fermentación, que incluyen procesos de separación, concentración, purificación y formulación de la biomasa.

En el presente proyecto se llevó a cabo el diseño, estandarización y validación del proceso de producción masiva de *Pseudomonas fluorescens* Ps006 que demostró en ensayos previos un elevado potencial para el control del agente causal de la raya necrótica del fique e inductor de crecimiento vegetal. En función de los lineamientos mencionados anteriormente, se planteó una estrategia secuencial de diseño de experimentos clásico para la determinación de las condiciones nutricionales y fisicoquímicas adecuadas para la producción de biomasa de este

microorganismo. Esto implicó el montaje secuencial de experimentos a nivel de laboratorio y su respectivo análisis estadístico con fundamentos biológicos para dilucidar la dirección correcta.

Selección de la estrategia experimental

Para llevar a cabo el diseño de un medio de cultivo para el crecimiento de un microorganismo específico existen varias estrategias que han sido ampliamente usadas:

1. Intercambio de componentes: en la que se evalúan diferentes componentes del medio (fuentes de carbono, nitrógeno, sales, etc.), una a la vez. Es una técnica sencilla pero poco eficiente que implica un número muy grande de experimentos y consume mucho tiempo y mano de obra; además, no permite dilucidar las interacciones entre los diferentes componentes.

2. Un factor a la vez: es similar a la técnica anterior pero en este caso se evalúan diferentes niveles o concentraciones de cada componente del medio; esto implica un conocimiento previo del proceso, para llegar a determinar un número reducido de componentes a evaluar. Presenta los mismos problemas asociados con la estrategia de intercambio de componentes, pero aún sigue siendo aplicada en algunos casos.

3. Búsqueda en la literatura: en la que se hace una búsqueda retrospectiva acerca de bioprocesos similares y se "toma prestado" un medio de cultivo base que ya ha demostrado altos rendimientos o productividades del microorganismo en cuestión. Es una de las estrategias más usadas debido a su facilidad, pero no siempre se alcanza reproducibilidad de condiciones experimentales o resultados experimentales.

4. Mimetismo biológico: en esta se calculan o cuantifican las necesidades nutricionales del microorganismo, haciendo uso de la composición elemental de la biomasa y de los diferentes componentes del medio de cultivo. Aunque es una estrategia rigurosa, depende de la disponibilidad de información confiable acerca de la composición del microorganismo y las materias primas, que no es lo usual; adicionalmente, el hecho de realizar el balance por componentes no asegura que se obtenga el resultado deseado o predicho.

5. Diseño de experimentos: se define como el proceso de planear todos los pasos que deben darse y el orden que debe seguirse en la recolección y posterior análisis de la información requerida para estudiar un problema de investigación. Esta, más que una estrategia, es una herramienta que se puede implementar en combinación con cualquiera de las estrategias mencionadas anteriormente. Permite lograr la mayor cantidad de información de alta calidad

de manera muy eficiente y con economía de tiempo, dinero, mano de obra e infraestructura.

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente y en función de la experiencia previa y la experticia del personal de investigación del área de Fermentaciones del Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria, CBB, de Corpoica, se tomó la decisión de aplicar la estrategia del mimetismo biológico en combinación con las herramientas del diseño de experimentos y el uso de un componente del medio de cultivo base tomado de la literatura para diseñar un medio de cultivo para la cepa evaluada (Tabla 1).

La composición de la biomasa usada fue $CH_{1.79}O_{0.52}N_{0.22}$ (Durner *et al.*, 2000).

Se evaluó una fuente de carbono que ha sido ampliamente reportada para la producción de biomasa de rizobacterias y que no presenta interferencias en las operaciones unitarias “aguas abajo” o posteriores al proceso de fermentación.

También se evaluó una fuente de nitrógeno orgánico y una fuente de nitrógeno inorgánico, dado que se ha demostrado que el género *Pseudomonas* sp. requiere de estas dos fuentes de nitrógeno para activar sus procesos metabólicos orientados hacia la producción de biomasa (Durner *et al.*, 2000).

Tabla 1. Estrategia global aplicada para el diseño del proceso de producción de biomasa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006

Etapa	Objetivo	Descripción	Escala de aplicación	Diseño experimental aplicado
Exploratoria (screening)	Identificar los factores nutricionales importantes	Muchos factores Zona experimental desconocida	Microplaca de 96 pozos de 400 μ L	Factorial completo
Estandarización y optimización	Construir un modelo predictivo	Pocos factores Zona experimental rodeando el óptimo	Erlenmeyer de 125 mL	Factorial completo
Validación a pequeña escala	Confirmar los resultados de las condiciones nutricionales	Solo factores clave Región óptima	Erlenmeyer de 500 mL	No aplica*
Validación a escala de biorreactor	Confirmar los resultados evaluando condiciones fisicoquímicas estándar	Solo factores clave Punto óptimo	Biorreactor Airlift de 20 L	No aplica*

* En estas etapas se evalúa la reproducibilidad de los valores obtenidos con los mejores tratamientos de las etapas previas.

Etapa 1: Ensayo exploratorio en microplaca de 400 μ L

Para el diseño experimental se seleccionó un diseño factorial completo con tres niveles y un punto central más un control sin adición de sales (Tabla 2). La

experimentación se llevó a cabo en microplacas de 96 pozos con un volumen nominal de 400 µL y un volumen de trabajo de 250 µL.

Utilizando la fórmula elemental de *Pseudomonas* sp. ($C_1H_{1,793}O_{0,522}N_{0,227}$), se calculó la cantidad necesaria de carbono y nitrógeno para producir 2 g/L de biomasa, lo que se consideró como el nivel cero para el diseño experimental y a partir del cual se determinaron los niveles superior (+50%) e inferior (-50%). La composición de la solución Stock de sales se tomó de Aboseaud y colaboradores (2006), ya que este autor la utilizó para optimizar la composición de un medio de cultivo para la producción de *Pseudomonas fluorescens*.

Tabla 2. Matriz de niveles usada en la evaluación del crecimiento del aislamiento de *Pseudomonas fluorescens* Ps006 en microfermentación

Nivel	Carbono (g/L)	Nitrógeno orgánico (g/L)	Nitrógeno inorgánico (g/L)	Stock de sales
-1	1,72	0,85	0,90	1X
0	3,44	1,69	1,80	
1	5,16	2,54	2,7	

Se prepararon 20 mL de una solución 10X de cada una de las concentraciones de la fuente de carbono, nitrógeno y sales listadas previamente con agua destilada; las soluciones fueron esterilizadas bajo condiciones estándar. Simultáneamente se preparó un inóculo del aislamiento de *P. fluorescens* Ps006 a una concentración de 1×10^7 UFC/mL, en solución salina al 0,85%.

El montaje de la microplaca se realizó en una cabina de flujo laminar, mezclando cada uno de los componentes en las diferentes concentraciones establecidas como niveles, para así obtener 10 tratamientos (Tabla 3). Para esto se mezclaron 25 µL de cada una de las soluciones de nutrientes preparadas (carbono, nitrógeno y sales) con 100 µL de agua destilada estéril. Finalmente se inocularon los pozos con 50 µL de la suspensión de la bacteria.

Adicionalmente a los 10 tratamientos mostrados en la Tabla 3, se ubicaron dos controles en la microplaca, uno que correspondía al tratamiento nueve sin inocular (por lo que se completó con 50 µL más de agua) y otro únicamente con agua destilada estéril. Se ubicó el tratamiento 10 en la placa con la finalidad de observar el efecto que tenía la ausencia de la solución de sales en la microfermentación. La placa se llevó a una agitación a 150 rpm durante 15 min y se tomó el tiempo cero expresado como absorbancia en un lector Asys Hitech Expert 93 a 405 nm y a 620 nm. Finalmente, la placa fue incubada a 30°C x 150 rpm y se realizó el monitoreo de la absorbancia cada 12 horas. Los tratamientos se ubicaron en bloques aleatorios sin usar los pozos del borde de la placa.

Tabla 3. Tratamientos evaluados para el aislamiento de *Pseudomonas fluorescens* Ps006 en microfermentación

Tratamiento	Carbono	Nitrógeno orgánico	Nitrógeno inorgánico
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	SSS*	SSS	SSS

*Nivel cero sin la solución stock de sales.

Se seleccionó una longitud de onda de 620 nm para la lectura de absorbancia, ya que permitió una lectura con más resolución (valores inferiores a 1,0) a través de todo el proceso de fermentación, durante las 48 horas evaluadas. Adicionalmente, se usaron los resultados experimentales de la hora 36, ya que presentaron el máximo para todos los tratamientos con los coeficientes de variación más bajos (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados de absorbancia a 620 nm para el aislamiento de *Pseudomonas fluorescens* Ps006 evaluado en microfermentación

Ps006 (36 h)				Ps006 (36 h)			
Tratamiento	Absorbancia promedio	S	%CV	Tratamiento	Absorbancia promedio	S	%CV
1	0,754	0,019	2,519	8	1,337	0,039	2,898
2	0,765	0,044	5,745	9	1,117	0,029	2,599
3	1,267	0,021	1,679	10	0,972	0,110	11,361
4	1,247	0,015	1,192	11	0,064	0,006	9,785
5	0,887	0,044	4,947	12	0,043	0,007	17,237
6	0,720	0,071	9,832	13	0,040	0,001	2,532
7	1,356	0,031	2,255	--	--	--	--

El crecimiento del aislamiento Ps006 fue rápido, porque después de 16 horas, en algunos de los tratamientos, la lectura de la absorbancia (A_{620nm}) fue mayor a uno. Los tratamientos que incluían el nivel alto del extracto de levadura fueron los que presentaron una absorbancia más alta desde el inicio de la microfermentación.

El análisis de varianza indicó que la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno orgánica fueron los factores estadísticamente significativos, de lo que se puede deducir que tienen el mayor efecto sobre la variable de respuesta absorbancia. La relación nitrógeno orgánico – inorgánico no presentó influencia significativa.

En el diagrama de Pareto (Figura 1) se observó más claramente cuáles fueron los factores que tuvieron incidencia sobre la variable respuesta. La fuente de nitrógeno orgánica (Factor B) fue el componente que más incidencia tuvo sobre la absorbancia, seguido, en menor proporción, por la fuente de carbono (Factor A). Los demás factores y sus correspondientes interacciones (combinaciones) no presentaron un efecto significativo sobre la variable respuesta para este aislamiento.

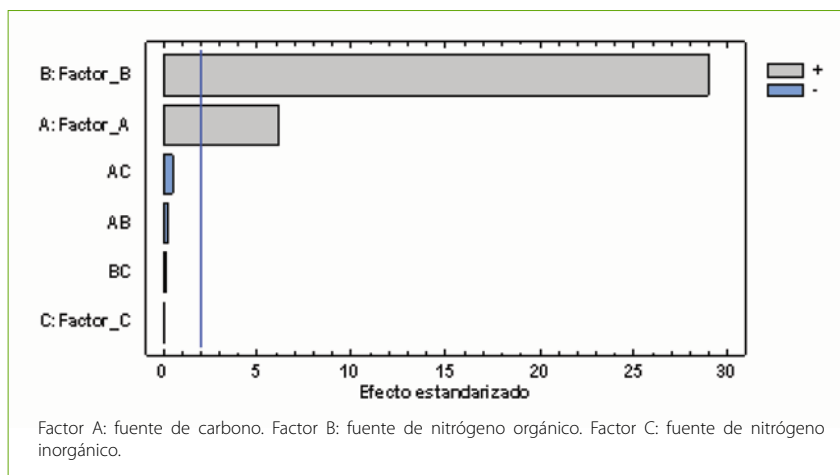


Figura 1. Diagrama de Pareto para el aislamiento de *Pseudomonas fluorescens* Ps006 en microfermentación.

Como se observa en la gráfica de cubo (Figura 2) la mayor respuesta de absorbancia se encuentra en el extremo inferior derecho ($A_{620nm} = 1.23314$) de la figura equivalente a la combinación de fuente de carbono alta, fuente de nitrógeno orgánico alta y fuente de nitrógeno inorgánico baja, por tanto, ya se tiene la evidencia experimental acerca de los niveles de nutrientes a utilizar en la etapa de estandarización en Erlenmeyer.

Dado que se aplicó un diseño experimental robusto de resolución IV, se logró la obtención de un modelo lineal con interacciones (Ecuación 1).

$$\text{Absorbancia} = 0,9459 + 0,0493A + 0,2340B - 0,0005C - 0,0021AB - 0,0041AC - 0,0015BC \quad (1)$$

$$R^2 = 97,12\%$$

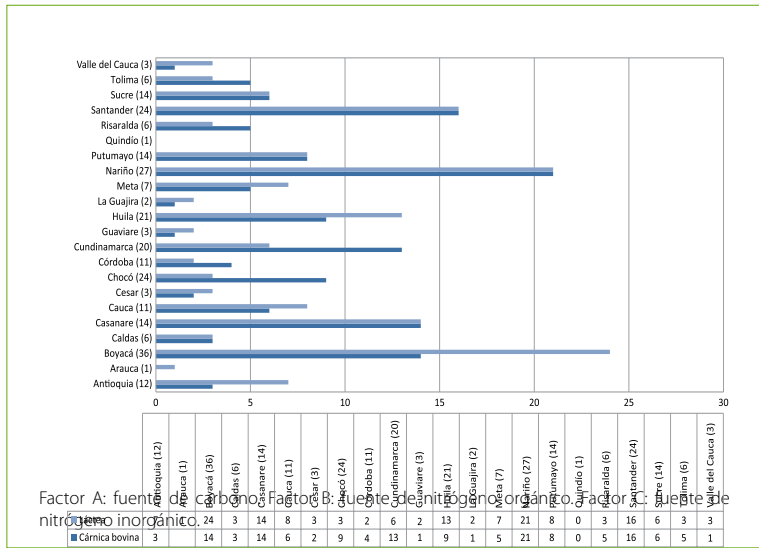


Figura 2. Gráfica de cubo para el aislamiento de *Pseudomonas fluorescens* Ps006 en microfermentación.

El grado de ajuste del modelo teórico generado fue bueno, ya que explicó el 97,12% de la variabilidad presentada en el experimento.

En conclusión, se determinó que la fuente de nitrógeno orgánico presentó el mayor efecto positivo sobre el crecimiento de *P. fluorescens* Ps006 en microplaca (expresado como absorbancia) y, por tanto, se evaluarán concentraciones más altas a nivel de Erlenmeyer de 125 mL. De forma similar, aunque el efecto no fue tan grande en magnitud, se evaluarán concentraciones más altas de la fuente de carbono a nivel de Erlenmeyer de 125 mL. La fuente de nitrógeno inorgánico se utilizará en adelante como parámetro en su concentración más baja, manteniendo constante su relación con la fuente de nitrógeno orgánico. El stock de sales también se usará como parámetro a partir de la experimentación en Erlenmeyer de 125 mL.

Con la información obtenida en el montaje anterior se propuso un nuevo diseño experimental en Erlenmeyer de 125 mL con un volumen de trabajo de 25 mL.

Etapa 2: Ensayo exploratorio en Erlenmeyer de 125 mL

Con la información obtenida en el montaje en microplaca se aplicó un nuevo diseño experimental factorial completo con dos factores y dos niveles con punto central, en Erlenmeyer de 125 mL con un volumen de trabajo de 25 mL (Tabla 5), con el fin de tener una primera aproximación acerca del rango de trabajo ideal para los componentes nutricionales críticos, en este caso la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno orgánico.

Tabla 5. Matriz de niveles usada para la fermentación de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006 en Erlenmeyer de 125 mL

Nivel	Factor A (FC) (g/L)	Factor B	
		(FNO) (g/L)	(FNI)(g/L)
-1	5,16	2,54	0,9
0	10,32	5,08	1,8
1	15,48	7,62	2,7

Se prepararon 20 mL de una solución 10X de cada una de las concentraciones de las fuentes de carbono y nitrógeno orgánico e inorgánico listadas en la Tabla 1 con agua destilada, adicionalmente se preparó una solución de diferentes sales y las soluciones fueron esterilizadas bajo condiciones estándar. Igualmente se realizó un inóculo de 1×10^7 UFC/mL en Tween al 0,5%, a partir de una caja crecida durante 48 h.

Cada Erlenmeyer contenía 25 mL como resultado de la adición de 2,5 mL de fuente de carbono, 2,5 mL de fuente de nitrógeno orgánico, 2,5 mL de fuente de nitrógeno inorgánico, 2,5 mL de solución de sales, 12,5 mL de agua destilada y 2,5 mL de inóculo. Las diferentes combinaciones de los niveles dieron como resultado cinco tratamientos, los cuales se montaron por triplicado (Tabla 6).

Tabla 6. Tratamientos evaluados para el ensayo exploratorio en Erlenmeyer de 125mL con la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006

Tratamiento	Factor A	Factor B
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	0	0

Los Erlenmeyer se dejaron en agitación a 170 rpm y 30°C durante 48 h. Al cabo de este tiempo se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-7} en Tween 0,5% y se sembraron 10 μ L de las tres últimas diluciones en cajas Petri con agar LB; las cajas fueron incubadas a 30°C, durante 24 h, tiempo en el que se hizo el recuento de las UFC (Tabla 7). El resto del medio de cultivo fue centrifugado en tubos de 30 mL, los cuales habían sido pesados con anterioridad, a 15.000 rpm durante 15 min; estos tubos fueron secados a 28°C, hasta obtener un peso constante (Tabla 7).

Por la Tabla 7 se concluyó que la viabilidad a las 16 horas de fermentación estuvo siempre por encima de 1×10^9 UFC/mL con un máximo de 2×10^{10} UFC/mL para el tratamiento tres. El límite mínimo para que el proceso de fermentación tenga

potencial de ser aplicado para la formulación de un bioproducto está en 1×10^{10} UFC/mL (Figura 5), por lo que se debe orientar la investigación en la cercanías de los niveles del tratamiento tres, que tiene el nivel bajo de la fuente de carbono y el nivel alto de la fuente de nitrógeno orgánico; adicionalmente, la magnitud de la biomasa seca es concordante con reportes de otros autores que son cercanos a 5 g/L (Lang y Wullbrandt, 1999).

Tabla 7. Viabilidad (UFC/mL) y biomasa (g/L) obtenidas para el ensayo exploratorio en Erlenmeyer de 125 mL con la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006

Tratamiento	Log (UFC/mL)			Biomasa seca (g/L)		
	X	S	%CV	X	S	%CV
T1	9,851	0,073	0,74	1,60	0,080	5,00
T2	9,054	0,022	0,24	0,80	0,000	0,00
T3	10,204	0,046	0,46	4,56	0,260	5,71
T4	9,394	0,012	0,13	2,68	0,174	6,51
T5	9,439	0,185	1,96	2,72	0,220	8,10

X: promedio. S: desviación estándar. %CV: coeficiente de variación en porcentaje.

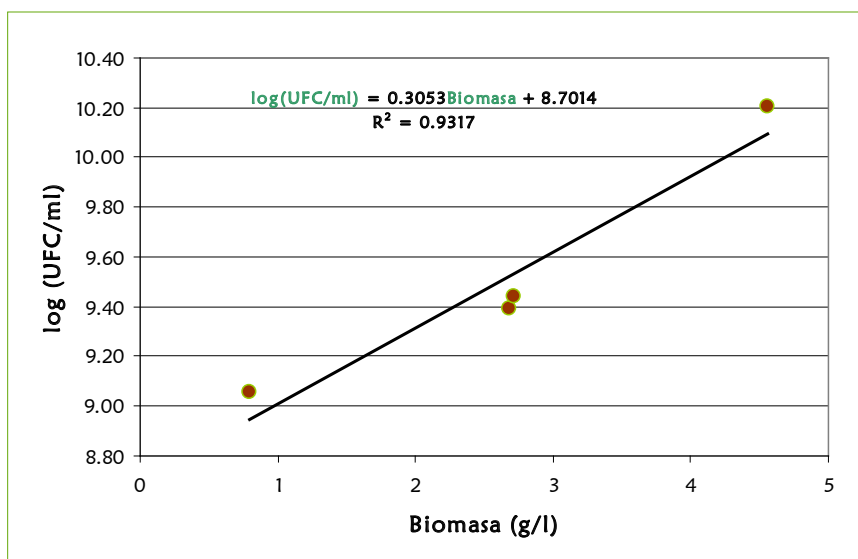


Figura 5. Relación entre viabilidad y biomasa seca para el ensayo exploratorio en Erlenmeyer de 125 mL con la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006.

Se observó una buena correlación lineal entre la viabilidad y la biomasa seca obtenida en los diferentes tratamientos, a excepción del tratamiento uno (dato no mostrado), en el que se presentó una desviación clara de la tendencia general, probablemente debida a problemas con la manipulación de la muestra

en la determinación de la biomasa. Este hecho es un indicio de que el medio de cultivo usado no presenta interferencias significativas representadas por sólidos en suspensión o por nutrientes residuales al final de la fermentación.

Tabla 8. Análisis de varianza para la viabilidad en el ensayo exploratorio en Erlenmeyer de 125 mL con la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A:Factor_A	1,86126	1	1,86126	97,15	0,0000*
B:Factor_B	0,394581	1	0,394581	20,60	0,0008*
AB	0,000280333	1	0,000280333	0,01	0,9059
Error total	0,210737	11	0,0191579		
Total (corr.)	2,46685	14			

* Indica diferencia significativa.

El análisis de varianza mostró que tanto la fuente de carbono como la fuente de nitrógeno presentaron un efecto significativo sobre la concentración final de *P. fluorescens* Ps006. Sin embargo, la interacción de estos dos factores no tiene un efecto significativo.

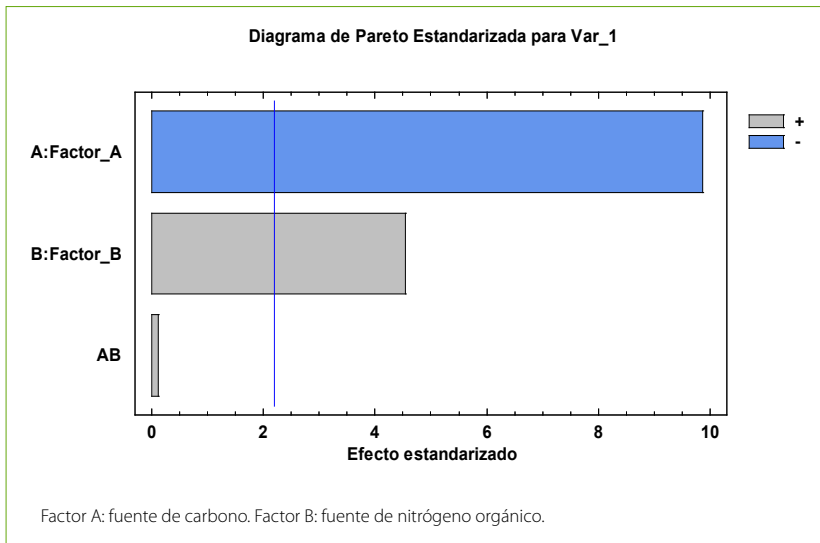


Figura 6. Influencia de factores nutricionales sobre el crecimiento de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006 crecida en medio líquido en Erlenmeyer de 125 mL.

El diagrama de Pareto (Figura 6) demostró que la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno tienen un efecto significativo sobre la variable respuesta, que la fuente de carbono tiene un efecto negativo aproximadamente dos veces mayor que el factor B o fuente de nitrógeno que tiene un efecto positivo. Este resultado indica

que la región experimental evaluada es adecuada para encontrar un punto óptimo para la fuente de carbono, pero no así para la fuente de nitrógeno, que aún puede ser aumentada en concentración aunque en una proporción mucho menor a la obtenida en el ensayo previo (efecto estandarizado = 29 en microplaca versus efecto estandarizado = 4,5 en Erlenmeyer de 125 mL). Igualmente se observa que la relación entre los factores A y B no tiene un efecto significativo.

Por otro lado, con el fin de dilucidar el efecto de la relación carbono/nitrógeno sobre la producción de biomasa de *P. fluorescens* Ps006, se llevó a cabo un análisis de comparación de medias de los tratamientos evaluados en el ensayo exploratorio en Erlenmeyer de 125 mL, aplicando la técnica LSD con un nivel de confianza del 95%.

Se concluyó que el tratamiento tres (Figura 7) fue el mejor y presentó diferencias significativas con los demás tratamientos evaluados. Por tanto, la etapa siguiente de optimización debe enfocarse en las cercanías de los niveles usados en este tratamiento.

En la Figura 7 se presenta el análisis gráfico, además se discriminan las magnitudes de la relación Fuente de carbono/Fuente de nitrógeno; acerca de este último aspecto se analizó que la mejor respuesta se obtuvo con la concentración más alta de fuente de nitrógeno (relación C/N = 1/1,51), simultáneamente se determinó que, para iguales relaciones C/N (véanse los tratamientos T1, T4 y T5), el mejor efecto se observó con el tratamiento con la menor concentración de fuente de nitrógeno (T1) que tenía concentraciones de fuente de nitrógeno orgánico/fuente de nitrógeno inorgánico = [2,54g/L]/[0,90g/L].

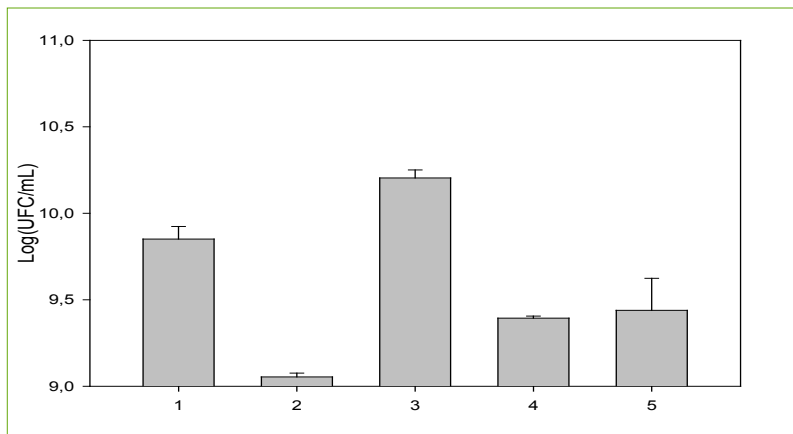


Figura 7. Análisis de comparación de medias de los tratamientos evaluados en el ensayo exploratorio en Erlenmeyer de 125 mL con la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006. Las letras representan los grupos homogéneos obtenidos al aplicar la técnica LSD con $\alpha=0,95$.

Teniendo en cuenta el análisis anterior, es claro que en la etapa siguiente de optimización se debe evaluar un rango de concentraciones de fuente de carbono intermedio dentro del espacio experimental que ya se evaluó en las dos etapas en combinación de concentraciones un poco más altas de la fuente de nitrógeno, dado que se mantiene la tendencia directamente proporcional con la respuesta.

A continuación se presenta la ecuación del modelo matemático, la cual está codificada por factores y niveles:

$$\begin{aligned} \text{Log (UFC/mL)} = & 9,58827 - 0,393833A \\ & + 0,181333B + 0,00483333AB \end{aligned} \quad (2)$$

R-cuadrada = 91,4573%

El grado de ajuste del modelo matemático generado (Ec. 1) es bueno, ya que para procesos biológicos un 90% de ajuste se considera aceptable; en este caso, el modelo explica el 91,4% de la variabilidad presentada en el experimento.

En la Tabla 9 se muestran los niveles que permitirían teóricamente optimizar la variable respuesta, si se aplicara el modelo matemático obtenido arriba, dentro del espacio experimental enmarcado por los niveles de los factores.

Tabla 9. Optimización de la concentración con la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006 en Erlenmeyer de 125 mL

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Factor A	-1,0	1,0	-1,0
Factor B	-1,0	1,0	1,0

Meta: maximizar: Log (UFC/mL)

Valor óptimo = 10,1586

Del modelo se concluyó que la respuesta óptima se encuentra hacia el nivel bajo (-1) de la fuente de carbono y el nivel alto (+1) de la fuente de nitrógeno; esto es coherente con los análisis realizados previamente en esta etapa exploratoria en Erlenmeyer de 125 mL.

En conclusión, se determinó que la fuente de nitrógeno orgánica continuó presentando un efecto positivo sobre el crecimiento de *P. fluorescens* Ps006 en Erlenmeyer de 125 mL y, por tanto, se evaluarán concentraciones más altas para la optimización a nivel de Erlenmeyer de 125 mL. Para la fuente de carbono se obtuvo un efecto negativo que indica que el valor óptimo se sobrepasó y se debe encontrar con concentraciones más bajas a las evaluadas. La relación fuente de

nitrógeno orgánico/fuente de nitrógeno inorgánico se sigue utilizando como parámetro en un valor de 2,8/1. El stock de sales también se sigue usando como parámetro en el valor definido en el ensayo de microplaca.

Etapa 3: Ensayo de optimización en Erlenmeyer de 125 mL

Con la información obtenida en el montaje anterior, se aplicó un nuevo diseño experimental factorial completo con tres factores a dos niveles en Erlenmeyer de 125 mL con un volumen de trabajo de 25 mL (Tabla 10).

Tabla 10. Matriz de niveles usada para la fermentación de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006 en el ensayo de optimización en Erlenmeyer de 125 mL

Nivel	Factor A (FC) (g/L)	Factor B	
		(FNO) (g/L)	(FNI)(g/L)
-1	2,52	3,87	1,35
0	5,04	7,62	2,7
1	7,56	11,43	4,05

Se prepararon 20 mL de una solución 10X de cada una de las concentraciones de las fuentes de carbono y nitrógeno orgánico e inorgánico listadas en la Tabla 10, con agua destilada; adicionalmente se preparó una solución de diferentes sales; las soluciones fueron esterilizadas bajo condiciones estándar. Igualmente se realizó un inóculo de 1×10^7 UFC/mL en Tween al 0,5%, a partir de una caja crecida durante 48 h.

Cada Erlenmeyer contenía 25 mL como resultado de la mezcla de los siguientes componentes: 2,5 mL de fuente de carbono, 2,5 mL de fuente de nitrógeno orgánico, 2,5 mL de fuente de nitrógeno inorgánico, 2,5 mL de solución de sales, 12,5 mL de agua destilada y 2,5 mL de inóculo. Las diferentes combinaciones de los niveles dieron como resultado nueve tratamientos, los cuales se montaron por triplicado (Tabla 11).

Tabla 11. Tratamientos evaluados para la fermentación de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006 en el ensayo de optimización en Erlenmeyer de 125 mL

Tratamiento	Factor A	Factor B
1	1	0
2	-1	-1
3	-1	1
4	0	1
5	0	-1
6	0	0
7	1	-1
8	-1	0
9	1	1

Los Erlenmeyer se ubicaron en un shaker con agitación de 170 rpm y 30°C durante 48 h. Al cabo de este tiempo se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-7} en Tween 0,5% y se sembraron 10 μ L de las tres últimas diluciones en cajas de agar LB; las cajas fueron incubadas a 30°C, durante 24 h, tiempo en el que se hizo el recuento de las UFC (Tabla 12). El resto del medio de cultivo fue centrifugado en tubos de 30 mL, los cuales habían sido pesados con anterioridad, a 15.000 rpm, durante 15 minutos; estos tubos fueron secados a 28°C, hasta obtener un peso constante para determinar la biomasa seca (Tabla 12).

Tabla 12. Viabilidad y biomasa obtenida para el ensayo de optimización en Erlenmeyer de 125 mL con la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006

Tratamiento	Log (UFC/mL)	CV (%)	Biomasa seca (g/L)	CV (%)
1	10,31	0,07	3,52	8,96
2	10,22	0,27	2,00	3,81
3	10,35	0,66	4,16	4,85
4	10,02	0,83	5,20	1,23
5	10,29	0,04	1,84	6,65
6	10,30	0,51	3,48	9,27
7	10,09	0,31	2,08	3,85
8	10,26	0,45	2,24	7,77
9	10,36	0,47	5,16	9,75

%CV: coeficiente de variación en porcentaje.

Se observó que los resultados de viabilidad obtenidos son, por mucho, mejores a los obtenidos en la etapa exploratoria, porque el promedio de todos los tratamientos estuvo por encima de 1×10^{10} UFC/mL (Tabla 12) y, además, el promedio general de todos los tratamientos fue significativamente superior al obtenido en la etapa dos ($1,7 \times 10^{10}$ UFC/mL vs $3,9 \times 10^9$ UFC/mL). El valor máximo obtenido fue de $2,3 \times 10^{10}$ UFC/mL para el tratamiento nueve; el límite mínimo para que el proceso de fermentación tenga potencial de ser aplicado para la formulación de un bioproducto está en 1×10^{10} UFC/mL, por lo que cualquiera de los tratamientos evaluados en esta etapa cumpliría con los requerimientos para la formulación de este.

Al analizar los resultados de la Tabla 12 se observó que, en promedio, la biomasa seca obtenida es significativamente diferente a la obtenida en la etapa dos (3,30 g/L vs 2,47 g/L). El valor máximo se obtuvo con el tratamiento cuatro con 5,2 g/L de biomasa seca y que correspondió al nivel base de la fuente de carbono y al nivel alto de la fuente de nitrógeno.

Ya que no se observó una relación lineal entre la viabilidad (expresada como Log (UFC/mL)) y la biomasa seca obtenida en los diferentes tratamientos, para los análisis estadísticos posteriores se usó como variable de respuesta la viabilidad, ya que se espera que presente una interferencia mucho menor que la biomasa seca.

Tabla 13. Análisis de varianza para la viabilidad en el ensayo de optimización en Erlenmeyer de 125 mL con la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A: Factor_A	0,00288852	1	0,00288852	0,20	0,6613
B: Factor_B	0,00824259	1	0,00824259	0,57	0,4614
AA	0,0241999	1	0,0241999	1,66	0,2132
AB	0,0158318	1	0,0158318	1,09	0,3106
BB	0,0272589	1	0,0272589	1,87	0,1876
Bloques	0,0104885	2	0,00524423	0,36	0,7026
Error total	0,277127	19	0,0145856		
Total (corr.)	0,366037	26			

*Indica diferencia.

El análisis de varianza mostró que ninguno de los dos factores (fuente de carbono y fuente de nitrógeno orgánico) o su interacción presentó un efecto significativo sobre las células viables al final del proceso de fermentación con la cepa de *P. fluorescens* (Tabla 13). Esto es un indicativo de que el espacio experimental explorado está en las cercanías de lo óptimo y que el rango de los factores fue dilucidado con éxito.

En el diagrama de Pareto (Figura 8) se comprobó que ninguno de los factores presentó un efecto significativo, al igual que su interacción. La interacción entre

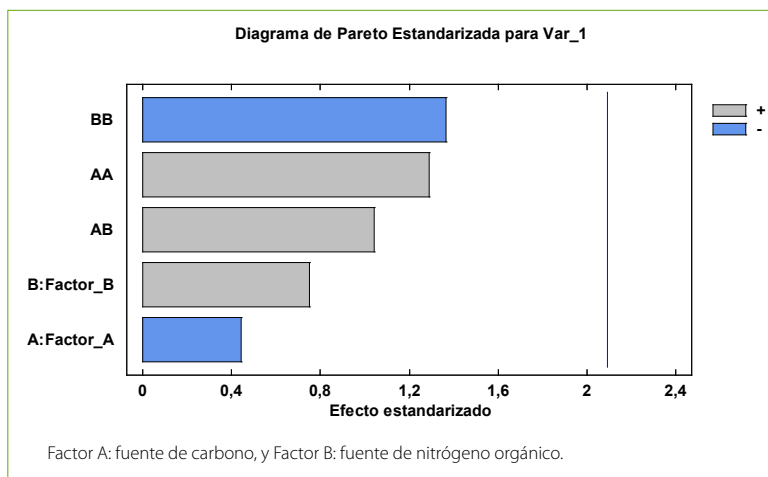


Figura 8. Influencia de factores nutricionales sobre el crecimiento de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006 crecida en medio líquido en Erlenmeyer de 125 mL.

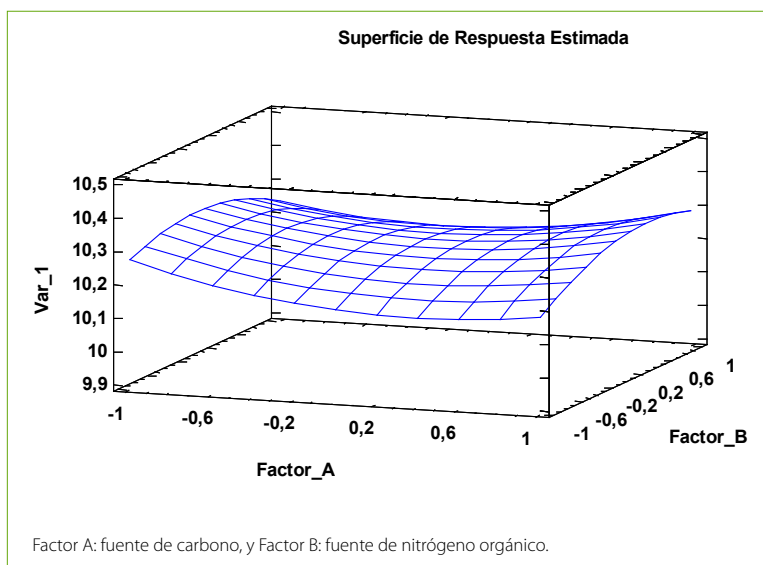


Figura 9. Grafica de superficie de respuesta del efecto de las fuentes nutricionales sobre la viabilidad de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006.

las fuentes de carbono y nitrógeno presentó la mayor magnitud, mientras que la fuente de nitrógeno mostró un efecto positivo y la fuente de carbono un sentido negativo, pero en magnitud similar.

En la superficie de respuesta (Figura 9) se puede observar el espacio experimental del montaje. La geometría obtenida fue plana, debido a que los tratamientos se comportaron de una manera similar, sin embargo, se observa un máximo para la fuente de nitrógeno, cercano al nivel base (0), para la fuente de carbono se observa un “valle” en el nivel base (0) y valores máximos en los extremos (nivel -1 y 1), por lo que se debe complementar este análisis gráfico con el diagrama de Pareto y el análisis de comparación de medias, para la toma de decisiones.

En la Figura 10 se pueden observar los grupos homogéneos formados a partir del análisis de comparación de medias, aplicando la técnica LSD (mínima diferencia significativa), con un nivel de confianza del 95%. El tratamiento nueve fue el que presentó la mayor respuesta (con $2,3 \times 10^{10}$ UFC/mL), y el tratamiento cuatro, la menor (con $1,9 \times 10^{10}$ UFC/mL); dentro del grupo homogéneo, con la mejor respuesta se ubicaron los tratamientos codificados como T1, T3, T5, T6 y T9, mientras que los tratamientos codificados como T4 y T7 presentaron la peor respuesta y fueron estadísticamente diferentes al resto.

Para la relación carbono/nitrógeno de 8,5 (tratamientos T2, T6 y T9) se presentó una relación directamente proporcional, es decir, a medida que se aumentó la concentración de la fuente de nitrógeno se observó un aumento en la

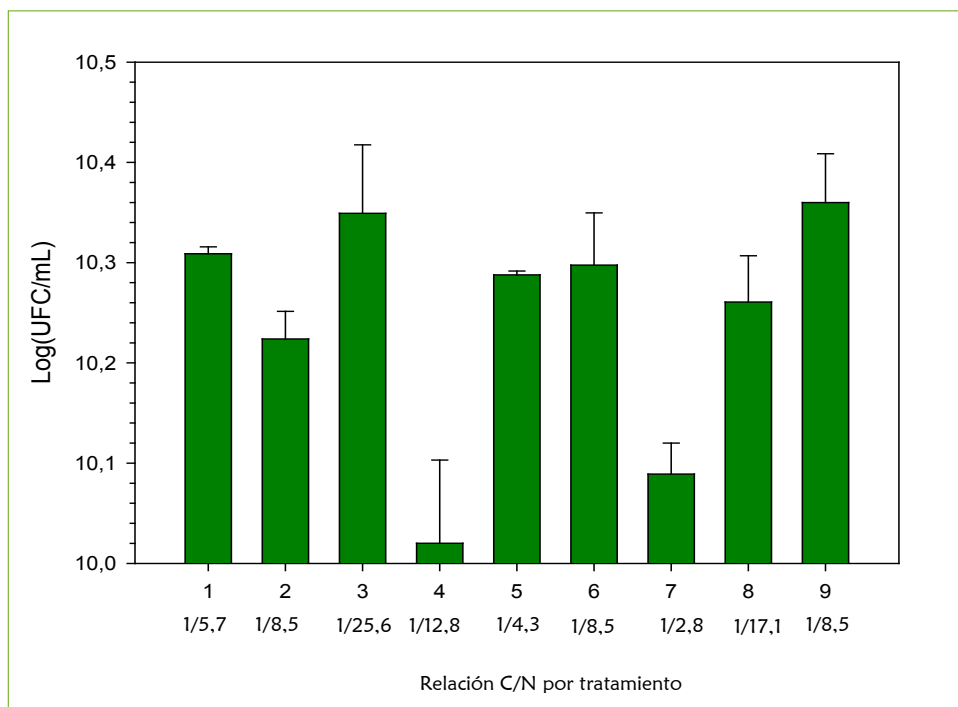


Figura 10. Análisis de comparación de medias de los tratamientos evaluados en el ensayo de optimización en Erlenmeyer de 125 mL con la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006. Las letras representan los grupos homogéneos obtenidos al aplicar la técnica LSD con $\alpha=0,95$.

concentración bacteriana expresada como UFC/mL. Por otro lado, también se observó que las mejores respuestas en viabilidad se obtuvieron con relaciones de C/N bajas o altas, mientras que con relaciones de C/N intermedias se obtuvieron los peores resultados; esto apunta hacia la conclusión de que el balance nutricional del medio de cultivo es un factor crítico para la obtención de viabilidades óptimas.

Posteriormente, se aplicó un algoritmo de optimización; los resultados se presentan en la Tabla 14, se obtuvo un valor de 2,52 g/l para la fuente de carbono y de 9,89 g/l para la fuente de nitrógeno, con una relación de C/N de 3,92, cercana a la obtenida con el tratamiento cinco, en el que se obtuvo una concentración final de $1,9 \times 10^{10}$ UFC.mL⁻¹.

Tabla 14. Niveles teóricos para optimizar la concentración del aislamiento de *Pseudomonas fluorescens* Ps006

Factor	Bajo	Alto	Óptimo	Concentración (g/L)
Factor A	-1,0	1,0	-1,0	2,52
Factor B	-1,0	1,0	-0,110381	7,20 : 2,69

Valor óptimo: Log (UFC/mL) = 10,3237

A continuación se presenta la ecuación del modelo cuadrático codificado:

$$\begin{aligned} \text{Log (UFC/mL)} = & 10,2467 - 0,0126678A + 0,0213991B \\ & + 0,0635084*A^2 + 0,0363224AB - 0,0674029B^2 \end{aligned} \quad (3)$$

R-cuadrada = 24,29%

El modelo matemático no presentó un buen ajuste, por tanto, el análisis se debe enfocar a los análisis directos sobre los datos experimentales generados, no sobre los predichos. Sin embargo, es claro que los efectos de los factores individuales y sus interacciones son consistentes con los obtenidos en el diagrama de Pareto (Figura 8).

En conclusión, según los resultados del análisis de comparación de medias (Tabla 14), el análisis de las respuestas en función de la relación de C/N (Figura 9) y las viabilidades obtenidas, se tomó la decisión de continuar con una validación en el tiempo de los mejores resultados obtenidos (tratamientos T3 y T9), usando un volumen mayor.

Etapa 4: Ensayo de validación en Erlenmeyer de 500 mL

Los mejores tratamientos seleccionados en la etapa anterior (T3 y T9) se validaron en Erlenmeyer de 500 mL, dos veces en el tiempo, para determinar la reproducibilidad de los resultados a una escala mayor.

La metodología seguida fue similar a la aplicada en la etapa tres; se utilizó 100 mL del medio de cultivo correspondiente a cada tratamiento, se ubicó en Erlenmeyer de 500 mL para mantener la relación de volúmenes dentro del sistema y se llevó a cabo el proceso de fermentación bajo condiciones idénticas. Al finalizar se evaluó de nuevo la concentración final obtenida y la biomasa bacteriana.

En la Tabla 15 se presentan los resultados obtenidos en concentración bacteriana y en biomasa:

Tabla 15. Concentración (expresada como UFC/mL) y biomasa (expresada como g/L) obtenida para el ensayo de validación en Erlenmeyer de 500 mL con la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006

	Log (UFC/mL)			Biomasa seca (g/L)		
	X	S	%CV	X	S	%CV
T3	10,212	0,1171	1,147	3,397	0,0074	8,677
T9	10,764	0,074	0,691	4,357	0,0113	10,159

Se observó que los resultados obtenidos en concentración son consistentes en el tiempo y tienen coeficientes de variación inferiores al 2%. En el caso de

la biomasa, para la primera repetición en el tiempo se obtuvieron coeficientes de variación relativamente altos (superiores al 10%), que fueron atribuidos a problemas asociados con la técnica de cuantificación de la biomasa seca obtenida después de la centrifugación de las muestras de biomasa húmeda. Sin embargo, esta posible fuente de error experimental se eliminó para la segunda repetición en el tiempo y se obtuvieron resultados consistentes y con un coeficiente de variación inferiores al 10%.

Al graficar los datos experimentales obtenidos en Erlenmeyer de 125 mL y los obtenidos en las dos réplicas en Erlenmeyer de 500 mL se presentó un coeficiente de variación entre 10% y 12% para el factor biomasa y un coeficiente de variación entre 1% y 2% para el factor concentración (expresada como UFC/mL); estos resultados indican que existió reproducibilidad adecuada, especialmente del factor más crítico que es la concentración final de la bacteria, ya que este parámetro es usado como línea base para el proceso de formulación del bioproducto (Figuras 11 y 12).

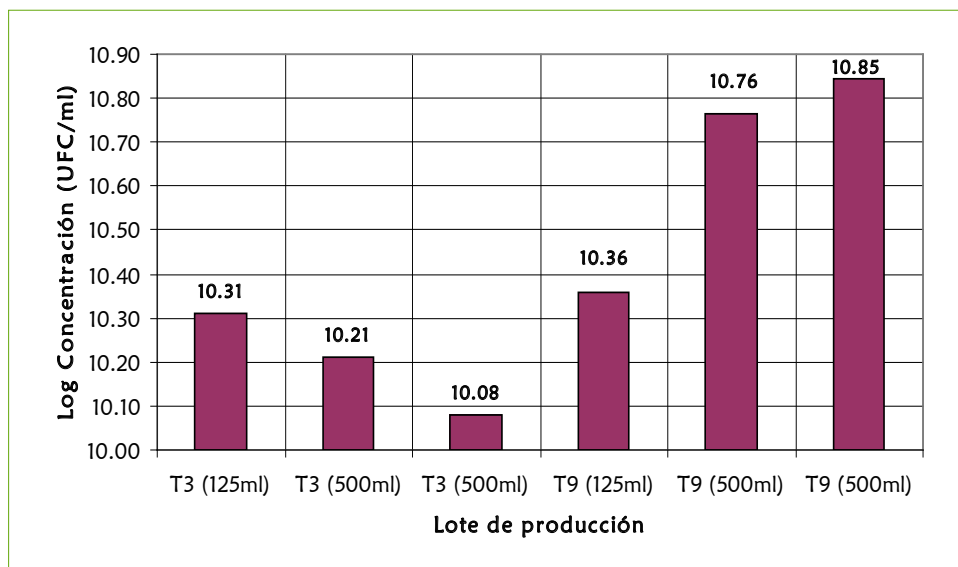


Figura 11. Viabilidad (UFC/mL) obtenida en diferentes volúmenes con dos tratamientos previamente seleccionados (T3 y T9), para la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006.

Dado que se cumplió con el requisito de reproducibilidad en el tiempo para el proceso de fermentación a nivel de laboratorio con la bacteria *P. fluorescens* Ps006, se procedió a llevar a cabo un montaje a nivel de banco, usando un biorreactor Airlift que fue previamente diseñado y puesto en marcha en trabajos anteriores en el Laboratorio de Control Biológico del CBB de Corpoica (Flórez, 2002).

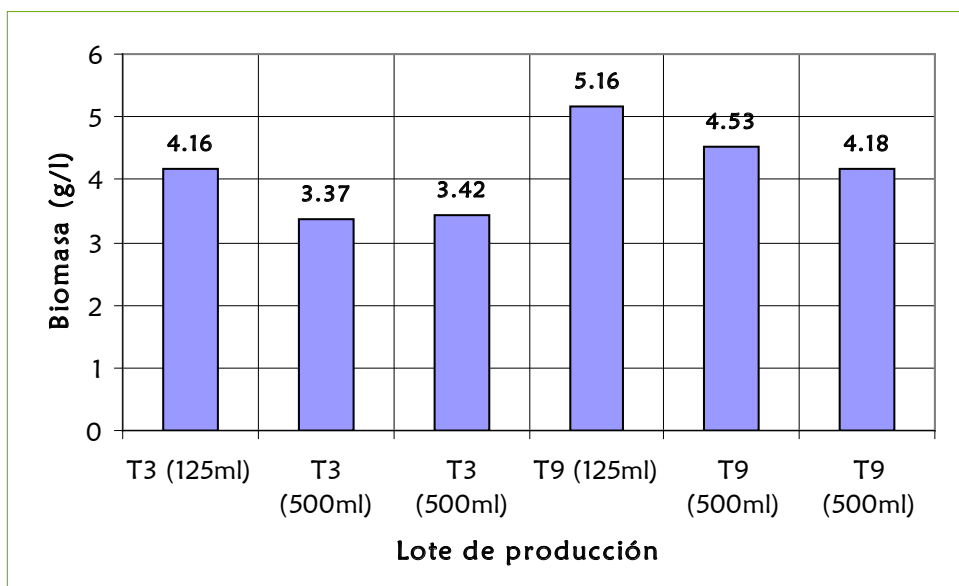


Figura 12. Biomasa (g/L) obtenida en diferentes volúmenes con dos tratamientos previamente seleccionados (T3 y T9), para la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006.

En conclusión, se seleccionó el tratamiento nueve por presentar consistentemente los mejores resultados en magnitud, tanto de concentración como de biomasa, en comparación con el tratamiento uno, en los dos volúmenes evaluados a nivel de laboratorio.

Etapa 5: Ensayo de producción de biomasa a nivel de biorreactor Airlift de 20 litros

Con la información obtenida durante el desarrollo del medio de cultivo (Etapas 1-4), se estandarizó la composición de nutrientes para la producción masiva de biomasa de la rizobacteria *P. fluorescens* Ps006 (Tabla 16).

Tabla 16. Composición del medio de cultivo estandarizado para ser evaluado en biorreactor Airlift para producción de biomasa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006

Tratamiento	Factor A (Fuente de carbono) (g/L)	Factor B	
		(Fuente de nitrógeno orgánico) (g/L)	(Fuente de nitrógeno inorgánico) (g/L)
1*	7,56	11,43	4,05

*Corresponde al tratamiento nueve de la etapa cuatro.

Se usó un criovial conteniendo *P. fluorescens*. Ps006 proveniente de la colección banco de trabajo; la reactivación se llevó a cabo en agar LB, durante 48 h, a 28°C;

a partir de este pase se inocularon cuatro Erlenmeyer de 1000 mL, los cuales contenían 500 mL del medio de cultivo. Estos inóculos se dejaron en incubación a 175 rpm, durante 24 h, a 28°C, y se les determinó la viabilidad mediante recuento en placa (Tabla 17).

Tabla 17. Viabilidad del inóculo de *Pseudomonas fluorescens* Ps006 para la producción de biomasa en biorreactor Airlift

UFC/mL			Log (UFC/mL)					
R1	R2	R3	R1	R2	R3	X	S	%CV
1,21x10 ⁸	1,64x10 ⁸	1,47x10 ⁸	8,0828	8,215	8,167	8,155	0,067	0,82

Por otra parte, el biorreactor Airlift se llevó a esterilización a 121°C y 15 Lb de presión, durante 15 min. Simultáneamente se prepararon 18 L de medio fresco; este volumen de medio fue esterilizado bajo las mismas condiciones mencionadas arriba. En cabina de flujo laminar y bajo condiciones estériles se llevó a cabo el llenado y posterior inoculación del biorreactor, usando el inóculo obtenido del paso anterior.

La fermentación se realizó bajo las siguientes condiciones: temperatura: 28°C, controlada mediante el uso de un controlador PID análogo, acoplado a una resistencia. Aireación: ajustada manualmente a un valor de 0,70 vvm, previa filtración y humidificación del mismo. Tiempo de fermentación: 48 h, según los datos experimentales en Erlenmeyer.

Se realizó un muestreo al final de la fermentación, utilizando el puerto destinado para tal fin, acoplado a una bomba peristáltica. Para la determinación de la viabilidad se tomaron 25 mL del caldo de fermentación en un Erlenmeyer estéril y para la cuantificación de biomasa seca se tomaron 100 mL del caldo de fermentación, por cuadruplicado, para ser posteriormente separados usando una centrífuga.

Tabla 18. Viabilidad (expresada en UFC/mL) para el ensayo de la producción de *Pseudomonas fluorescens* Ps006 en biorreactor Airlift

Hora	UFC/mL			Log(UFC/mL)					
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	X	S	%CV
0	1,21x10 ⁷	1,64x10 ⁷	1,47x10 ⁷	7,083	7,215	7,167	7,155	0,06689	0,93
48	1,10x10 ¹⁰	9,90x10 ⁹	1,19x10 ¹⁰	10,041	9,996	10,076	10,038	0,05461	0,54

La concentración de células inicial en el fermentador fue aproximadamente de 1x10⁷ UFC/mL, igual que como se había hecho en las anteriores pruebas para optimizar el medio de cultivo. En el muestreo final, a las 48 h se observó turbidez del medio, sin presentar olores fuertes; la concentración en este tiempo

fue aproximadamente de $1,09 \times 10^{10}$ UFC/mL; se esperaba que la concentración en este tiempo fuera mayor de 1×10^{10} UFC/mL, como se había obtenido en Erlenmeyer de 125 mL y 500 mL. Por otra parte, en trabajos posteriores se evaluarán las condiciones fisicoquímicas en biorreactor (aireación) que pueden llegar a incrementar los niveles de concentración final.

Tabla 19. Biomasa (gramos) para el ensayo de la producción de *Pseudomonas fluorescens* Ps006 en biorreactor Airlift

Hora	Biomasa (g/L)						
	R1	R2	R3	R4	X	S	%CV
48	4,4	3,8	5,7	3,5	4,35	0,01	6,92

La biomasa seca obtenida mediante centrifugación sigue una tendencia similar a la concentración, llegando al punto más alto probado a las 48 h.

En la literatura únicamente existe información acerca de la remoción de contaminantes en aguas negras con *Pseudomonas* sp. en biorreactores tipo Airlift, pero son escasos los datos acerca de la producción de biomasa en dicho fermentador, por lo que no se tiene referencia con los posibles resultados encontrados en este montaje, ni es posible su comparación.

La mayor cantidad de biomasa que se obtuvo en el fermentador Airlift fue de 4,35 g/L, valores similares a los alcanzados en Erlenmeyer de 500 mL, que fueron aproximadamente de 4,5 g/L, en promedio; esto demuestra que hay reproducibilidad del proceso y se mantienen las magnitudes adecuadas para satisfacer los requerimientos de los procesos *downstream* a la fermentación. Sin embargo, hay que tener en cuenta que esta técnica de secado de la biomasa puede tener varias interferencias provenientes del medio de cultivo.

Conclusión

Se llevó a cabo el diseño, estandarización y validación exitoso del proceso de producción de biomasa de *P. fluorescens* Ps006 mediante fermentación líquida. Los niveles de concentración de células viables y de biomasa obtenidos son adecuados para ingresar a las operaciones unitarias relacionadas con la formulación de un bioproducto.

Referencias bibliográficas

1. Abouseoud, M. Maachi, R. Amrane, A. Boudergua, S. & Nabi, A. 2008. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*. 223. Pp. 143-151.
2. Durner, R. Witholt, B. & Egli, T. 2000. Accumulation of Poly[(R)-3-Hydroxyalkanoates] in *Pseudomonas oleovorans* during growth with octanoate in con-

- tinuous culture at different dilution rates. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (8). Pp. 2408-3414.
3. Flórez, J. 2002. *Diseño y puesta en marcha de un reactor Airlift para la producción masiva de microorganismos de interés en control biológico*. Tesis de Ingeniería Química. Fundación Universidad de América. Bogotá, Colombia.
 4. Lang, S. & Wullbrandt, D. 1999. Rhamnose lipids-biosynthesis. Microbial production and application potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51. Pp. 22-32.
 5. Sastoque, L. 2010. *Producción, caracterización y evaluación de la actividad biológica de biosurfactantes (Rhamnolípidos) a partir de rizobacterias de fique (Furcraea sp.)*. Tesis de maestría en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Básicas. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 146 p.

DISEÑO Y DESARROLLO DE UN PROTOTIPO DE FORMULACIÓN A BASE DE *Pseudomonas fluorescens* Ps006

Jenny Carolina Ruiz¹, Laura Villamizar, Martha Isabel Gómez y
Alba Marina Cotes

¹Laboratorio de Control Biológico, Centro de Biotecnología y Bioindustria, CBB,
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica.
lvillamizar@corpoica.org.co

Introducción

Los bioplaguicidas microbianos son productos que contienen un microorganismo o un componente de este como ingrediente activo (Fernández y Juncosa, 2002), cuya adecuada formulación los hace resistentes a condiciones abióticas tales como exposición a la luz UV, oscilaciones repentinas de temperatura, pH y humedad relativa, entre otras (Burges, 1998).

Para el desarrollo de un bioplaguicida es necesario llevar a cabo diferentes etapas tecnológicas, entre las que se destaca la preformulación, cuyo objetivo principal es la determinación de las características físicas, químicas y biológicas del principio activo (microorganismo) y de los cambios que este pueda sufrir solo o en combinación con los auxiliares de formulación necesarios para la elaboración del producto final (Gómez *et al.*, 2000).

El laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de Corpoica ha venido trabajando durante los últimos años en la búsqueda de microorganismos con potencial para el control biológico de diversos patógenos, en diferentes cultivos, seleccionando la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Ps006 por su potencial para el control de *Olpidium virulentus* en plántulas de lechuga (*L. sativa*), por su capacidad para producir biosurfactantes y por sus actividades solubilizadora de fósforo y zoosporicida (Sastoque, 2010). Por estas

razones, el aislamiento Ps006 fue escogido como candidato para convertirse en el ingrediente activo de un bioinsumo con posible actividad antagonista de fitopatógenos e inductor del crecimiento vegetal, para el que se diseñó un sistema de entrega sólido [polvo mojable (WP)] para un principio activo a base de Ps006.

Materiales y métodos

Diseño y caracterización química, biológica y microbiológica del principio activo a base de *P. fluorescens* Ps006

Una vez determinado el tiempo óptimo de fermentación de *P. fluorescens* Ps006, se realizó la caracterización de tres lotes de dos principios activos diferentes; el primero correspondió al caldo de fermentación con células, y el segundo, al caldo sin células, retiradas filtrando el caldo de cultivo con filtros de 0,22 μm . La caracterización se realizó evaluando la concentración celular en unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL), el pH, la masa seca y la actividad biológica *in vitro*, por triplicado para cada lote.

Concentración celular: Se determinó la concentración del principio activo con células por el método de recuento en placa en medio LB. Los datos se promediaron y se determinó la desviación estándar de los mismos.

Determinación del pH. El pH de los dos principios activos se midió con un potenciómetro marca Hanna Instruments, previamente calibrado. Los datos se promediaron y se determinó la desviación estándar de los mismos.

Masa seca: Con el uso de una balanza halógena de humedad marca *KERN* se determinó el porcentaje de humedad de una alícuota de 1 mL, de cada uno de los lotes, de los dos principios activos por triplicado, estimándose el porcentaje de masa seca en el principio activo. Los datos se promediaron y se determinó la desviación estándar de los mismos.

Actividad biológica *in vitro*: La actividad biológica *in vitro* se estimó como la inhibición del crecimiento diametral de cuatro fitopatógenos modelo, por su facilidad de mantenimiento en medio de cultivo artificial y mediante la inhibición de la germinación de conidios de *Botrytis cinerea* Bo008.

Para medir la inhibición del crecimiento diametral se utilizaron los patógenos *Fusarium oxysporum* MAP5 aislado de cultivos de uchuva, *Rhizoctonia solani* Rh200, *Sclerotinia sclerotiorum* Sc021 - papa, *Botrytis cinerea* Bo008 - mora y los tratamientos evaluados (posibles principios activos del bioinsumo); fueron el caldo de fermentación con las células de Ps006 y el caldo de fermentación sin células, después de removerlas por filtración (0,22 μm). Muestras de 100 μL de cada uno de los tratamientos se sembraron en medio agar PDA y se colocó, en

el centro de la caja sobre el medio de cultivo, un disco de cinco mm de diámetro de medio de cultivo crecido con los hongos fitopatógenos de ocho días de edad. Se utilizaron tres cajas de Petri para cada uno de los hongos, con cada uno de los tratamientos provenientes de cada uno de los lotes de fermentación. El tratamiento control consistió en medio agar PDA sin inóculo bacteriano, pero inoculado con los hongos fitopatógenos de la forma descrita previamente. Las cajas se incubaron ocho días a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y transcurrido dicho tiempo se midió el diámetro de la colonia formada, realizando cuatro mediciones, una horizontal, una vertical y las dos diagonales; posteriormente se promediaron dichos datos para obtener el valor de crecimiento diametral medio de cada colonia.

Para la evaluación del efecto de los tratamientos sobre la germinación de los conidios de *B. cinerea* Bc008 se preparó una suspensión de conidios en una solución de Tween 80 al 0,5% y se ajustó a una concentración de 1×10^5 conidios/mL mediante recuento en cámara de Neubauer. Se inocularon 50 μL de la suspensión de conidios y 50 μL del tratamiento en cajas de Petri con medio agar agua y se incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 16 horas; la germinación se detuvo con una gota de azul de lactofenol. Como tratamiento control se sembraron 50 μL de la suspensión de conidios y 50 μL de medio LB estéril en cajas Petri con agar agua. El experimento contó con tres repeticiones por tratamiento.

Una vez se verificó la normalidad de los datos (Shapiro Wilk, 95%) y la homogeneidad de varianzas (Prueba de Barlett, 95%) de los mismos, los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANAVA) y una comparación de medias de Tukey, con un nivel de confianza del 95%, empleando el programa estadístico Statistix 8.0.

Desarrollo de la formulación mediante la selección del soporte sólido (vehículo) más compatible con el principio activo a base de *P. fluorescens* Ps006

Se evaluaron tres soportes sólidos denominados S1, S2 y S3 a dos humedades cada uno (10% y 20%). Para los tratamientos con 10% de humedad se mezclaron homogéneamente 180 g de cada uno de los soportes sólidos con 25,5 mL del principio activo seleccionado. Posteriormente se dispensaron muestras de 1 g de soporte inoculado con el principio activo en viales de vidrio previamente esterilizados, los cuales se sellaron con tapones de caucho y agrafes metálicos y se almacenaron a temperaturas de $8 \pm 2^\circ\text{C}$, $18 \pm 2^\circ\text{C}$ y $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Para los tratamientos correspondientes al 20% de humedad, se realizó el mismo procedimiento, cambiando únicamente la relación soporte–principio activo, para lo cual se mezclaron 150 g de soporte con 21,25 mL de caldo de fermentación (principio activo) y 21,25 mL de tampón fosfato pH 7,5.

Antes de iniciar el almacenamiento y pasados 1, 2 y 3 meses de almacenamiento se evaluó la viabilidad de *P. fluorescens* Ps006 por el método de recuento en placa

descrito previamente (resultados expresados en UFC/mL), el pH y la actividad frente a *S. sclerotiorum* Sc021 como hongo modelo. La muestra contenida en cada vial se mezcló con 9 mL de Tween 80 al 0,5% y se agitó para su posterior homogenización. Para la evaluación de la actividad biocontroladora de cada tratamiento, muestras de 100 µL de cada uno de los tratamientos reconstituidos se sembraron en cajas de Petri con medio agar PDA y se colocó, en el centro de la caja sobre el medio de cultivo, un disco de cinco mm de diámetro de medio crecido con *S. sclerotiorum* Sc021. Se utilizaron tres cajas de Petri por cada uno de los tratamientos. El tratamiento control negativo para la evaluación de la inhibición de crecimiento diametral consistió en el medio agar PDA sin inóculo bacteriano. Las cajas se incubaron ocho días a 25 ± 2°C y transcurrido dicho tiempo se determinó el crecimiento diametral como se describió anteriormente.

Antes de mezclar el principio activo con los soportes se evaluó su viabilidad y su actividad biológica sobre el crecimiento diametral de *S. sclerotiorum* Sc021. Como control negativo se determinó también la actividad de los soportes solos, mezclados con agua estéril sobre el crecimiento de dicho patógeno. Con los resultados iniciales y finales se calculó la pérdida de viabilidad y la actividad biocontroladora, utilizando las siguientes fórmulas:

$$\text{Pérdida de viabilidad (\%)} = \frac{(\text{Viabilidad inicial} - \text{Viabilidad final})}{\text{Viabilidad inicial}} * 100$$

$$\text{Pérdida de actividad (\%)} = \frac{(\% \text{ inhibición inicial del patógeno} - \% \text{ inhibición final del patógeno})}{\% \text{ inhibición inicial del patógeno}} * 100$$

El diseño fue completamente al azar con medidas repetidas en el tiempo. En cada tiempo de medición se evaluaron dos viales de cada tratamiento por triplicado. Una vez se verificó la normalidad de los datos (Shapiro Wilk, 95%) y la homogeneidad de varianzas (Prueba de Barlett, 95%) de los mismos, los resultados se analizaron mediante un ANAVA y una comparación de medias de Tukey, con un nivel de confianza del 95%, empleando el programa estadístico Statistix 8.0.

Resultados y discusión

*Diseño y caracterización química, biológica y microbiológica del principio activo a base de *P. fluorescens* Ps006*

Los resultados obtenidos al caracterizar los dos posibles principios activos se presentan en la Tabla 1:

Tabla 1. Características químicas y microbiológicas de tres lotes de principios activos a base de Ps006

Tratamiento	Características	Lote A	Lote B	Lote C	Promedio	DS
Caldo de fermentación con células	Concentración de Ps006 (UFC/mL)	6,73x10 ⁹	8,07x10 ⁹	8,93x10 ⁹	7,91x10 ⁹	7,32x10 ⁸
	pH	8,68	8,65	8,64	8,66	0,020
	Peso seco (%)	1,85	1,68	1,59	1,71	0,13
Caldo de fermentación sin células	pH	8,44	8,43	8,46	8,44	0,015
	Peso seco (%)	1,51	1,34	1,33	1,40	0,10

En la Figura 1 se observa la actividad biocontroladora *in vitro* del principio activo con células y sin células, frente a los cuatro patógenos evaluados. Se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos en los que se usó el principio activo con células y en los que se usó el principio activo sin células, con los cuales no se obtuvo inhibición de crecimiento diametral en ningún caso, en comparación con el caldo de fermentación con células que causó inhibiciones de *R. solani* Rh200, *B. cinerea* Bc008, *S. sclerotiorum* Sc021 y *F. oxysporum* MAP5 del 87,40%, 90,89%, 93,64% y 55,21%, respectivamente.

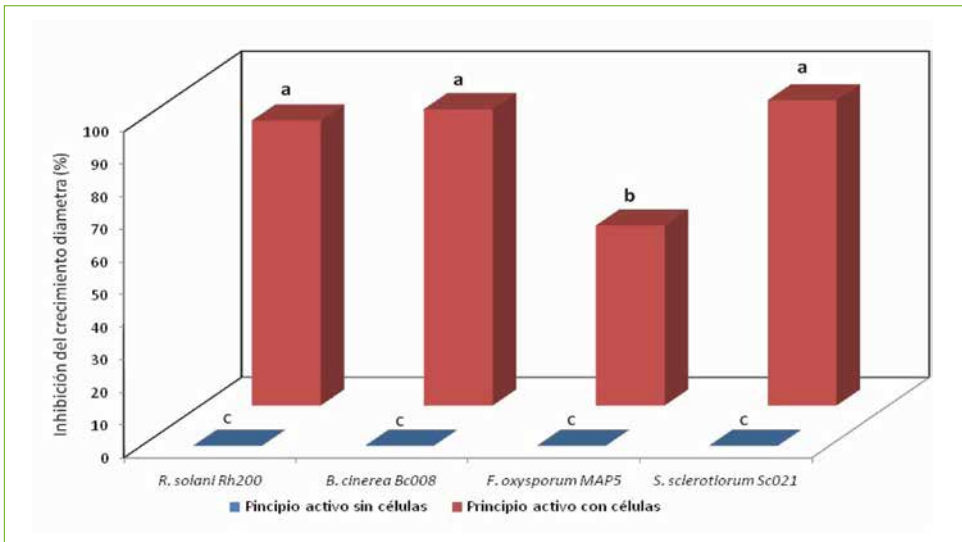


Figura 1. Actividad biocontroladora *in vitro* de dos principios activos a base de Ps006: inhibición del crecimiento diametral. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey (95%).

La actividad antagonista de *P. fluorescens* contra *Fusarium* sp., *Botrytis* sp., *Sclerotinia* sp. y *Rhizoctonia* sp. ya ha sido descrita anteriormente; por ejemplo, para *F. oxysporum* se obtuvo un control del 81,21% en condiciones de campo

(Manikandan *et al.*, 2003), para *R. solani* se observaron disminuciones de la intensidad de la enfermedad del 42% (Rabrindran *et al.*, 1996) y del 47,89% (Commare *et al.*, 2002) en condiciones de invernadero, para *Botrytis* sp. se obtuvo una disminución del crecimiento *in vitro* del 67,7% (Mikani *et al.*, 2008) y para *S. sclerotiorum* una reducción de la incidencia de la enfermedad del 26,3% en condiciones de campo (Fernando *et al.*, 2007), lo que demuestra el potencial que tiene *P. fluorescens* para emplearse como principio activo de bioplaguicidas para diferentes patosistemas.

En cuanto a la actividad biocontroladora evaluada como la inhibición de la germinación de los conidios de *B. cinerea* Bc008, el principio activo con células causó una reducción de la germinación del 46,10%, valor que fue significativamente mayor ($F=29,1$; $df=1$; $P=0,0001$) que el obtenido con el principio activo sin células con un 4,68% de inhibición (Figura 2). En la Figura 3 se observa que el tubo germinal de los conidios expuestos al principio activo con células de Ps006 tienen un tamaño considerablemente menor que el de los conidios del tratamiento control y aquellos que se expusieron al principio activo sin células, evidenciándose también un efecto sobre la extensión del tubo germinal y en consecuencia sobre el crecimiento del micelio.

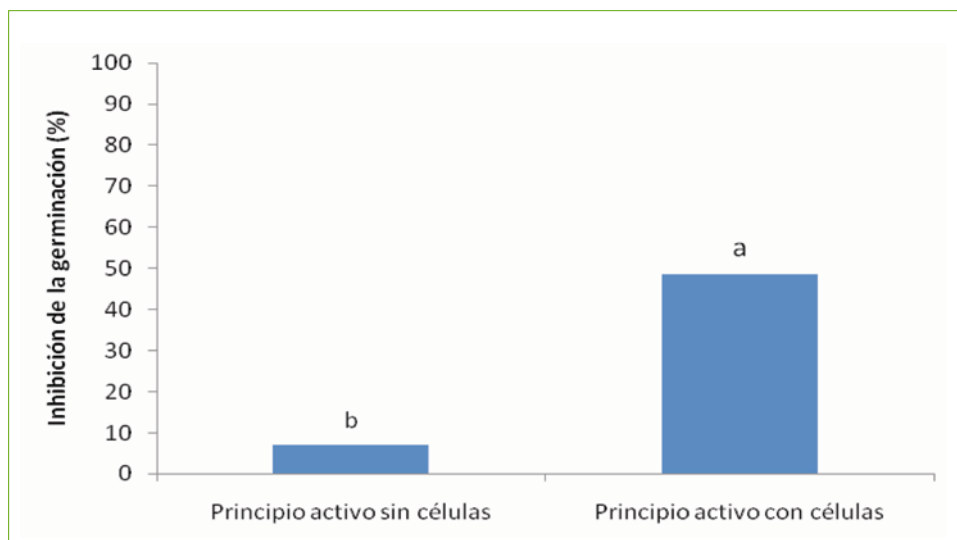


Figura 2. Actividad biocontroladora *in vitro* de dos principios activos a base de Ps006: inhibición de la germinación de *B. cinerea* Bc008. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de DMS (95%).

Estos resultados permiten concluir que la actividad antagonista es ejercida por las células bacterianas y no por el medio de cultivo o los metabolitos excretados a este durante la fermentación. Este efecto fue sugerido por Commare y colaboradores (2002), que atribuyeron la actividad antagonista de formulaciones

de talco con *P. fluorescens* como principio activo, a la competencia por espacio, evidenciándose un control de *R. solani* del 47,9% en condiciones de invernadero. En estudios realizados por Valencia y colaboradores (2005) también se concluyó que la actividad de *P. fluorescens* ZUM80 sobre *F. oxysporum* se debió a la competencia por nutrientes, al privarlo del hierro disponible en el medio con la producción de sideróforos, capacidad antagónica que se vio favorecida cuando la bacteria tuvo un tiempo de preexposición en el medio. Sin embargo, en estudios realizados por Khanam y colaboradores (2005) se encontró que el ácido salicílico que produce *P. fluorescens* inhibe la formación de estructuras de infección, tales como el tubo germinal y los apresorios en *B. cinerea*, lo que sugiere que además del efecto competitivo que ejerce *Pseudomonas* sp. sobre los patógenos, existe la producción de ciertos metabolitos con actividad antagónica efectiva.

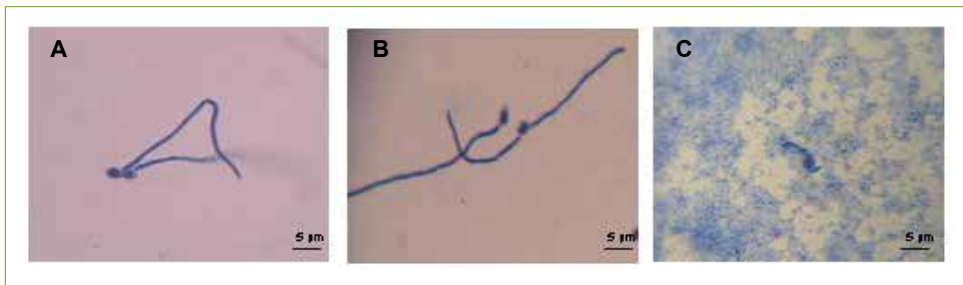


Figura 3. Germinación de los conidios de *B. cinerea* Bc008 a las 16 horas de incubación. **A.** Tratamiento control. **B.** Principio activo sin células. **C.** Principio activo con células.

Se seleccionó el caldo de fermentación completo de 48 h de incubación, incluyendo la biomasa de *P. fluorescens* Ps006 como el principio activo para iniciar el desarrollo del bioplaguicida, debido a que este presentó una mayor actividad biológica frente a los patógenos evaluados, que la obtenida con el caldo de fermentación sin células.

Desarrollo de la formulación mediante la selección del soporte sólido (vehículo) más compatible con el principio activo a base de *P. fluorescens* Ps006

pH:

El pH del sistema con el soporte S1 osciló entre 7,83 y 8,99 para las diferentes humedades y temperaturas de almacenamiento. Para el soporte S2 el pH estuvo entre 5,70 y 7,03, y para el soporte S3 osciló entre 8,55 y 9,66. Se evidenció que el soporte S2 tiene un carácter más ácido que los soportes S1 y S3. El pH de los tratamientos cambió significativamente ($F=1072$; $df=23$, $P<0,0001$) a través del tiempo a las tres temperaturas evaluadas para la mayoría de los tratamientos (Figura 4). Sin embargo, con el soporte S2 al 20% no se evidenció un cambio significativo del pH durante los tres meses de almacenamiento.

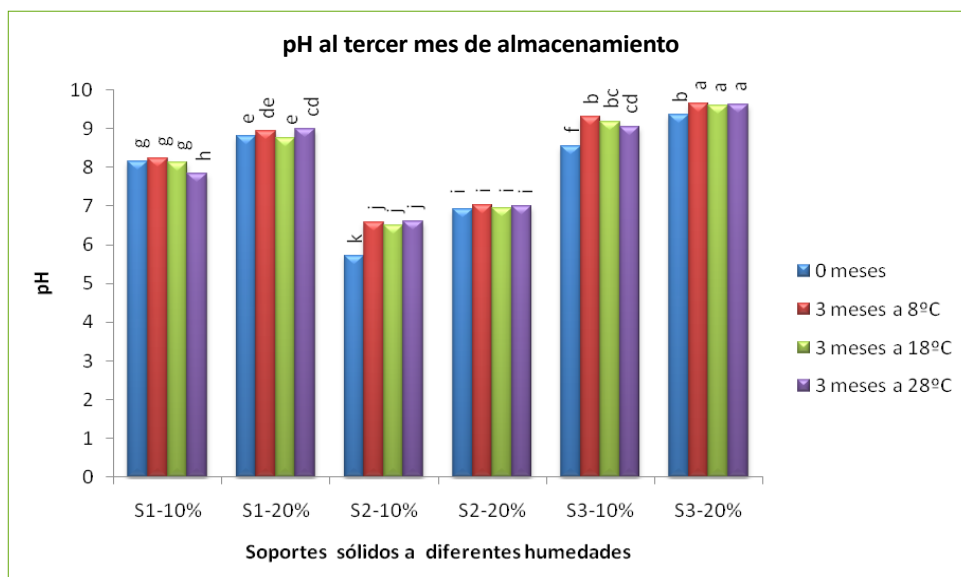


Figura 4. Cambio del pH de la mezcla del principio activo de Ps006 con soportes sólidos después de tres meses de almacenamiento a diferentes temperaturas. S1-10%: soporte 1 al 10% de humedad. S1-20%: soporte 1 al 20% de humedad. S2-10%: soporte 2 al 10% de humedad. S2-20%: soporte 2 al 20% de humedad. S3-10%: soporte 3 al 10% de humedad. S3-20%: soporte 3 al 20% de humedad. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey (95%).

El principio activo mezclado con el soporte S2 al 20% de humedad fue el sistema que presentó valores de pH más cercanos a la neutralidad (6,92 - 7,03), lo que probablemente favoreció la estabilidad del principio activo, considerando que las bacterias del género *Pseudomonas* tienen un pH óptimo cercano a 7 (Madigan *et al.*, 2009). Adicionalmente, esta característica fue estable durante los tres meses de almacenamiento, así como lo fue la viabilidad y la actividad, lo que podría sugerir que la estabilidad de la biomasa de Ps006 en almacenamiento se ve influenciada de manera importante por el pH del medio.

Viabilidad

Las viabilidades iniciales del principio activo con el soporte S1 al 10% y al 20% de humedad, el soporte S2 al 10% y al 20% de humedad y el soporte S3 al 10% y al 20% de humedad fueron de $1,4 \times 10^9$ UFC/g, $1,6 \times 10^9$ UFC/g, $1,7 \times 10^6$ UFC/g, $2,6 \times 10^7$ UFC/g, $1,3 \times 10^9$ UFC/g y $1,2 \times 10^9$ UFC/g, respectivamente. Después de tres meses de almacenamiento a una temperatura de 8°C se obtuvo para el soporte S1-10% una viabilidad de $7,7 \times 10^7$ UFC/g y para S1-20% de $2,3 \times 10^8$ UFC/g. Para el soporte S2 y S3 al 10% de humedad la viabilidad se redujo a $1,0 \times 10^2$ UFC/g, para S2-20% a $1,4 \times 10^7$ UFC/g y finalmente para el soporte S3-20% la viabilidad final fue de $5,8 \times 10^6$ UFC/g (Figura 5).

Los resultados expresados en UFC/g fueron analizados mediante una prueba de comparación de medias de Tukey (95%). Todos los tratamientos presentaron una disminución de la viabilidad a través del tiempo de almacenamiento. Sin embargo, esta reducción fue estadísticamente significativa ($F=23$; $df=23$; $P<0,0001$) para los soportes S1 y S3 a las dos humedades evaluadas y S2 al 10%, pero no para el soporte S2 al 20%, sugiriendo que a esta temperatura el principio activo fue más estable cuando se mezcló con el soporte S2 a la mayor humedad evaluada.

A $18 \pm 2^\circ\text{C}$ las viabilidades finales de Ps006 después de tres meses de almacenamiento fueron para el soporte S1-10% de $1,2 \times 10^7$ UFC/g y de $4,7 \times 10^7$ UFC/g para S1-20%. Para el soporte S2-10% fue de $1,0 \times 10^2$ UFC/g y para S2-20% de $2,1 \times 10^7$ UFC/g. Finalmente, para el soporte S3-10% fue de $1,0 \times 10^2$ UFC/g y de $2,6 \times 10^6$ UFC/g para S3-20%. Tanto a $18 \pm 2^\circ\text{C}$ como a $8 \pm 2^\circ\text{C}$ se evidenció una reducción progresiva y significativa ($F=231$; $df=23$; $P<0,0001$) de la viabilidad a través del tiempo de almacenamiento con los soportes S1 y S3 en las dos humedades evaluadas. Nuevamente el principio activo con el soporte S2 fue el tratamiento más estable, ya que no presentó diferencias significativas entre la viabilidad inicial y la obtenida después de tres meses de almacenamiento.

Cuando el almacenamiento se realizó a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ se obtuvo una viabilidad promedio a los tres meses de almacenamiento de $1,6 \times 10^6$ UFC/g para el soporte S1-10% y de $3,1 \times 10^6$ UFC/g para dicho soporte al 20% de humedad. Para el soporte S2-10% la viabilidad fue de $1,0 \times 10^2$ UFC/g y de $1,0 \times 10^7$ UFC/g para S2-20% y para el soporte S3-10% la viabilidad se redujo a $1,0 \times 10^2$ UFC/g y a $1,03 \times 10^3$ UFC/g para S3-20%. A $28 \pm 2^\circ\text{C}$ se observó la misma tendencia que en las temperaturas $8 \pm 2^\circ\text{C}$ y $18 \pm 2^\circ\text{C}$, con una disminución progresiva y significativa ($F=255$; $df=23$; $P<0,0001$) de la viabilidad a través del tiempo para los soportes S1 y S3 en las dos humedades evaluadas y el soporte S2 a la menor humedad. El soporte S2-20% nuevamente fue con el que se obtuvo la mayor estabilidad.

En la Figura 5 se presenta la pérdida total de viabilidad del principio activo después de tres meses de almacenamiento a las tres temperaturas evaluadas, donde se observa que para el soporte S1-10% se obtuvieron porcentajes de pérdida entre el 14% y el 31,9%, y para S1-20% entre el 9,6% y el 33,2%. Para el soporte S2-10% a las tres temperaturas se obtuvo una pérdida de viabilidad del 67,7% y para S2-20% la reducción de la viabilidad osciló entre el 2,3% y el 9,4%. Finalmente para el soporte S3-10% en las tres temperaturas se obtuvo una pérdida del 78,1% y para S3-20% de humedad reducciones entre el 25,7% y el 69,6%.

Con esta variable se evidencia que las humedades del 10% y 20% tuvieron un efecto en la estabilidad de Ps006, siendo la pérdida de viabilidad con los soportes S2 y S3 al 10%, significativamente ($F=402$; $df=17$; $P<0,0001$) mayor que para los

sistemas con el 20% de humedad. Esto puede deberse a que los tratamientos con el 20% de humedad incluyeron en sus componentes un tampón pH 7,5, el cual ejerce un control en el estado iónico de la formulación haciéndolo menos susceptible a cambios bruscos de pH. Esto posiblemente brindó mayor estabilidad al principio activo, ya que las fluctuaciones bruscas de pH pueden afectar la envoltura celular, la morfología celular y desnaturalizar enzimas.

Con el soporte S1 a las dos humedades y con los soportes S2 y S3 al 20% de humedad se observó que la pérdida de la viabilidad aumentó a medida que aumentó la temperatura de almacenamiento. Este efecto lo describieron Kinay y Ildis (2008), que evaluaron formulaciones de *Pichia guilliermondii* y observaron que las almacenadas a 4°C fueron más estables que las almacenadas a 24°C. Esto podría deberse a que a bajas temperaturas la velocidad de crecimiento de los microorganismos disminuye y los períodos de latencia se alargan considerablemente.

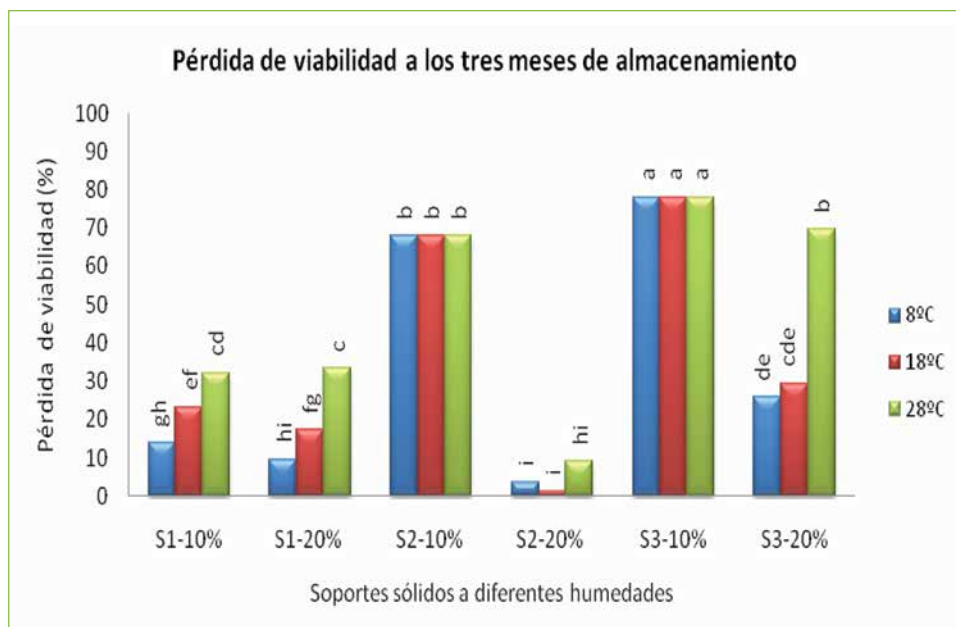


Figura 5. Pérdida de viabilidad del principio activo de *P. fluorescens* Ps006 almacenado con los soportes sólidos durante tres meses. S1-10%: soporte 1 al 10% de humedad. S1-20%: soporte 1 al 20% de humedad. S2-10%: soporte 2 al 10% de humedad. S2-20%: soporte 2 al 20% de humedad. S3-10%: soporte 3 al 10% de humedad. S3-20%: soporte 3 al 20% de humedad. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey (95%).

Actividad biocontroladora

Para el soporte S1-10% la actividad se redujo entre el 76,4% y el 97,6%, y para S1-20% entre el 79,5% y el 100% a las tres temperaturas evaluadas. Respecto a los

soportes S2 y S3 al 10% de humedad se obtuvo una pérdida total de actividad después de tres meses de almacenamiento a las tres temperaturas (Figura 6). Para el soporte S2-20% se presentaron pérdidas del 16,1% al 41,7%. Finalmente, para el soporte S3-20% a $8 \pm 2^\circ\text{C}$ se obtuvo una pérdida de actividad antagónica del 10,2% a $18 \pm 2^\circ\text{C}$ del 13,7% y a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ del 100%.

Se observó que la temperatura no tuvo un efecto significativo sobre la pérdida de la actividad antagónica para los tres soportes evaluados a las humedades del 10% y del 20%, a excepción del soporte S3-20%, con el que se obtuvo una pérdida significativamente mayor a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ que a $8 \pm 2^\circ\text{C}$ y a $18 \pm 2^\circ\text{C}$. La humedad de los sistemas tuvo un efecto significativo sobre la actividad antagónica del principio activo de Ps006 mezclado y almacenado con los soportes S2 y S3, siendo más estables las mezclas con el 20% de humedad. La pérdida de viabilidad del soporte S2 con una humedad del 20% fue significativamente menor que la del resto de los tratamientos, resultado coherente con el obtenido para la variable pérdida de actividad biocontroladora, con la cual fue el tratamiento más estable.

Resultados similares observaron Wiyono y colaboradores (2008), que reportaron que formulaciones de *P. fluorescens* B5 en soportes sólidos como aserrín, tierra de diatomeas, bentonita, harina de algodón y turba con un contenido de humedad del 60%, tuvieron mayor actividad antagónica que aquellas con un contenido de humedad del 10%.

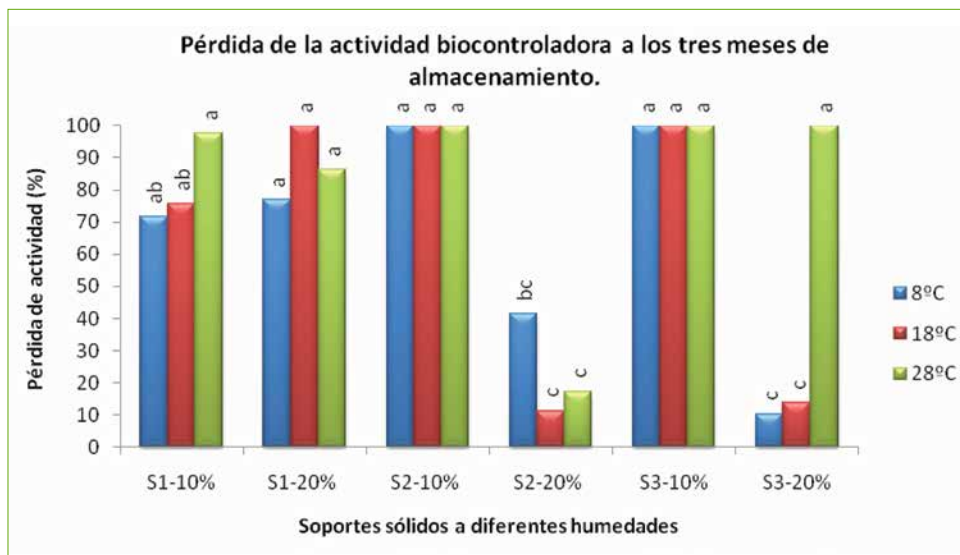


Figura 6. Pérdida de la actividad biocontroladora del principio activo de *P. fluorescens* Ps006 almacenado con soportes sólidos durante tres meses. S1-10%: soporte 1 al 10% de humedad. S1-20%: soporte 1 al 20% de humedad. S2-10%: soporte 2 al 10% de humedad. S2-20%: soporte 2 al 20% de humedad. S3-10%: soporte 3 al 10% de humedad. S3-20%: soporte 3 al 20% de humedad. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey (95%).

Aunque la inhibición del crecimiento diametral de *S. sclerotiorum* Sc021 no fue significativa en ciertos tratamientos, se observó el estrés causado por la presencia de Ps006 sobre el crecimiento del hongo. Como se evidencia en la Figura 7A, el crecimiento del patógeno fue irregular, con presencia de estructuras de resistencia (esclerocios). En la Figura 7B se observa la colonia estresada que formó estructuras de resistencia muy cerca al punto de inoculación del patógeno, después se observa una zona de escaso crecimiento micelial que llega hasta el borde de la caja Petri y en toda la superficie del medio de cultivo se puede apreciar el crecimiento de Ps006, como pequeñas colonias color crema. En la Figura 7C se observa un claro efecto inhibitorio en el crecimiento de la colonia de *S. sclerotiorum* Sc021, y alrededor de esta se puede evidenciar el abundante crecimiento de Ps006.

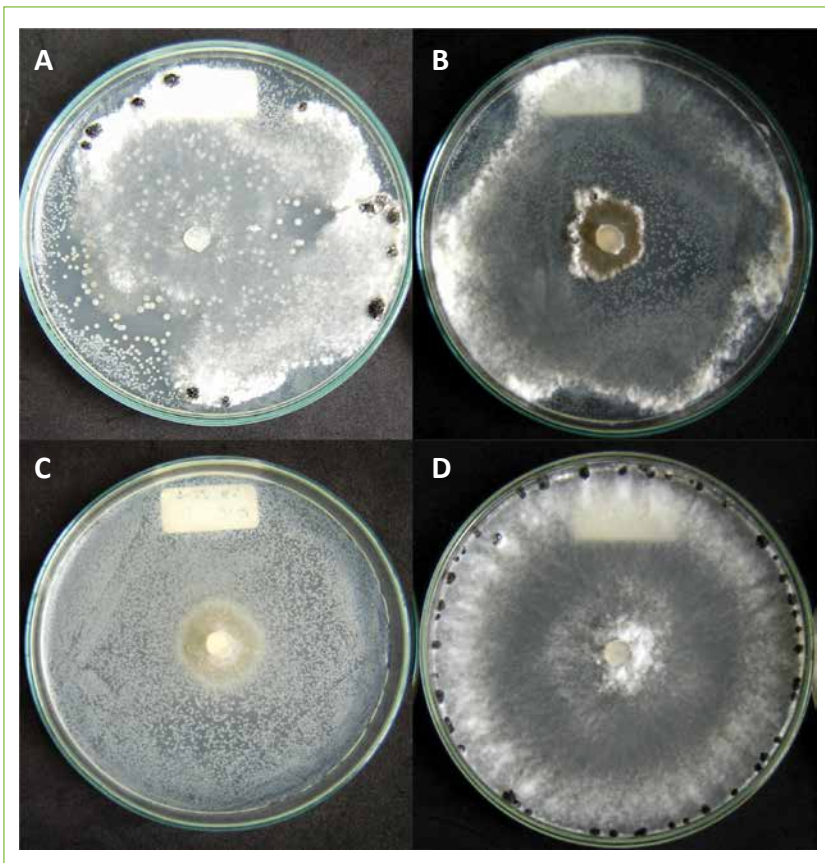


Figura 7. Inhibición del crecimiento diametral de *S. sclerotiorum* Sc021 por efecto del principio activo de Ps006 mezclado con soportes sólidos después de tres meses de almacenamiento. **A.** S1-10% a 18°C. **B.** S2-20% a 8°C. **C.** S3-20% a 8°C. **D.** Tratamiento control (sin inóculo bacteriano).

Finalmente, en la Figura 7D se presenta el crecimiento en el tratamiento control, con un completo desarrollo de la colonia sobre toda la superficie del medio de cultivo hasta el borde de la caja Petri, con una marcada producción de estructuras de resistencia en el perímetro de la colonia.

Los resultados del estudio de compatibilidad permitieron seleccionar el principio activo con células, mezclado con el soporte S2 al 20% de humedad, como el sistema de entrega base para el desarrollo de un bioplaguicida para el control de fitopatógenos.

Referencias bibliográficas

1. Burges, H.D. 1998. *Formulation of microbial biopesticides, beneficial microorganisms, nematodes and seed treatment*. Gran Bretaña: Kluwer Academic Publishers. 412 p.
2. Commare, R. Nandakumar, R. Kandan, A. Suresh, S. Bharathi, M. Raguchander, T. & Samiyappan, R. 2002. *Pseudomonas fluorescens* based Bio-formulation for the management of sheath blight disease and leafhopper insect in rice. *Crop Protection*. 21. Pp. 671-677.
3. Fernández, C. & Juncosa, R. 2002. Biopesticidas: ¿la agricultura del futuro? *Phytoma*. 141. Pp. 14-19.
4. Fernando, W.G. Nakkeeran, S. Zhang, Y. & Savchuk, S. 2007. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* species on canola petals. *Crop Protection*. 26. Pp. 100-107.
5. Gómez, M.I. Díaz, A. Forero, M. & Pérez, O. 2000. *Producción masiva, separación, secado y formulación de microorganismos biocontroladores*. Manual de prácticas de laboratorio y campo. I Curso Taller Internacional. Control Biológico. Corpoica, Centro de Investigación Tibaitatá, Colombia. Pp. 46-53.
6. Khanam, N.N. Ueno, M. Kihara, J. Honda, Y. & Arase, S. 2005. Suppression of red light-induced resistance in broad beans to *Botrytis cinerea* by salicylic acid. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 66. Pp. 20-29.
7. Kinay, P. & Ildis, M. 2008. The shelf life and effectiveness of granular formulations of *Metschnikowia pulcherrima* and *Pichia guilliermondii* yeast isolates that control postharvest decay of citrus fruit. *Biological Control*. 45. Pp. 433-440.
8. Madigan, M. T. Martinko, M. Dunlap, P.V. & Claric, D.P. 2009. *Brock biología de los microorganismos*. Edición 12. Madrid, España: Pearson Educación, S. A. 1296 p.
9. Manikandan, R. Saravanakumar, D. Rajendran, L. Raguchander, T. & Samiyappan R. 2003. Standardization of liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pf1 for its efficacy against *Fusarium* wilt of tomato. *Biological Control*. 54. Pp. 83-89.
10. Mikani, A. Etebarian, H.R. Sholberg, P.L. O'Gorman, D.T. Stokes, S. & Alizadeh, A. 2008. Biological control of apple gray mold caused by *Botrytis mali* with *Pseudomonas fluorescens* strains. *Postharvest Biology and Technology*. 48. Pp. 107-112.
11. Rabrindran, R. & Vidhyasekaran, P. 1996. Development of a formulation of *Pseudomonas fluorescens* PfALR2 for management of rice sheath blight. *Crop Protection*. 15 (8). Pp. 715-721.

12. Sastoque, E. 2010. *Producción, caracterización y evaluación de la actividad biológica de biosurfactantes (Ramnolípidos) a partir rizobacterias de fique (Furcraea spp)*. Tesis de maestría en ciencias biológicas. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 146 p.
13. Valencia, E. Villegas, J. Sánchez, J. Peña, J. & Fariás, R. 2005. Inhibición de *Fusarium oxysporum* por cepas mutantes de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 incapaces de producir sideróforos. *Terra Latinoamericana*. 23 (1). Pp. 81-88.
14. Wiyono, S. Schulz, D.F. & Wolf, G.A. 2008. Improvement of the formulation and antagonistic activity of *Pseudomonas fluorescens* B5 through selective additives in the pelleting process. *Biological Control*. 46. Pp. 348-357.

Producción editorial:
Diagramación, impresión y encuadernación



Tel: 893 7710 Bogotá, DC, Colombia

www.produmédios.org