

ANTAGONISMO DE *Pseudomonas fluorencens* Migula FRENTE A *Fusarium oxysporum* fsp. *pisi* Schtdl EN ARVEJA *Pisum sativum* L. EN NARIÑO, COLOMBIA *

ANTAGONISM OF *Pseudomonas fluorescens* Migula FACING *Fusarium oxysporum* fsp. *pisi* Schtdl ON PEA *Pisum sativum* L. IN NARIÑO, COLOMBIA *

Germán Andrés Guerra Herrera¹

Carlos Betancourth García²

RESUMEN

El presente trabajo se realizó en el laboratorio e invernadero de la Universidad de Nariño, situado a una altura de 2486 msnm a una temperatura promedio de 13 °C, con el fin de evaluar el antagonismo de *P. fluorencens* frente a *F. oxysporum* en arveja *P. sativum* L. El aislamiento de *F. oxysporum* se realizó tomando tejidos afectados de raíces y tallos de plantas de arveja, los cuales fueron purificados y multiplicados en PDA, la selección de la cepa se hizo con base en la prevalencia en todas las zonas y por la velocidad en su crecimiento, obteniéndose la cepa FTR. El aislamiento de *P. fluorencens* se hizo de raíces y tallos de plantas sanas de arveja que se encontraban en focos con amarillamiento, los cuales fueron purificados y multiplicados en medio selectivo Agar Cetrimide, obteniendo las cepas PPC, PPO y PPL; después de haber realizado pruebas bioquímicas. Las pruebas duales se hicieron en medio Agar Nutriente, en la cual la cepa PPC presentó mayor antagonismo para controlar el crecimiento de *F. oxysporum* bajo condiciones *In vitro* en el laboratorio. En las pruebas de invernadero la incidencia de la enfermedad pasó de un 90.31% a 6.55% con la bacteria con respecto al testigo, mostrando la eficiencia antagónica de la cepa PPC de *P. fluorencens* en el control de *F. oxysporum* en condiciones controladas.

Palabras claves: Control Biológico, Evaluación *In Vitro*, incidencia, Hongo, Bacteria.

* Documento presentado a la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Nariño como requisito parcial para optar por el Título de Ingeniero Agrónomo.

¹ Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Nariño. Pasto, Colombia. E-mail: germanandresguerra@gmail.com

² Profesor Asistente, M.Sc. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Nariño. Pasto, Colombia.

ABSTRACT

This investigation was carried out in the laboratory and greenhouse of the University of Nariño, located at 2486 masl to an average temperature of 13 ° C., in order to evaluate the antagonism of *P. fluorescent* facing *F. oxysporum* on pea *Pisum sativum* L. The isolation of *F. oxysporum* affected tissue was made from roots and stems of pea plants, which were multiplied and purified on PDA, strain selection was based on the prevalence in all zones and the speed in their growth, obtaining the strain FTR. The isolation of *P. fluorescent* was made from roots and stems of healthy pea plants that were in focus with yellowing, which were purified and multiplied in Selective Cetrimide Agar, obtaining strains PPC, PPO and PPL; after biochemical tests. The tests were made in dual in medium Nutrient Agar, in which the strain showed higher PPC antagonism to control the growth of *F. oxysporum* under *In vitro* conditions in the laboratory. In greenhouse tests the incidence rose from 90.31% to 6.55% with the bacteria compared with the control, showing the efficiency of the antagonistic strain *P. fluorencens* PPC in the control of *F. oxysporum* under controlled conditions.

Key words: Biological Control, *In vitro* Assessment, Incidence, fungi, bacteria.

INTRODUCCIÓN.

En Colombia la arveja (*Pisum sativum* L.) es cultivada en minifundios localizados en zonas de ladera, en alturas comprendidas entre los 2000 y 3000 msnm, con temperaturas promedios de 12 a 17°C (Tamayo, 2002).

El amarillamiento causado por *F. oxysporum* en arveja, es una de las enfermedades prevalentes y dañinas, siempre y cuando se cultiven intensivamente. Esta enfermedad puede ocasionar pérdidas considerables, especialmente en variedades susceptibles y bajo condiciones climáticas favorables para el desarrollo del patógeno. Se caracteriza por el

achaparramiento de las plantas, las cuales en poco tiempo se marchitan y finalmente mueren (FENALCE, 2007).

En el departamento de Nariño al no encontrarse variedades resistentes al amarillamiento causado por *Fusarium sp.*, la rotación de cultivos y sistemas de prevención, aun cuando sean métodos seguros, tienen un valor limitado y el control químico es uno de los métodos más utilizados, pero no es suficiente ya que el hongo se encuentra ampliamente distribuido y es persistente en los suelos, y en tiempos de lluvia la incidencia de la enfermedad incrementa a escalas epidémicas con pérdidas considerables para los agricultores (FENALCE, 2005).

Según Lim, *et al.*, 1991; Loper y Buyer, 1991; Mukerji, 2004 y Matthijs, *et al.*, 2007, *P. fluorencens*, ha sido registrado como antagonista de *F. oxysporum*. Por otra parte, en la actualidad se están estudiando nuevas formas de manejo fitosanitario para el control de plagas y enfermedades, puesto que los mercados internacionales tienen estrictas medidas para el ingreso de productos agrícolas con trazas de productos químicos como se establece en el Acuerdo de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias (MSF), (OMC, 2008), por lo cual se crea la necesidad de adoptar nuevas alternativas de manejo.

Las bacterias del género *Pseudomonas*, tienen un gran potencial de degradación de compuestos aromáticos y xenobióticos, presenta la capacidad de colonizar el sistema radicular de plantas, formar biopelículas y de ser manejable desde el punto de vista genético (Matthijs *et al.*, 2007).

Las *Pseudomonas fluorescens* son microorganismos habitantes del suelo, estas son predominantemente numerosas en la microflora de la rizosfera de muchas plantas, siendo las primeras en colonizar las raíces jóvenes. Mucho de estos organismos suprimen enfermedades en las plantas, protegiendo las raíces y semillas de la infección de los patógenos presentes en el suelo (Weller, 1988).

Con base en lo anteriormente expuesto se planteó el siguiente objetivo: Aislar desde la rizosfera de plantas de arveja, cepas de *P. fluorencens* para evaluar antagonismo contra *F. oxysporum fsp. pisi*. en condiciones de laboratorio e invernadero, sobre las variedades de arveja ICA CORPOICA Sindamanoy, Obonuco Andina, Obonuco San Isidro y Santa Isabel.

METODOLOGÍA

Localización. El Presente Trabajo se realizó en el laboratorio de microbiología e invernadero de la Universidad de Nariño, en la sede de Torobajo (Pasto, Nariño), situado a una altura de 2486 msnm y a una temperatura promedio de 13 °C.

Recolección de muestras. Para el aislamiento de las *P. fluorencens* como de *F. oxysporum*, las muestras se recolectaron en lotes de arveja ubicados en los municipios de Potosí, Ipiales, Pupiales, Yacuanquer, Imués, Tangua y los corregimientos de Mapachico, Catambuco y La Laguna en el municipio de Pasto.

FASE DE LABORATORIO

Aislamiento y purificación de *F. oxysporum*. Se tomaron tejidos afectados de raíces y tallos, se cortaron trozos de 5 mm de lado, los cuales se desinfectaron durante dos minutos en hipoclorito de sodio al 0.5%, luego se hizo un enjuague durante un minuto en agua destilada. Posteriormente se colocaron los cortes sobre papel filtro esterilizado hasta que no se observó humedad. Para la siembra, se colocaron cuatro trozos en cajas de Petri con Agar PDA formando un cuadrado, luego se llevó a la incubadora, graduada entre 25°C y 28°C y se observó diariamente la aparición de colonias, según la metodología utilizada por Ávila (2003). Se sembraron cinco cajas Petri con PDA, por cada sitio donde se recolectó el material infectado.

Selección de *F. oxysporum*. Se evaluó el crecimiento de las cepas durante quince días en cajas Petri con PDA; las mediciones se hicieron en milímetros día y se realizaron con un calibrador pie de rey, seleccionando únicamente la cepa con una mayor velocidad de crecimiento y prevalencia en las zonas en estudio de acuerdo a su coloración.

Aislamiento e identificación de *P. fluorencens spp.* Para el aislamiento, el material vegetal se seleccionó de plantas sanas en donde se presentaban focos de amarillamiento, en este caso de las raíces de plantas, se cortó en trozos de 5 m.m. de longitud y se depositó inmediatamente en beakers de vidrio con 300 ml de agua estéril desionizada; después de agitar manualmente durante 15 minutos, éstos se secaron ligeramente en toallas de papel estériles, se tomaron los trozos de tejido, de cada uno de los sitios de procedencia, este material se colocó en cajas Petri con 20 ml de Agar Cetrimide (MERCK 5284), que es selectivo para *P. fluorencens*. Para la purificación se tomaron colonias individuales que fueron llevadas a cajas Petri con Agar Cetrimide y Agar King B (utilizado únicamente para pruebas de fluorescencia) (Pérez y Leguizamón, 1998).

Selección de *P. fluorencens*. La selección de las cepas de la bacteria se hizo únicamente con las colonias que dieron positivo a pruebas de Fluorescencia, negativas a tinción de Gram y positivas para oxidasa (Matthijs *et al.*, 2007).

Pruebas de antagonismo *In vitro* y evaluación. El crecimiento dual se realizó en cajas Petri con Agar Nutriente, puesto que en PDA el desarrollo de la bacteria es mínimo; para este procedimiento se sembraron discos de 10 mm de diámetro de la colonia pura de *F. oxysporum*, que fue extraída previamente con sacabocados en los extremos de la caja Petri con PDA; para la colonia pura de *P. fluorencens* fue extraída previamente de cajas con medio de cultivo Agar Cetrimide y sembrada tres días después en la misma caja Petri a una distancia de 70 mm de la colonia de *F. oxysporum*, usando de igual forma un disco de 10 mm de diámetro de cada cepa.

La incubación se hizo a temperatura ambiente con un monitoreo diario durante 45 días, las mediciones del crecimiento del hongo, la bacteria y el halo de inhibición se hicieron en milímetros día y fueron realizadas con un calibrador pie de rey, siendo suspendidas hasta que el halo de inhibición de la bacteria logró crecer hasta el extremo opuesto del crecimiento micelial del hongo.

Se realizó un Diseño Irrestrictamente al Azar con tres tratamientos y cinco repeticiones, los tratamientos correspondieron a las tres cepas bacterianas.

Análisis estadístico. Los resultados obtenidos se analizaron mediante un Análisis de Varianza y una Prueba de Significancia de Tukey en el programa estadístico Infostat Profesional 1.1

FASE DE INVERNADERO

Las pruebas de invernadero se realizaron con cuatro variedades de arveja ICA CORPOICA Sindamanoy (ICS), Obonuco Andina (OA), Obonuco San Isidro (OSI), Santa Isabel (SI).

Se realizó un Diseño irrestrictamente al Azar con arreglo factorial 4 x 4 que correspondieron a dieciséis tratamientos y cinco repeticiones, la unidad experimental estuvo compuesta por 5 plantas sembradas individualmente en bolsas de 1 Kg.

Tipos de inóculo:

- **Inoculación con *Pseudomonas*:** consistió en semillas de arveja previamente inoculadas durante 24 horas, en una solución de 50 c.c. de agua esterilizada y *P. fluorescens* a una concentración de 9×10^6 ufc/ml, obtenidas en la cámara de Neubauer, las semillas fueron inoculadas un día antes de la siembra (Pérez *et al.*, 2000).

- **Inoculación con *Fusarium*:** consistió en semillas de arveja sin inoculación bacteriana, en este tratamiento únicamente se inoculó el sustrato siete días previos a la siembra con *F. oxysporum*, con una solución de 50 c.c. de agua esterilizada y *F. oxysporum* a una concentración de 1×10^6 conidias por mililitro, obtenidas en la cámara de Neubauer, siendo aplicada esta solución por bolsa (Botina y Yarpaz, 2008).
- **Inoculación con *Fusarium*+*Pseudomonas*:** consistió en sustrato inoculado siete días previos a la siembra con *F. oxysporum*, en una solución de 50 c.c. de agua esterilizada a una concentración de 1×10^6 conidias por mililitro, obtenidas en la cámara de Neubauer, siendo aplicada esta solución por bolsa; y semillas de arveja previamente inoculadas 24 horas antes de la siembra, en una solución 50 c.c. de agua esterilizada y *P. fluorescens* con una concentración de 9×10^6 ufc/ml, obtenidas en la cámara de Neubauer, las semillas fueron inoculadas un día antes de la siembra (Pérez *et al.*, 2000; Botina y Yarpaz, 2008).
- **Testigo:** Sin ningún tipo de inoculación en las semillas de arveja y el sustrato.

Variabes evaluadas. El porcentaje de emergencia se evaluó durante los primeros siete días posteriores a la siembra, con la siguiente fórmula: Porcentaje de emergencia = (Número de plántulas emergidas / Número de semillas sembradas) x 100. La variable días a emergencia se evaluó durante los primeros siete días posteriores a la siembra, contando el número de días que se tardó en emerger cada semilla en la bolsa. La incidencia de la enfermedad se evaluó por la sintomatología de las plantas descrita por Benavides y Muñoz (1998); y Agrios (2002), ésta evaluación se realizó durante sesenta días.

Análisis estadístico. Los resultados obtenidos se sometieron a un Análisis de Varianza y una Prueba de Significancia de Tukey en el programa estadístico Infostat Profesional 1.1. Además, para el análisis de varianza del porcentaje de emergencia y el de incidencia se realizó una transformación con la fórmula: $\text{Arcosen } \sqrt{X}$.

RESULTADOS Y DISCUSION

FASE DE LABORATORIO

Aislamiento, identificación y selección de cepas de *F. oxysporum*. En el muestreo realizado en las distintas zonas en estudio del Departamento de Nariño con problemas de amarillamiento en arveja, se obtuvieron tres tipos de cepas de *F. oxysporum* (Tab. 1), estas muestras presentaron macroconidias curvadas y pluriseptadas, con una célula apical más o menos puntiaguda (Fig. 1E y 1F), también se encontró microconidias unicelulares, similares en ancho a los macroconidias, con una base redondeada o truncada, el micelio encontrado fue denso y algodonoso correspondientes al género *Fusarium* (Booth, 1971; Alexopoulos *et al.*, 1991).

Tabla 1. Distribución de las cepas de *F. oxysporum*.

ZONA	COLOR	ROJO	ROSADO	ANARANJADO
ZONA CENTRO	CATAMBUCO	X		X
	MAPACHICO	X	X	
	LA LAGUNA	X		
ZONA CEREALISTA	YACUANQUER	X	X	
	IMUES	X		X
	TANGUA	X	X	X
ZONA SUR	IPIALES	X		
	PUPIALES	X	X	
	PÔTOSI	X		X

En la zona Centro se encontraron cinco cepas, en la zona Cerealista se encontraron siete cepas y en la zona Sur se encontraron cinco cepas, siendo la más abundante la de coloración rojiza. Según Seifert (2001), las colonias de los distintos *F. oxysporum* que crecen moderada a profusamente, tienen diversos colores, especialmente en el reverso de la colonia, excepto pardo oscuro o negro.

La selección de la cepa de *F. oxysporum* se basó en el crecimiento de las cepas, encontrándose que la cepa FTR correspondiente al municipio de Tangua de color rojo (Fig. 1A), tuvo un promedio de crecimiento 0.2 mm/día de radio más que las otras cepas

asiladas; esta cepa al igual que las otras de la misma coloracion encontradas en todas las zonas en estudio, obtuvieron un promedio de crecimiento similar por lo que fue indiferente la utilizacion de una cepa específica en particular de la misma coloracion.

Aislamiento, identificación y selección de cepas de *P. fluorencens*. Terminado el procedimiento de aislamiento y purificación de las cepas bacterianas, se obtuvo que las cepas fueron Gram negativas (Fig. 1G), se observó al microscopio bacilos cortos y curvados; además, fueron positivas para las pruebas de fluorescencia bajo luz ultra violeta y de oxidasa, según los resultados obtenidos en las pruebas correspondientes, se afirma que son *P. fluorencens*, comparado con los parámetros establecidos por Matthijs *et al.*, (2007) y Booth (1971).

Se seleccionaron tres cepas potenciales de *P. fluorencens* que fueron las encontradas en el municipio de Pasto corregimiento de Catambuco PPC (Fig. 1B), en el municipio de Potosi PPO (Fig. 1C) y una última en el municipio de Pasto corregimiento de La Laguna PPL (Fig. 1D).

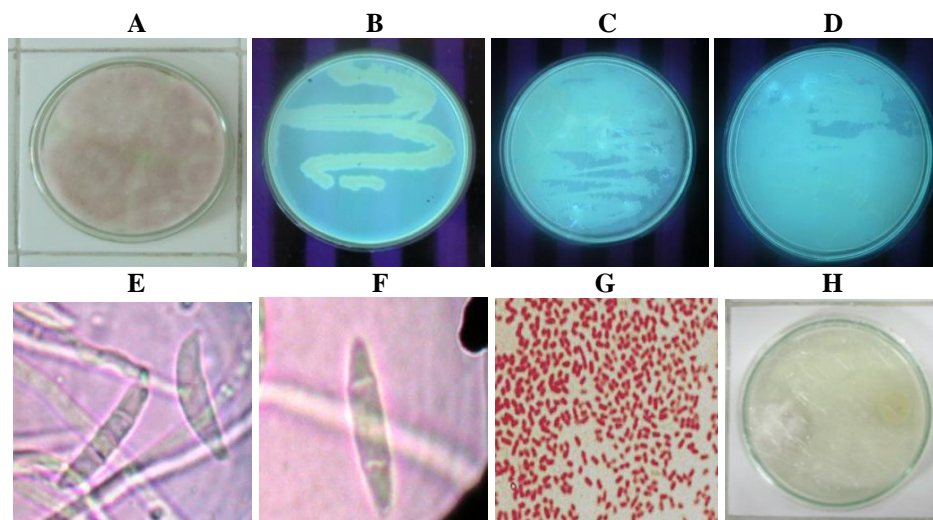


Figura 1. Aislamiento y Identificación de cepas de *F. oxysporum* y *P. fluorencens*.

A. Cepa de *F. oxysporum* FTR de coloración rojiza. **B.** Cepa de *P. fluorencens* PPC. **C.** Cepa de *P. fluorencens* PPO. **D.** Cepa de *P. fluorencens* PPL. **E.** Conidioforo. **F.** Acercamiento macroconidia septada en 3. **G.** *P. fluorencens* al microscopio (Tinción de Gram). **H.** Antagonismo.

ANTAGONISMO *In vitro* FASE LABORATORIO

Crecimiento micelial después del encuentro del hongo y de la bacteria. La longitud del halo de inhibición de *P. fluorencens* frente a *F. oxysporum* después del punto de encuentro se obtuvo diferencias estadísticas significativas; como se registran en el análisis de varianza, Tab.2.

Tabla 2. Análisis de varianza y comparación de los promedios de longitud del halo de inhibición *In vitro* dada en mm, de las tres cepas de *P. fluorencens* utilizando prueba de Tukey 95%.

FV	GL	SC	CM	FC	FT
TRATAMIENTOS	2	414,12	207,06	8,79*	0,0045
ERROR	12	282,60	23,55		
TOTAL	14	696,72			

*: Diferencias Significativas ($p \leq 0,05$)

TRATAMIENTO	CEPA BACTERIANA	MEDIDA	AGRUPACIÓN TUKEY
1	PPC	11,38	A
2	PPO	0,45	B
3	PPL	0,03	B

Tratamientos con letras distintas indican diferencias significativas

Al comparar los promedios de longitud de invasión en mm, y utilizando prueba de Tukey, como se observa en el Tab.2, se determinó que la longitud promedio del halo de inhibición fue de 11.38 mm en presencia de la cepa bacteriana PPC presentó diferencias significativas en relación a los tratamientos anteriores, a diferencia de de la longitud promedio presentada en presencia de las cepas bacterianas PPO y PPL con 0.45 mm y 0.03 mm no presentaron diferencias estadísticas significativas.

FASE DE INVERNADERO

Evaluación de los días a emergencia. En los días a emergencia se determinó que las variedades de arveja ICA CORPOICA Sindamanoy, Obonuco Andina, Obonuco San Isidro y Santa Isabel, con el sistema de inoculación con *Pseudomonas* presentó en promedio el menor número de días a emergencia con 4.7 días; además, el sistema de inoculación con *Fusarium+Pseudomonas* con 5.1 días, presentó los menores días a emergencia respecto al

testigo con 5.65 días, debido esto a la previa inoculación con *P. fluorencens* que actuó como agente promotor de desarrollo y crecimiento concordando con lo encontrado por García (2007).

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) como las *P. fluorencens* se destacan por sus efectos positivos tanto para las plantas como para los ecosistemas, este efecto se manifiesta a través de diferentes mecanismos de acción, hay una cierta proporción posiblemente se deban a efectos antimicrobiales directos o indirectos, ya que muchos estudios arrojaron que las *P. fluorencens* inhiben el crecimiento y deterioran algunos microorganismos patógenos entre ellos *F. oxysporum* Cook (1993).

Los días a emergencia con el sistema de inoculación con *Fusarium* con un promedio de 6.35 días, fue el que más retrasó tuvo con respecto al testigo y a los sistemas de inoculación de *Pseudomonas* y de *Fusarium+Pseudomonas*, esto debido a la presión ejercida por el patógeno, que impide el desarrollo en el proceso de germinación y emergencia de la plántula (Agrios, 2002).

Evaluación del porcentaje de emergencia. En el análisis de varianza (Tab.3) el porcentaje de emergencia se encontró diferencias estadísticas altamente significativas entre las inoculaciones, al igual que entre las variedades de arveja. En la interacción se encontraron diferencias estadísticas significativas, indicando que las inoculaciones y las variedades no actúan independientemente sobre el porcentaje de emergencia.

Tabla 3. Análisis de varianza y comparación de los promedios del porcentaje de emergencia utilizando prueba de Tukey 95%.

FV	GL	SC	CM	FC	p-valor
INOCULACIONES	3	1,4307	0,4769	289,61**	<0,0001
VARIEDADES	3	0,0806	0,0269	16,31**	<0,0001
INOC.. * VAR.	9	0,0413	0,0046	2,79*	0,0081
ERROR	64	0,1054	0,0016		
TOTAL	79	1,6579			

** : Diferencias Altamente significativas ($p \leq 0,0001$) * : Diferencias Significativas ($p \leq 0,05$)

INOCULACIONES	VARIEDAD	MEDIA	AGRUPACIÓN TUKEY
<i>Pseudomonas</i>	SAN ISIDRO	99,50	A
<i>Pseudomonas</i>	SANTA ISABEL	99,00	A
<i>Pseudomonas</i>	ANDINA	98,50	AB
<i>Pseudomonas</i>	SINDAMANOY	98,50	AB
<i>Fusarium+Pseudomonas</i>	SAN ISIDRO	97,50	BC
<i>Fusarium+Pseudomonas</i>	ANDINA	97,00	BC
<i>Fusarium+Pseudomonas</i>	SANTA ISABEL	96,50	CD
<i>Fusarium+Pseudomonas</i>	SINDAMANOY	96,00	CD
Testigo	ANDINA	94,00	DE
Testigo	SAN ISIDRO	94,00	DE
Testigo	SINDAMANOY	93,50	DE
Testigo	SANTA ISABEL	93,50	DE
<i>Fusarium</i>	ANDINA	88,50	E
<i>Fusarium</i>	SAN ISIDRO	88,00	E
<i>Fusarium</i>	SANTA ISABEL	85,00	F
<i>Fusarium</i>	SINDAMANOY	84,50	F

Tratamientos con letras distintas indican diferencias significativas

Al comparar los promedios de los porcentajes de emergencia y utilizando la prueba de Tukey, como se observa en el Tab.3, se determinó que los más altos porcentajes de emergencia los presentaron las variedades San Isidro, Santa Isabel, Andina y Sindamanoy con el sistema de inoculación de *Pseudomonas* con 99.50, 99 y 98.5% de emergencia, presentando promedios estadísticos similares entre sí. Distinto estadísticamente al sistema de inoculación de las variedades San Isidro, Andina, Santa Isabel y Sindamanoy con el sistema de inoculación *Fusarium+Pseudomonas*; al igual que de de las variedades Andina, San Isidro, Santa Isabel y Sindamanoy con el sistema de inoculación *Fusarium* y de los Testigos con respecto a los testigos Andina, San Isidro, Santa Isabel y Sindamanoy.

Las variedades San Isidro, Andina, Santa Isabel y Sindamanoy con el sistema de inoculación *Fusarium+Pseudomonas* con 97.5%, 97%, 96.5% y 96% respectivamente, presentaron promedios similares entre sí y distintos a las variedades Andina, San Isidro, Santa Isabel y Sindamanoy con el sistema de inoculación *Fusarium* con 88.5%, 88%, 85% y 84.5% de emergencia que presentaron promedios similares entre sí y diferentes al nivel de significancia ($p \leq 0,05$), con respecto a los Testigos Andina y San Isidro con 94%; y de Sindamanoy y Santa Isabel con 93.5% de emergencia.

Las variedades Andina, San Isidro, Santa Isabel y Sindamanoy con los sistemas de inoculación *Pseudomonas* y *Fusarium+Pseudomonas* tuvieron el más alto porcentaje de

emergencia con respecto al testigo y a las inoculaciones con *Fusarium*, debido a que las *P. fluorencens* además de proteger las plantas al ataque de patógenos, también son rizobacterias promotoras de crecimiento dando como resultado una reducción en la severidad de las distintas enfermedades fungosas que se puedan presentar y un aumento en el desarrollo de las plantas (Alström, 1991).

Las *Pseudomonas spp.* poseen la propiedad de producir sustancias, cuyas principales ventajas son las de estimular la germinación de las semillas, acelerar el crecimiento de las plantas especialmente en sus primeros estadios, inducir la iniciación radicular e incrementar la formación de raíces y pelos radiculares (Cornelis, 2008).

Evaluación del Porcentaje de Incidencia de la enfermedad. Se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas entre los tratamientos; entre las variedades de arveja se encontraron diferencias estadísticas significativas. En la interacción se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas, indicando que las inoculaciones y las variedades no actúan independientemente sobre el porcentaje de incidencia, como se registra en el análisis de varianza, Tab.4.

Tabla 4. Análisis de varianza y comparación de los promedios del porcentaje de incidencia de la enfermedad utilizando prueba de Tukey 95%.

FV	GL	SC	CM	FC	p-valor
INOCULACIONES	3	50,06	16,69	1711,90**	<0,0001
VARIEDADES	3	0,17	0,06	5,65*	0,0017
INOC.. * VAR..	9	0,56	0,06	6,33**	<0,0001
ERROR	64	0,62	0,01		
TOTAL	79	51,40			

** : Diferencias Altamente significativas ($p \leq 0,0001$) * : Diferencias Significativas ($p \leq 0,05$)

INOCULACIONES	VARIEDAD	MEDIA	AGRUPACIÓN TUKEY
<i>Fusarium</i>	SAN ISIDRO	92,64	A
<i>Fusarium</i>	ANDINA	90,98	A
<i>Fusarium</i>	SANTA ISABEL	88,86	A
<i>Fusarium</i>	SINDAMANOY	88,76	A
<i>Fusarium+Pseudomonas</i>	SINDAMANOY	8,98	B
<i>Fusarium+Pseudomonas</i>	SANTA ISABEL	8,98	B
<i>Fusarium+Pseudomonas</i>	SAN ISIDRO	4,16	C
<i>Fusarium+Pseudomonas</i>	ANDINA	4,08	C
Testigo	SINDAMANOY	0,54	D
Testigo	ANDINA	0,52	D
Testigo	SAN ISIDRO	0,00	D
<i>Pseudomonas</i>	SAN ISIDRO	0,00	D
<i>Pseudomonas</i>	SANTA ISABEL	0,00	D
<i>Pseudomonas</i>	SINDAMANOY	0,00	D
<i>Pseudomonas</i>	ANDINA	0,00	D
Testigo	SANTA ISABEL	0,00	D

Tratamientos con letras distintas indican diferencias significativas

Al comparar los promedios del porcentaje de incidencia y utilizando la prueba de Tukey, como se observa en el Tab.4, se determinó que el más alto porcentaje de incidencia se presentó en las variedades San Isidro, Andina, Santa Isabel y Sindamanoy con el sistema de inoculación con *Fusarium* 92.64%, 90.98%, 88.86% y 88.76% de incidencia, presentando promedios estadísticos similares entre sí.

Distinto estadísticamente de las variedades Sindamanoy, Santa Isabel, San Isidro y Andina con un sistema de inoculación con *Fusarium+Pseudomonas*; al igual que San Isidro, Santa Isabel, Sindamanoy y Andina con un sistema de inoculación con *Pseudomonas* y de los testigos Sindamanoy, Andina, San Isidro y Santa Isabel.

Las variedades San Isidro, Andina, Sindamanoy y Santa Isabel, con un sistema de inoculación con *Fusarium+Pseudomonas* con 4.16%, 4.08% y 8.98 % de incidencia que presentaron promedios similares entre sí y diferentes al nivel de significancia ($p \leq 0,05$), con respecto a los Testigos con las variedades San Isidro y Santa Isabel con 0% y de las variedades Sindamanoy y Andina con 0.54% y 0.52% de incidencia, al igual que con el sistema de inoculación con *Pseudomonas* con las variedades San Isidro, Santa Isabel, Sindamanoy y Andina con 0% de incidencia.

En las variedades ICA CORPOICA Sindamanoy, Obonuco Andina, Obonuco San Isidro y Santa Isabel, frente a las inoculaciones con *F. oxysporum* con un promedio de 90.31% de incidencia, un alto porcentaje de incidencia de la enfermedad con respecto a los testigos de ahí que se confirma lo dicho por Campuzano *et al.*, 1992; Campuzano *et al.*, 2001; Checa, 1995 y Sañudo *et al.*, 1993, que afirman que son susceptibles a amarillamiento.

La sintomatología de las variedades de arveja en estudio, las cuales fueron inoculadas con *F. oxysporum*, presentaron lesiones localizadas principalmente en la base del tallo y la parte superior de la raíz; las lesiones fueron alargadas, pardo rojizas, ligeramente hundidas, según Benavides y Muñoz (1998), estas lesiones se pueden extender a las raíces secundarias y la parte inferior del sistema radical.

La lesión del tallo es primariamente cortical; pero en algunos casos puede extenderse una decoloración rojiza del sistema vascular, hasta una corta distancia sobre la lesión cortical. Este último síntoma puede incluir a confusión con el marchitamiento, pero en general el limitado alcance de la decoloración vascular es suficiente para distinguir el ataque del patógeno. En las partes epigeas los síntomas consisten en un precario desarrollo; en los casos extremos la planta se marchita y muere (Benavides y Muñoz, 1998).

Las inoculaciones con *P. fluorencens* disminuyen la incidencia de la enfermedad sobre las variedades de arveja se debe a la baja presión ejercida por el patógeno (Mukerji, 2004), se debe a la producción de uno o más metabolitos, incluyendo sideroforos, antibióticos, cianuro y enzimas líticas; e incluso las *P. fluorencens* pueden inducir resistencia para ciertos patógenos en las plantas; esta inducción activa los mecanismos de defensa de la plantas, ya sea como barreras físicas o químicas, dependiendo del hospedante y de la efectividad de la colonización de las raíces por *Pseudomonas*.

Se piensa que las pyoverdinas producidas por *Pseudomona spp.* facilitan el control biológico apropiándose del hierro que está presente en la rhizosfera, ayudando a la limitación severa de hierro en el ambiente en las raíces de la planta, por consiguiente se

observa el descenso de otros organismos, y por último la supresión de distintos microorganismos (Buyer y Leong, 1986).

El papel de las enzimas micolíticas producidas por las *P. fluorescens* en la supresión de patógenos, como lo es la quitina, que es de gran importancia en el control de patógenos entre los que se encuentran: hongos, nematodos e insectos; si las plantas no contienen quitina las paredes de las células, se puede hacer el uso de protectores de plantas con quitina, que también lo tienen los hongos patógenos. Microscopias electrónicas han revelado la interacción de *F. oxysporum* y *P. fluorescens*, y la degradación del micelio de *F. oxysporum*, puesto que las enzimas líticas producidas de manera extracelular inhiben el micelio y el crecimiento del conidioforo, en vez de la germinación de la espora. La micolisis por lo tanto se define como la pérdida del protoplasma en la estructura del hongo y la disolución enzimática de la célula (Lim *et al.*, 1991).

P. fluorescens producen antibióticos, siendo éste altamente inhibitorio para *Fusarium oxysporum*; se mostraron que los mecanismos de supresión en contra de los hongos puede involucrar enzimas líticas en vez de antibióticos. *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 produce de manera extracelular quitinasa y laminaríansa cuando crece el micelio de *Fusarium oxysporum fsp. solani* produciéndose polímeros de quitina y de laminarina (Lim *et al.*, 1991).

Los antibióticos producidos por algunas *P. fluorencens* son de gran importancia, hay que destacarlos en la supresión de enfermedades en las plantas Mukerji (2004). La resistencia sistémica inducida por *P. fluorencens* inducen a un cambio sostenido en la planta, incrementando la tolerancia a la infección de patógenos, este fenómeno promueve la resistencia inducida, activando las defensas de las plantas (Uknes *et al.*, 1993).

CONCLUSIONES

Las cepas de *P. fluorencens* fueron eficientes para el control de *F. oxysporum* en condiciones controladas, pero hay la necesidad de ser probada en condiciones de campo para evaluar su eficiencia en el control del patógeno.

La cepa de *P. fluorencens* PPC disminuyó la incidencia de la enfermedad de un 90.31% a 6.55% con relación al testigo en presencia de la bacteria, mostrando gran eficiencia en el control de *F. oxysporum* en condiciones de invernadero.

BIBLIOGRAFÍA

AGRIOS, GEORGE. 2002. Fitopatología, Editorial Limusa, México. 835p.

ÁVILA DE MORENO, C. 2003. Manual de laboratorio de fitopatología. Tunja: UPTC. 17 - 19 p.

ALEXOPOLUS, C. J. MIMS, C. W. and BLACKWELL, M. 1996. Introductory mycology. Cuarta edición. Editorial New York: Wile & Sons. 578p.

ALSTRÖM. S. 1991. Induction of disease resistance in common vean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterization with rhizosphere pseudomonads. Journal of General and Applied and Environmental Microbiology N° 37. p 495 – 501.

BENAVIDES, M. A. y MUÑOZ, L. H. 1998. Efectos de la inoculación de una fuente comercial micorizagenados sobre la incidencia del amarillamiento *Fusarium oxysporum fsp. pisi* y los componentes productivos de la arveja *Pisum sativum L.* variedad Santa Isabel en el municipio de Yacuanquer. Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Agrícolas. Pasto. p 8 - 9.

BOOTH C. 1971. The Genus *Fusarium*. Editorial CMI. Kew, Surrey. p 19-31.

BOTINA, E. F. y YARPAZ, J. A. 2008. Evaluación de *Trichoderma sp.* sobre el hongo *Fusarium oxysporum* causante de la pudrición radical en cebolla de rama *Allium fistulosum* en el departamento de Nariño. Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Agrícolas. Pasto.

BUYER J. S. y LEONG J. 1986. Iron transpor-mediated antagonism between plant growth-promiting and plant-deleterius *P.* strains. Journal of Biological Chemistrity. p 791 – 794.

CHECA CORAL, O. E., ICA CORPOICA. Julio de 1995. Sindamanoy: variedad mejorada de arveja para clima frío. CORPOICA. Boletín divulgativo.

CAMPUZANO D., L. F., YÉPEZ CHAMORRO, B., BENAVIDES PAZMIÑO, J., BOLAÑOS, M. A., ARCILA GONZÁLEZ, B., LÓPEZ DE B., C. M. y CEPEDA BRAVO G. 1992. Obonuco Andina: nueva variedad mejorada de arveja para la zona de economía campesina del sur de Nariño. CORPOICA. Boletín divulgativo N° 9.

CAMPUZANO D., L. F., YÉPEZ CHAMORRO, B., BENAVIDES PAZMIÑO, J., BOLAÑOS, M. A., ARCILA GONZÁLEZ, B. y LÓPEZ DE B., C. M. 2001. Obonuco San Isidro: nueva variedad mejorada de arveja para la zona de reconversión de trigo en el departamento de Nariño. CORPOICA. Boletín divulgativo N° 8.

COOK R. J. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. En: Annual Review of Phytopathology N°31. p 53 - 80.

CORNELIS P. 2008. *Pseudomonas*: Genomics and Molecular Biology. Editorial Pierre Cornelis Vrije Universiteit Brussel, Belgium. p 14-25.

FEDERACIÓN NACIONAL DE CULTIVADORES DE CEREALES Y LEGUMINOSAS. Arveja. http://www.fenalce.net/pagina.php?p_a=52. Consultado Noviembre 4 de 2007.

FEDERACIÓN NACIONAL DE CULTIVADORES DE CEREALES Y LEGUMINOSAS. 2005. Archivo general. Regional Nariño. p 32.

GARCÍA, R. Efecto de la inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR) sobre el crecimiento de trigo y la eficiencia en el uso de fertilizante. Buenos Aires, 2007. <http://www.slideshare.net/soilteacher/garcia-efecto-de-la-inoculacion-con-rizobacterias>. Consultado, Marzo 20 de 2009.

LIM H. S., KIM Y. S. and KIM S. D. 1991. *Pseudomonas stutzeri* YLP-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. *Applied and Environmental Microbiology* N° 57. p 510 – 516.

LOPER J. E. and BUYER J. S. 1991. Siderophores in microbial interactions on plants surfaces. En: *Molecular Plant-Microbe Interactions* N° 4. p 5 – 13.

MARTÍNEZ GARNICA, M., HERNANDEZ DELGADO, S., RAMIRES PADILLA, J. y MAYEK PÉREZ, N. 2004. Diversidad genética y patogénica de *Fusarium*. En *Revista Mexicana de Fitopatología*. Vol 22, N° 3. Ciudad Obregon, Mexico. p 321 – 927.

MATTHIJS S, TEHRANI KA, LAUS G, JACKSON RW, COOPER RM and CORNELIS. 2007. *Pseudomonas* Thioquinolobactin, a *Pseudomonas* siderophore with antifungal and anti-Pythium activity. *En: Environmental Microbiology* Vol 9 N° 2. p. 425-434.

MUKERJI K. G. 2004. *Fruits and vegetables*. Dheli: Klower Academic Publisher. 455-460 p.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DEL COMERCIO. Medidas sanitarias y fitosanitarias. http://www.wto.org/spanish/tratop_s/sps_s/sps_s.htm. Consultado, Junio 29 de 2008.

PÉREZ C., DE LA FUENTE L., ARIAS A. Y ALTIERI N. 2000. Uso de *Pseudomonas fluorencens* nativas para el control de enfermedades de implantación en *Lotus corniculatus* L. Agrociencia. p 41- 47.

PÉREZ N. J. y LEGUIZAMÓN J. 1998. Interacciones entre micorrizas nativas de *Pseudomonas spp.* Fluorencens y calcio, en el manejo de *Fusarium spp.* En Revista CENICAFE. Vol 49, N° 3. Caldas. p 211- 223.

SAÑUDO SOTELO, B., CHECA CORAL, O. y ARTEAGA MENESES, G. 1993. Manejo agronómico de leguminosas en zonas en zonas cerealistas. Universidad De Nariño. Colombia: Pasto. 49 – 60p.

SEIFERT K. F. 2001. *Fusarium* and anamorph generic concepts. Agriculture and Agri-Food. Canada. p 70 – 79.

TAMAYO M., P. J. 2002. Enfermedades del cultivo de la arveja en Colombia: Guía de reconocimiento y control. Boletín técnico 14. Corpoica Regional 4. Colombia. 49p.

UKNES S., WINTER A. M., DELANEY T., VERNOOIJ B., MORSE A., FRIEDRICH L., NYE G., POTTER S., WARD E. y RYALS J. 1993. Biological induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. Molecular Plant-Microbe Interactions N° 6. p 692 – 698.

WELLER D. M. 1988. Biological control of soil – borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. En: Annual Review of Phytopathology N°26. p 379 – 469.