

DESARROLLO DE MICROECONOMÍAS REGIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE ACEITES ESENCIALES COSECHADOS EN SUELOS MINEROS - ATN/RF 16110

Producto 14: Informe sobre el banco de cepas.

Aslenis Melo Ríos
Sandra Rodríguez
Juan Diego Medina
David Granada

2021





Códigos JEL: Q16

FONTAGRO (Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria) es un programa de cooperación administrado por el Banco Interamericano de Desarrollo (BID), pero con su propia membresía, estructura de gobernabilidad y activos. Las opiniones expresadas en esta publicación son de los autores y no necesariamente reflejan el punto de vista del Banco Interamericano de Desarrollo, FONTAGRO, de sus Directorios Ejecutivos ni de los países que representan.

El presente documento ha sido preparado por Juan Diego Medina, Aslenis Melo Ríos, Sandra Rodríguez y David Granada.

Copyright © 2021 Banco Interamericano de Desarrollo. Esta obra se encuentra sujeta a una licencia Creative Commons IGO 3.0 Reconocimiento-NoComercial- SinObrasDerivadas (CC-IGO 3.0 BY-NC-ND) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/igo/legalcode>) y puede ser reproducida para cualquier uso no comercial otorgando el reconocimiento respectivo al BID. No se permiten obras derivadas. Cualquier disputa relacionada con el uso de las obras del BID que no pueda resolverse amistosamente se someterá a arbitraje de conformidad con las reglas de la CNUDMI (UNCITRAL). El uso del nombre del BID para cualquier fin distinto al reconocimiento respectivo y el uso del logotipo del BID no están autorizados por esta licencia CC-IGO y requieren de un acuerdo de licencia adicional. Note que el enlace URL incluye términos y condiciones adicionales de esta licencia.

Esta publicación puede solicitarse a:

FONTAGRO

Banco Interamericano de Desarrollo
1300 New York Avenue, NW, Stop W0502
Washington, D.C., 20577

Correo electrónico: fontagro@iadb.org



Tabla de Contenidos

| | |
|--|-----------|
| Abstract / Resumen | 4 |
| Introducción | 5 |
| Objetivos | 8 |
| Metodología | 9 |
| Resultados | 17 |
| Discusión | 38 |
| Conclusiones..... | 44 |
| Referencias Bibliográficas | 46 |
| Instituciones participantes | 51 |

Resumen

La explotación minera es una actividad económica importante y en algunas regiones de Colombia genera grandes cantidades de residuos sólidos, los cuales cubren grandes extensiones de terreno y ocasionan muchos problemas ambientales. De aquí que se tuvo como objetivo aislar e identificar grupos de microorganismos presentes en las zonas de impacto con posible aplicación en tecnologías de remediación de suelos contaminados con elementos potencialmente tóxicos y a su vez probar la capacidad como bioplaguicidas y biofertilizantes. En las actividades desarrolladas en el producto 14 se probaron y seleccionaron aislados microbianos obtenidos en el departamento del Cesar, Colombia. Se seleccionaron dos aislados por su capacidad sobresaliente, uno como antagonista y otro como entomopatógeno (*Trichoderma reesei*, *Trichoderma sp.*, y *Beauveria bassiana*, respectivamente); además de cepas de cianobacterias con potencial en la fertilización de plantas.

Palabras Clave:

Aislamiento, microorganismos, Hongos, *Beauveria sp*, *Trichoderma sp*, Biorremediación

Introducción

El subsector de plantas aromáticas, medicinales y condimentarias (PAMC) se ha posicionado como una alternativa de producción y exportación con alta dinámica de crecimiento, convirtiéndose en el segundo renglón generador de divisas dentro de las exportaciones agrícolas no tradicionales (Madra, 2014; Villegas, 2016). En Colombia, en los últimos cinco años, el área sembrada tuvo en promedio un crecimiento del 19 %, y la producción aumentó en un 30 %, este crecimiento puede darse por el ingreso de nuevos inversionistas a la cadena de valor con mayor tecnificación para ingresar a mercados internacionales (Ministerio de agricultura, 2017).

En Colombia, la mayor participación en la producción de plantas aromáticas está destacada por los departamentos de Meta (13,8 %), Tolima (12,9 %), Santander (11,9 %), Valle del cauca (10,6 %) y Arauca (9,3 %), mientras que el departamento del Cesar ocupa el puesto 31, aportando solo el 0,1 % de la producción total (DANE, 2015).

Cymbopogon citratus, actualmente distribuida alrededor del mundo (Soto et al., 2017), se encuentra entre las plantas aromáticas más reconocidas por sus comprobadas propiedades ansiolíticas, sedantes, antioxidantes, antiinflamatorias, entre otras, razón por la cual se ha priorizado su producción en el caribe seco colombiano (Tofiño et al., 2017). Su principal uso radica en la extracción del aceite esencial contenido en sus hojas, conocido como lemongrass, de gran importancia para la industria ya que contiene citral, un importante material para la perfumería, confitería y licorería; empleado en la síntesis de las iononas, de vitamina A y sustancias aromáticas. Razón por la cual, se estima que se siembran de 10.000 a 40.000 plantas/ha, con importaciones por valor de 22 millones de dólares y exportaciones por 600 mil dólares (Cardona y Barrientos, 2011); el aceite esencial se ha utilizado también para disuadir a los mosquitos (Group, 2017). Del mismo modo, dicho aceite tiene actividad antifúngica, antibacterial, citotóxica, fototóxica, fungicida contra patógenos del maíz y del sorgo (Rodríguez et al., 2012).

Por las razones anteriormente mencionadas, *Cymbopogon citratus* constituye un potencial renglón productivo con grandes posibilidades en el mercado mundial; y con esto, la posibilidad de originar importantes divisas para Colombia y departamentos productores (Alarcón, 2012). Sin embargo, a lo largo de los años, el valor comercial de las hojas de la limonaria es afectado principalmente por patógenos foliares, entre los que se encuentran los conocidos como royas (Alvares & Salazar, 2014), los cuales son parásitos obligados, producen manchas de color café oscuro a rojizo que secan y marchitan las hojas de la planta prematuramente, afectando la producción de los cultivos, con una incidencia del 100 % (Wolf, et al., 2010; Álvarez y Suarez, 2014; ICA 2011., Antolinez et al., 2008). Este parásito se encuentra asociado a dos especies principales correspondientes a *Puccinia cymbopogonis* y *P. nakanishikii* (Morales & Salazar, 2014).

Adicionalmente, la cadena de aromáticas, incluido el limoncillo demanda un mayor proceso de tecnificación con inclusión de plan de fertilización ecoamigable, ya que el uso inadecuado de agroquímicos, plaguicidas y fertilizantes provoca problemas de contaminación del ambiente (suelo, aire y agua), así como efectos adversos a nivel de

finca, causando daños a la población humana, tanto en quienes están en contacto directo con los productos químicos, como en el consumidor final (Almeida, 2014; Castillo & Pérez, 2015).

Otras alternativas al uso de agroquímicos, plaguicidas y fertilizantes en el departamento del Cesar, tales como el control con antagonistas y biofertilización, se encuentra limitado, entre otras razones, por falta de estudios sobre las especies predominantes de royas en la zona e identificación, eficiencia de cepas nativas patogénicas contra este grupo de hongos y microorganismos promotores de crecimiento con adaptabilidad a las condiciones edafoclimáticas del caribe seco.

La caracterización e implementación de microorganismos promotores del crecimiento vegetal, como las cianobacterias, se convierten en nuevas alternativas que permiten mantener un sistema de producción orgánico que sea rentable, debido a la capacidad que este tipo de microorganismos poseen para fijar nitrógeno, además de presentar escasas exigencias nutricionales en comparación a otros microorganismos (Freire et al., 2016). Los sistemas basados en el uso de microalgas o cianobacterias para la obtención de bioproductos son considerados un área prometedora para aplicaciones industriales (Streit et al., 2017).

El uso de organismos antagonistas como *Trichoderma*, el cual es un hongo saprofito, favorece el incremento del crecimiento vegetal, induce defensa en las plantas y posee una alta capacidad para controlar patógenos de las mismas (Infante, 2009; Rivera, 2015). Además, posee diversas ventajas, ya que tiene un rápido crecimiento y desarrollo; adicionalmente, su gran tolerancia a condiciones ambientales extremas, le permite ser muy eficaz como agente de control biológico, sobreviviendo en medios con contenidos significativos de agrodefensivos y otros químicos (Chiriboga et al., 2015). Se ha reportado la capacidad de *Trichoderma asperellum* para controlar Royas (*Uromyces appendiculatus*); con una reducción de la incidencia del fitopatógeno en un 88,6 % en cultivo de frijol (Cruz et al., 2015).

En consecuencia, en el presente informe se detallarán los resultados relacionados con las actividades a cargo que van desde una primera etapa con la identificación de microorganismos entomopatógenos, antagonistas y biofertilizantes los cuales cumplen un papel muy importante en el campo agrícola por sus múltiples funcionalidades como controladores de plagas y enfermedades en los diferentes cultivos de importancia económica en Colombia y el mundo (Osorio-Fajardo & Canal, 2011).

En Colombia, la búsqueda de nuevas alternativas biológicas frente a problemas en las áreas de la salud, agricultura y medio ambiente ha motivado la creación de colecciones de microorganismos, de aquí que sea de gran importancia la implementación de estrategias en el uso e identificación de estos en planes de manejo que permitan disminuir los impactos a la salud y al medio ambiente que se han generado por el uso de químicos o el uso excesivo de tierras. Según Layton et al., (2011), muchos microorganismos se consideran medios de control biológico, al reunir un conjunto de reacciones metabólicas, bioquímicas, mecánicas y/o físicas, que de manera natural se desarrollan articulada o individualmente y desencadenan la inhibición de la expresión

de un agente patógeno por parte de otro en un ambiente determinado, con el fin de lograr la eliminación parcial o total de éste, sin emplear agentes químicos que causen efectos adversos.

Es necesario entonces el uso de herramientas que parten desde el aislamiento, identificación y conformación de colecciones biológicas para buscar soluciones a problemáticas de impacto ambiental derivado de la producción de alimentos u otro tipo de materia prima, planteando un reto para las industrias y la economía que debe mejorar la eficiencia de la utilización de los recursos y disminuir la presión ejercida sobre los recursos no renovables conduciendo a una agricultura moderna, entendida como aquella que maximiza la productividad a través del uso de alternativas biológicas que aseguren rentabilidad para el agricultor. De aquí la importancia de la identificación y aislamiento de microorganismos con potencial para mitigar problemas ambientales (Pedraza-Zapata et al., 2017).

Objetivos

Seleccionar aislamientos de *Trichoderma* para el control de la roya roja (*Puccinia sp*) en plantas de *Cymbopogon citratus* del departamento del Cesar.

Caracterizar cianobacterias fijadoras de nitrógeno en suelos cultivados con ají (*Capsicum frutescens*) en el departamento del Cesar.

Metodología

1. Selección De Aislamientos De *Trichoderma* Para El Control De La Roya Roja (*Puccinia Sp*) En Plantas De *Cymbopogon Citratus* Del Departamento Del Cesar

Identificación de microorganismos

Se desarrolló un estudio de tipo experimental exploratorio de cohorte transversal. El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de microbiología de la Universidad Popular del Cesar (UPC), ubicada en la ciudad de Valledupar y la fase de vivero en la granja experimental El Cielo. Las muestras de suelo y material vegetal para aislamiento de *Trichoderma* se recolectaron de seis municipios del departamento del Cesar, correspondientes a Guacoche (10°29'47"N, 73°09'58"W, UT-5:00); Atánquez-Valledupar (10°42'N 73°21'O), Pueblo Bello (10°24'59"N 73°35'12"O), La Paz (10°23'07"N 73°10'19"O); González (8°23'25"N 73°22'52"O) y Rio de Oro (8°17'30"N 73°23'14"O). Para el aislamiento de cianobacterias, las muestras se colectaron de los municipios de Valledupar (vereda El Cielo), González, Rio de Oro, Pueblo Bello y Manaure (POT Cesar, 2016).

En cada municipio se desarrolló un muestreo del área de cultivo, tomando muestras de suelo y material vegetal con signos y síntomas característicos de la roya roja. Para la colecta de muestras de suelo según protocolo del Instituto Geográfico Agustín Codazzi-IGAAC (2012), se tomaron 100 g de suelo rizósferico de cinco puntos del lote a una profundidad de 20 a 30 cm para un total de 500 g de muestra compuesta, depositadas en bolsas de plástico transparentes resellables de 20x20 cm. Para aislamiento de cianobacterias, se tomó una alícuota de suelo de 2 a 3 centímetros de espesor de la pared del hueco y se homogenizaron todas las submuestras para toma de 1 Kg de muestra. Luego se llevaron al laboratorio, en una cava a una temperatura entre 4 y 10°C.

Para la identificación del agente causal de la roya roja asociada a limoncillo, se utilizó la metodología propuesta por Álvarez y Suarez (2014), para lo cual se observaron micropreparados en azul de lactofenol mediante raspados a mano alzada y cortes transversales del tejido foliar. Las observaciones de las estructuras presentes, mediciones y fotografías se hicieron con la ayuda de un microscopio y cámara digital.

Para la identificación de *Trichoderma* se tomó suelo rizósferico de los seis municipios y se siguió la metodología de Melo *et al.*, (2015). Se realizó la siembra en profundidad de 0,1 ml de solución de suelo por técnica de diluciones seriadas en base diez, usando agar PDA e incubación a temperatura ambiente 28±2 °C por 7 días. Las observaciones de las estructuras presentes, mediciones y fotografías se realizaron con la ayuda de un microscopio y cámara digital.

Posteriormente, se realizó una clasificación taxonómica y molecular del antagonista y los fitopatógenos mediante la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) realizada en los laboratorios de la Corporación para para Investigaciones Biológicas (CIB) en Medellín de acuerdo al siguiente protocolo:

- a) Extracción de ADN. Se tomó una porción de micelio de cada cepa y se maceró en un mortero estéril empleando nitrógeno líquido. El macerado fue puesto en tubos plásticos de 1.5 mL, tres tubos por muestra, a cada uno se le agregaron 700 μ L de buffer CTAB 2X (cetyl trimethylammonium bromide) precalentado a 65 °C y 10 μ L de β -mercaptoetanol. Las muestras se incubaron a 65 °C por 45 min agitando periódicamente. Transcurrido este tiempo se adicionaron 700 μ L de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1, se homogenizaron y centrifugaron a 12.000 rpm durante 20 min. A continuación, el sobrenadante fue recuperado y pasado a un tubo nuevo, se le adicionaron 700 μ L de cloroformo y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 20 min. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante, se transfirió a un tubo nuevo, se le adicionaron 600 μ L de isopropanol para precipitar el ADN y se llevó a – 20 °C por 1 hora. Se realizó una centrifugación a 12.000 rpm durante 20 min., luego se descartó el sobrenadante. Finalmente, el pellet fue lavado con 200 μ L de etanol al 70 % y centrifugado a 12.000 rpm por 10 min., nuevamente se eliminó el sobrenadante y se repitió el paso anterior con etanol al 90 %. El ADN obtenido fue resuspendido con 50 μ L de agua ultrapura estéril. Finalmente se agregó 1 μ L RNasa y se incubó por 1 hora a 37 °C. De cada muestra se obtuvieron tres suspensiones de ADN. La integridad del ADN fue verificada por electroforesis en geles de agarosa al 1 % y la concentración fue cuantificada con un espectrofotómetro Nanodrop (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE).
- b) Amplificación ITS1/ITS4: Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Cycler Biorad® utilizando 200 ng del ADN molde, 1x de buffer *Taq* (Fermentas®), 0,2 mM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl₂ (Fermentas®), 1 U/ μ L de *Taq* polimerasa (Fermentas®) y 0.6 mM de cada primer (ITS1/ITS4). Al control negativo se le adicionó agua en lugar de ADN. Las reacciones se incubaron inicialmente a 95 °C por 5 min., luego se realizaron 30 ciclos a 94°C por un minuto (desnaturalización), 55 °C por un minuto (alineamiento), 72°C por un minuto y medio (extensión) y un ciclo de 72 °C por 5 min. para la extensión final. Los productos de la PCR fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 1 % con un marcador de 50 pb y fueron enviados a Macrogen (Korea) para su secuenciación.
- c) 3. Análisis de las secuencias: Las secuencias *forward* y *reverse* obtenidas para cada cepa fueron depuradas, editadas y alineadas usando el programa Bioedit. En ambos casos las secuencias consenso fueron comparadas con las secuencias disponibles en la base de datos del Genbank usando nucleótidos BLAST para determinar la identidad de los aislamientos.

El mantenimiento del fitopatógeno se hizo mediante dos técnicas: 1) prueba de crecimiento en medio selectivo a base de 3,0 % de glucosa, 1,0 % de bacto-agar y la solución mineral de czapek con 14,3 mg / litro de EDTA férrico en lugar de sulfato ferroso (a pH 6,4 con HC) e incubación a 20 °C. 2) mantenimiento *in vivo*; sembrando 5 plantas infectadas con la roya (Procedente del municipio de atanquez-Cesar) en bolsas de vivero de 1 kg de suelo desinfectado mediante solarización por 24 horas. La planta fue cubierta con plástico para evitar contaminación fuera y dentro del ensayo en laboratorio de microbiología de la UPC.

Pruebas de antagonismo

La prueba de antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* se observó mediante dos técnicas, la primera descrita por Roiz, De león y Paniagua (2013). Para lo cual se ubicaron hojas de limonaria infectadas por el fitopatógeno (previa verificación de uredios en microscopio), cortadas en cuadros de 2 cm de diámetro. Se dispusieron dos secciones de hojas infectadas en cajas de Petri con agar PDA a lado y lado, y 5 mm del borde. Posteriormente se ubicó en el espacio contrario de la caja una punción de la cepa de *Trichoderma* a evaluar. Los tratamientos correspondieron al número de aislados, más un control positivo de la roya.

La segunda técnica se realizó mediante el cultivo dual en platos Petri de 8,5 cm de radio, conteniendo 20 ml de Agar PDA descrita por Fernández & Suarez (2009). En cajas separadas, se sembró un inóculo del patógeno, lo que correspondió al control.

Las dos técnicas utilizadas, se realizaron de igual forma en agar Czapek por triplicado, con una temperatura de incubación de 28 ± 2 °C por 7 días. Luego se registró la confrontación de los dos hongos. Para calcular los porcentajes de inhibición se empleó la fórmula utilizada por Fakhrunnisa *et al.*, (2006).

$$I = \frac{R1 - R2}{R1} * 100$$

Donde:

I = Porcentaje de inhibición en el crecimiento del micelio

R1 = Crecimiento radial del patógeno sobre el lado opuesto, evaluado en la caja Petri

R2 = Crecimiento radial del patógeno en enfrentamiento

Se realizó un ensayo preliminar de infección de plántulas con la cepa de la roya identificada en laboratorio. Para lo cual se hizo la prueba de infección por solución (T1), y raspado (T2) del fitopatógeno en tres plantas y tres controles sin aplicación del patógeno. La observación se realizó cada 24 horas hasta por 15 días, identificandola presencia de sintomatología característica de la infección para determinar el Tiempo Letal medio (TL50), el cual será el determinante de la forma de desarrollo del ensayo en vivero. Posteriormente se re-aisló el fitopatógeno en agar czapek.

Para la prueba de antagonismo en vivero se realizó una siembra de limoncillo utilizando material vegetal de propagación sana o sin sintomatología proveniente del corregimiento de Atánquez. Las cuales se mantuvieron en vivero de la granja piloto de la UPC por 90 días en bolsas de polietileno de 1.5 Kg, con suelo solarizado como sustrato y riego con regadera una vez al día en horas de la mañana.

Paralelamente, se preparó una concentración de esporas del hongo fitopatógeno y otra de los antagonistas con mayor efectividad *in vitro*, mediante suspensión en agua destilada estéril, como lo proponen Vivas, *et al.*, (2011). Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas hasta conseguir la concentración de esporas deseada ($1,0 \times 10^8$

UFC/ml) y mediante el recuento en cámara de Neubauer, bajo el microscopio (Gañán *et al.*, 2015).

Se realizó un diseño completamente al azar, cada tratamiento constó de siete réplicas, constituidas por 1 plántula cada una como unidad experimental. Así, los tratamientos fueron los siguientes: Testigo sin aplicación (T0), *Trichoderma sp.* 1 (T1), *Trichoderma sp.* 2 (T2) y Testigo con aplicación del fitopatógeno (T3). De esta forma se utilizaron un total de 28 plántulas en el ensayo. Cada planta se cubrió por una cabina plástica transparente de 30X30 x 50 cm para aislarla de los demás tratamientos. Diariamente y durante 10-30 días se evaluó la efectividad de los antagonistas en estudio con relación al testigo (Melo *et al.*, 2015). Se determinó el nivel de patogenicidad de aislados de *Trichoderma* con análisis de medias y prueba pos hoc de Duncan con un nivel de confianza del 95%, utilizando el software estadístico IBM SPSS versión 20.

2. Aislamiento de cianobacterias fijadoras de nitrógeno en suelos cultivados con ají (*capsicum frutescens*) en el departamento del cesar.

Mediante los protocolos establecidos por el Instituto Geográfico Agustín Codazzi (IGAC), en el análisis químico de suelo, se determinó pH (potenciómetro; relación suelo-agua 1:2,5), acidez y Al intercambiables (KCl 1N), MO (Walkley-Black Modificado), P (Bray II), S y B (fosfato monocálcico), bases intercambiables (Ca, Mg, K, Na, en acetato de amonio 1M a pH 7), CICE (Capacidad de Intercambio Catiónico Efectiva), elementos menores (Fe, Cu, Mn, Zn; método Olsen modificado) y conductividad eléctrica.

El procesamiento y aislamiento de las cianobacterias en las muestras de suelo se realizó mediante la metodología reseñada por Salazar y Guerrero (2013). De cada muestra de suelo, se tomaron 0,1ml de la dilución y se sembraron en tubos con 3 ml medio BG-11 líquido y en cajas de Petri con medio de cultivo sólido BG-11 con nitrógeno, mediante la técnica de siembra en placa extendida (Benintende *et al.*, 2011). A cada placa se adicionaron 30-50 g/ml de cicloheximida para evitar la contaminación por hongos de acuerdo con lo descrito por Katoh *et al.*, (2012). Una vez inoculados los tubos y las cajas con medio BG-11 con nitrógeno, se incubaron a temperatura entre 25+/-2 °C, con una intensidad de luz aproximada de 3700 lux de intensidad con un fotoperiodo de 12h de luz y 12 h oscuridad durante un mes aproximadamente. Transcurrido este tiempo a los tubos inoculados se les realizó resiembra por agotamiento en medio BG-11 sólido con Bicarbonato de Sodio para el aislamiento de las cianobacterias (Morales *et al.*, 2014).

La identificación fenotípica de las cepas se realizó mediante claves taxonómicas utilizando la técnica por microscopía directa (Sánchez, Benintende, y Benintende, 2007) y mediante la implementación de los datos aportados por Ramírez y Ayala, (2014). La identificación de cianobacterias se realizó mediante microscopía óptica de campo claro, utilizando microscopios equipados en objetivos de 40x. Las características morfológicas de los aislados consideradas para la identificación taxonómica fueron las siguientes: forma y tamaño de las células intercalares y terminales del filamento; grosor del filamento; presencia o ausencia de constricciones en el cruce de la pared; presencia de células necridiales; ausencia o presencia y color de la vaina; número de tricomas por

filamentos, presencia, forma y tamaño de los heterocistos (Pineda et al., 2011) (Cires y Quesada, 2011).

Las cepas seleccionadas de cianobacterias se escalaron con medio BG-11 líquido en tubos de ensayo de 10 ml y posteriormente se llevaron a cultivo discontinuos en frascos de aproximadamente 500 ml (Morales et al., 2014), con (kanamicina [$5 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$] y cicloheximida [el 30-50 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$]) (Kato et al., 2012).

Cultivo de Consorcios Microbianos con Cianobacterias.

Se establecieron todas las condiciones para el cultivo de los consorcios microbianos con cianobacterias, teniendo en cuenta los siguientes factores:

- a) **Condiciones del cultivo del consorcio microbiano con cianobacterias.** Se dispusieron 275 mL de agua destilada por unidad experimental. Las condiciones de cultivo fueron aproximadamente de 4161.25 ± 136.37 Lux, a una temperatura de 22 ± 2 °C, con fotoperíodo de 16 horas de luz, 8 horas de oscuridad (Koch et al., 2008), sin aireación por 21 días. Tanto para las células en suspensión e inmovilizadas, se partió de un inóculo inicial de cianobacterias de 4×10^5 cel/ mL^{-1} (Chacón et al., 2004).
- b) **Cultivo Discontinuo.** Las cianobacterias se evaluaron en cultivos discontinuos en frascos de vidrio autoclavables de aproximadamente 375 ml de capacidad con 250 ml de cultivo por tratamiento. El cultivo se inició con un inóculo a 0,08 ml (DO750 nm), procedente del cultivo madre en fase exponencial. Todos los cultivos se mantuvieron a 28 ± 2 °C, a un periodo de luz: oscuridad 12:12 h, con iluminación lateral de lámparas fluorescentes y a una intensidad luminosa de $156 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Tuvo aireación constante y conectada a un sistema conformado por tubos de vidrio de 12 centímetros de largo, unidos a mangueras de plástico, alimentados por compresores para acuarios de 2 salidas. A todos los cultivos se les determinó el pH, en el transcurso de todo el crecimiento de la cianobacteria.
- c) **Cultivo Alimentado.** Esta técnica permitió el aumento en cuanto a biomasa. A medida que se le agregará medio de cultivo fresco, permitiendo extender la fase exponencial e incrementando el volumen de cultivo a partir de una pequeña cantidad de biomasa o al final de un cultivo discontinuo convencional durante periodos de tiempo estipulados normalmente cada 10 días, hasta obtener el volumen deseado. Después del cultivo discontinuo y una vez obtenidas las condiciones óptimas se hizo crecer en un cultivo alimentado por triplicado con el fin de aumentar el volumen desde 150 mL hasta 3000 mL, agregándole medio fresco cada 10 días a una concentración de 17,6 mM y mantenidos a una temperatura de 29 ± 2 °C, fotoperíodo (12:12 horas) con irradiancia lateral de $156 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y aireación constante hasta los 60 días de edad.

- d) **Análisis de Biomasa y Crecimiento.** Los cultivos discontinuos fueron monitoreados cada tres días por turbidez, clorofila A, carotenoides y ficobiliproteínas hasta fase estacionaria.
- e) **Evaluación del Crecimiento.** Para establecer la curva de crecimiento de los consorcios microbianos con cianobacterias, se tuvieron en cuenta parámetros de turbidez. El crecimiento de los cultivos se analizó cada tres días a partir de biomasa fresca. Para ello se tomaron muestras de los cultivos por triplicado, y se homogenizaron para romper los filamentos y tornar la muestra homogénea, luego se añadieron 2,5 mL del cultivo en tubos de vidrio para Spectronic 21 de 2,5 mL de capacidad. Seguidamente se procedió a la medición de la absorbancia (DO) de las muestras a 750 nm en un espectrofotómetro Spectronic 21D MILTON ROY, y se expresaron en Unidades de Absorbancia (UA).
- f) **Análisis de pigmentos: Clorofila a y Carotenoides.** Estos pigmentos liposolubles se determinaron a partir de biomasa fresca. Para ello se tomó 1 ml de cultivo y se agregaron a un tubo Eppendorf de 1,5 mL de capacidad, esta operación se realizó por triplicado para cada una de las réplicas de cada tratamiento. Luego se centrifugaron a 8000 r.p.m. durante 10 min. utilizando una microcentrifuga (Thomas Scientific), seguidamente se descartaron los sobrenadantes con ayuda de una pipeta Pasteur de cuello largo. Los pigmentos se extrajeron del pellet mediante la adición de 1mL de acetona-metanol 2:1. Este proceso se realizó en la oscuridad para evitar la oxidación de la clorofila a 4°C por 24 horas y para su medición los extractos se clarificaron mediante centrifugación y luego fueron añadidos en tubos de vidrio para Spectronic 21 de 2.5 ml de capacidad, ajustando el volumen con el mismo solvente. Seguidamente se procedió a la medición de la absorbancia (DO) de las muestras a 480 y 665 nm para carotenoides y clorofila a respectivamente, en un espectrofotómetro Spectronic 21D MILTON ROY contra un blanco de acetona-metanol 2:1 al 95 %. La concentración de clorofila a se obtuvo a partir de la ecuación propuesta por Marker y col. (1980), y la de Strickland y Parsons (1972) para carotenoides totales en el que los valores se expresaron en µg/mL.

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g/mL}) = [(\text{DO}_{665} \times 13,14) / \text{VM}] \times \text{VE}$$

$$\text{Carotenoides totales } (\mu\text{g/mL}) = [(\text{DO}_{480} \times 4) / \text{VM}] \times \text{VE}$$

Dónde:

VM: Volumen de muestra del cultivo utilizado

VE: Volumen del extracto medido (normalmente 2,5 mL)

- g) **Análisis de Ficobiliproteínas:** La extracción de los pigmentos hidrosolubles se realizó por el método de choque osmótico modificado de Wyman y Fay (1986), para ello se tomaron un 1 ml del cultivo por triplicado y se centrifugaron 5500 r.p.m. por 10 minuto utilizando una microcentrifuga (Thomas Scientific), luego se retiró todo el sobrenadante. Al concentrado se le añadió 200 µL de glicerol, y se agitaron enérgicamente. Seguidamente se mantuvo en oscuridad a 4 °C

durante 24 horas para que el glicerol penetre en el interior de las células. Transcurrido ese tiempo, se le agregó 1ml de agua destilada y se mezcló durante 30 segundos en el vórtex. Con esto se obtuvo una concentración final de glicerol del 20 % el cual se llevó a periodos de 30 minutos de congelación y descongelación tres veces. Por ultimo se centrifugaron a 5500 r.p.m. durante 10 minutos. Con el fin de sedimentar los restos celulares y se midió la densidad óptica del sobrenadante a 562, 615, 652, tomando como blanco una solución de glicerol en agua destilada al 20 %. Una vez obtenidos los datos se aplicaron las ecuaciones de Bennet y Bogorad (1973), y se expresaron en µg/mL:

$$\text{Ficocianina } (\mu\text{g/mL}) = \frac{DO\ 615 - (0,474)X\ DO\ 652}{5,34}$$

$$\text{Aloficocianina } (\mu\text{g/mL}) = \frac{DO\ 652 - (0,208)X\ DO\ 615}{5,09}$$

$$\text{Ficoeritrina } (\mu\text{g/mL}) = \frac{DO\ 562 - (0,474\ x\ Conc\ Ficoci.) - (0,849xConc.\ Alofic.)}{9,62}$$

Identificación molecular de cianobacterias

Para la detección de cianobacterias, el uso de técnicas de microscopía basada en su morfología ha sido una herramienta de uso común (Hurtado y Polanía, 2014). Sin embargo, los últimos estudios registrados sobre cianobacterias han utilizado la metodología molecular con más frecuencia para la identificación de cepas, consistente en la amplificación *in vitro* de secuencias de DNA utilizando cebadores (iniciadores o primers) específicos. Para la identificación molecular se utilizó el protocolo utilizado por Corrales et al. (2017), mediante la aplicación de 3 pasos:

a) extracción de ADN: Se tomó de 0,1 a 0,2 g de biomasa, a la cual se adicionaron 100 µL de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA) y 3 µL de proteinasa K (20 mg/ml). Al contenido de cada tubo se le realizó una disrupción mecánica con balines de vidrio y metal, en un desmembrador Retsch 400 mm, a una agitación de 30 Hz por 1 min. El material homogenizado se incubó a 37 °C por una hora, seguidamente se le adicionaron 500 µL de buffer CTAB 2X y se incubaron a 65 °C por 30 min. Al lisado celular se le adicionaron 500 µL de Cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se separaron las fases. Se recuperó la fase acuosa y se agregaron 0,5 µL de NaCl 5M y 0,6 µL de isopropanol para precipitar el ADN, seguido se incubaron a -20 °C por una hora. El ADN se lavó con etanol 70 %, y se suspendió en 100 µL de agua libre de nucleasas (Ambion).

b) Amplificación por PCR: Para la identificación molecular se utilizó como marcador el gen bacteriano 16S de la unidad pequeña del ribosoma. Esta amplificación se realizó con dos cebadores intermedios, el CYA 359F y el CYA781R. Los cebadores utilizados fueron una combinación de los dos cebadores reverse CYA781 a y b (GACTAC(T/A)GGGGTATCTAATCCC(A/T)TT) y el CYA359 (GGGGAAT(C/T)TTCCGCAATGGG) (Núbel, Ferran, & Gerard, 1997). Todas las reacciones se realizaron en un termociclador MyCycler™ (Bio-Rad laboratorios Inc., Hercules, CA, EE.UU.) en alícuotas de 20 µl que contenía 10 µl de PCR mix – 100 2X (Corpogen,

Colombia), 1 µl de cebador F, 1 µl de cebador R (cada cebador a una concentración de 10 µM), 0,5 µl de ADN y agua grado biología molecular hasta un volumen final de 20 µl. Los perfiles de PCR incluyeron una desnaturalización inicial a 94 °C durante 4 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94 °C durante 30 s, 53 °C por 30 s y 72 °C durante 45 s, y una extensión final a 72 °C durante 6 minutos. Tanto las PCR como los productos limpios fueron visualizados en gel de agarosa al 1,5 % con TAE al 1 %. La electroforesis se corrió por aproximadamente una hora con voltaje de 100 V. Finalmente, se observó el resultado en un documentador de geles (Gel Doc™ XR+, BioRad).

c) Secuenciación y alineamiento de secuencias: Los productos purificados de PCR fueron enviados a una casa comercial (SSigMOL, Instituto de Genética, Universidad Nacional, Colombia) para el respectivo secuenciamiento del gen ribosomal 16S. Las comparaciones de secuencias se llevaron a cabo utilizando las bases de datos BLAST, curada (RefSeq) y no curada, del centro nacional de información biotecnológica (NCBI).

Determinación de la producción de enzima nitrogenasa

Para evaluar la capacidad fijadora de nitrógeno de las poblaciones aisladas e identificadas molecularmente, se utilizó el método indirecto de valoración del ión amonio empleando la técnica calorimétrica de Berthelot (fenol-hipoclorito). El procedimiento realizado consistió en inocular los aislados en un medio de suelo al 10 %, y luego incubados a una temperatura de 28-29 °C durante un tiempo de 72 horas con agitación constante a 150 rpm. Pasado este tiempo, se añadieron 25 mL de KCl 2M, manteniéndose el proceso de agitación por una hora más; seguidamente se dejó en reposo hasta que todo el suelo se depositó en el fondo; se tomaron 10 mL del sobrenadante, se centrifugaron a 2000 rpm durante 20 minutos, se le adicionaron 0,4 mL de solución alcohólica de fenol al 10 %, 0,4 mL de nitroprusiato de sodio al 0,5 % y 1 mL de solución oxidante, la cual se preparó mezclando 20 g citrato de sodio, 1 g de hidróxido de sodio y 1 mL de hipoclorito de sodio 1,5 N en 100 mL de H₂O.

La mezcla se mantuvo en reposo durante 1 hora y posteriormente se midió la absorbancia a 632,9 nm en un espectrofotómetro PerkinElmer Lambda 11UV-Vis. Como blancos de suelo se utilizaron muestras de tierras esterilizadas (sin microorganismos) de los diferentes cultivos, a las cuales se les determinó la concentración del ión amonio por el método descrito anteriormente. Las concentraciones de amonio obtenidas del sistema (suelo inoculado) fueron corregidas teniendo en cuenta los blancos de suelo, para obtener el valor real de la producción de amonio por las bacterias. La curva patrón se trazó a partir de una solución estándar de 80 ppm de NH₄Cl, y el rango de trabajo fue de 0,8-5,6 ppm. Ensayos por triplicado.

A los resultados obtenidos se les realizó un análisis de varianza y comparación de medias por la prueba de Fisher para determinar diferencias significativas entre la concentración de los pigmentos de productos por cianobacterias en diferentes tiempos y los parámetros fisicoquímicos de los sitios de muestreo, lo anterior se ejecutó con una confianza del 95 % mediante el programa estadístico Minitab 18.

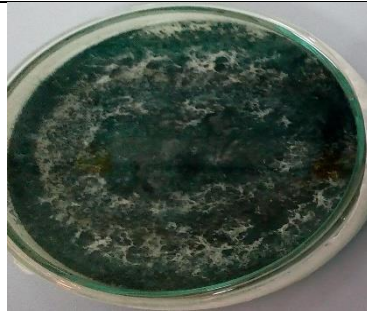
Resultados

Aislamientos de *Trichoderma* para el control de la roya roja (*Puccinia sp*) en plantas de *Cymbopogon citratus* del departamento del Cesar

Se identificaron nueve cepas en total de *Trichoderma* en tres de los seis municipios muestreados, de las cuales tres provinieron del Municipio de González, tres de Rio de Oro, y tres de Valledupar (Ver Tabla 1). Lo anterior indica una prevalencia del 66,7% de dicho microorganismo en las zonas estudiadas, esto se debe a que *Trichoderma*, es un hongo que se encuentra en cualquier tipo de suelo, siempre y cuando este le brinde los nutrientes y condiciones necesarias para sobrevivir (Erazo *et al.*, 2014). En el departamento del Cesar se encontró, en la rizósfera de aguacate en policultivo una prevalencia de *Trichoderma* del 90-86% (Tofiño, Cabal & Gil, 2012).

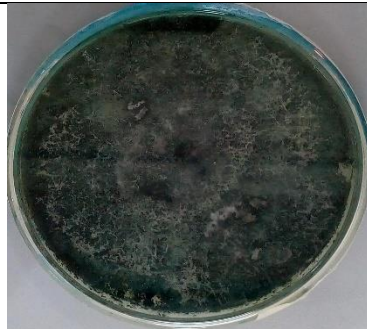
Tabla 1. Características macroscópicas de Cepas de *Trichoderma* aisladas.

| Cepa de <i>Trichoderma</i> en agar PDA | Código y procedencia | Descripción |
|---|--|---|
|  | 1UP Valencia- Cesar Granja de la Universidad Popular del Cesar | Colonias de rápido crecimiento, de 4 a 5 días, que inician con un color blanco, de textura algodonosa, y posteriormente se tornan verde amarillento con esporulación densa y textura granular. Al reverso de la caja se observa un pigmento amarillo intenso (Romero <i>et al.</i> , 2009). |
|  | 2Va Valledupar, Cesar- Área Urbana | Colonias de rápido crecimiento, 4 días, que inician con un crecimiento micelial de color blanco verdosa, que posteriormente se tornan verde oscuro y textura algodonosa. No se observa pigmento al revés de la caja (Chávez, 2006). |
|  | 3G3 Gonzales, lote3 | Colonias de rápido crecimiento, 5 días, durante su crecimiento micelial toman una coloración blanca y más tarde se observan blanco verdosas, la textura es correosa. Al reverso de la caja presenta un pigmento blanco pálido (Ávila <i>et al.</i> , 2014). |



4G2
Gonzales,
lote2

Colonias de rápido crecimiento, de 4 a 5 días, en su crecimiento micelial toma una coloración blanca de textura algodonosa, que luego se observa verde oscura, y la textura cambia a correosa. Presenta estructuras de resistencia blancas y correosas. Pigmento blanco pálido al reverso de la caja (Ávila *et al.*, 2014).



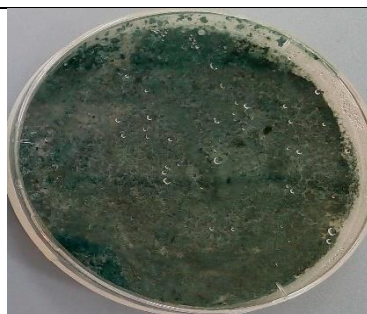
5G1
Gonzales,
lote1

Colonias de rápido crecimiento, de 4 a 5 días, en su crecimiento micelial toman una coloración blanca de textura algodonosa, que luego se observa verde oscura, y la textura cambia a correosa. Presenta estructuras de resistencia blancas y correosas. Pigmento blanco pálido al reverso de la caja (Vásquez, 2010).



6R0
Rio de oro
(lote en
descanso)

Colonias de rápido crecimiento, de 4 a 5 días, en su crecimiento micelial toman una coloración blanca verdosa de textura algodonosa, que posteriormente se observa verde oscura, la textura cambia a correosa. Presenta estructuras de resistencia identificables por ser blancas. Sin pigmentación al revés de la caja (Rodríguez & Gato, 2010).



7R2
Rio de oro,
lote2

Colonias de rápido crecimiento, de 4 a 5 días, su micelio empieza con un color blanco verdoso, que posteriormente se torna a verde oscuro, su textura es granular con esporulación densa. Al reverso de la caja presenta un pigmento blanco pálido (Vásquez, 2010).



8R1
Rio de oro,
lote1

Colonias de rápido crecimiento, de 4 a 5 días con forma radial, su micelio inicia con un color blanco verdoso, que posteriormente se torna verde oscuro en el centro y se extiende a un verde blanco en el resto de la caja Petri. Su textura es correosa. Al reverso de la caja presenta un pigmento blanco pálido (Salazar *et al.*, 2012).



9GU
Valledupar-
Cesar
Guacoche

Colonias de rápido crecimiento, de 4 a 5 días, su micelio inicia con un color blanco, de textura algodonosa, que posteriormente se tornan verde amarillento con esporulación densa y textura granular. Al reverso de la caja se observa un pigmento amarillo intenso (Romero *et al.*, 2009).

Observación de raspados directos de hoja

En las hojas de limonaria afectadas por la roya, se presentaron síntomas tales como manchas necróticas que van de color marrón claro a oscuro, por el reverso de la hoja, se observan pequeños bultos, los cuales no son más que la acumulación de las esporas del hongo (Figura 1). Estas lesiones abarcaron toda la hoja, secándola prematuramente (Esquivel, 2011). En los micropreparados obtenidos de raspados del tejido foliar de *C. citratus* en azul de lactofenol, pudo observarse estructuras de un complejo de hongos que afectan las hojas de estas plantas, las cuales correspondieron a los géneros fúngicos de *Puccinia sp* y *Curvularia sp*. Se observó uredosporas de color marrón-rojizo, globosas, con parafísis hialinas, y uredos anfigenos (Figura.2), (Esquivel, 2011).



Figura 1. A). Planta de *Cymbopogon citratus* afectada por Roya roja. B). Uredosporas típicas de *Puccinia sp*.

Adicionalmente, se observó en características típicas del género *Curvularia*, conidias periformes, pardas, con septos horizontales, produciendo cuatro células (Figura 2). La célula central es más grande en comparación de las que se encuentran en los lados terminales, lo cual le da a la conidia un aspecto curvo (Figura 3) (Rios *et al.*, 2017).



Figura 2. Conidias de *Curvularia sp*.

En Agar czapek, se observaron colonias radiales de rápido crecimiento, de 4 a 5 días aproximadamente, de color rosa-rojo y textura algodonosa. Por el reverso de la caja se observa una pigmentación roja intensa (Figura 3), características tanto de *Puccinia* como

de *Phoma sorghina* (*Epicoccum sorghinum*) (Pažoutová, 2009). En agar PDA la coloración fue verde oscura con bordes amarillos. No obstante en observación microscópica solo se observaron hifas con numerosas clamidosporas (Uredosporas) intercaladas y con pigmentación en agar Czapeck, en Agar PDA se observó la formación de Basidiosporas y Pycnidiosporas producidas en la punta del espermatóforo (hifa uninucleada) típicas de la familia *Pucciniaceae* (Zuluaga *et al.*, 2008).

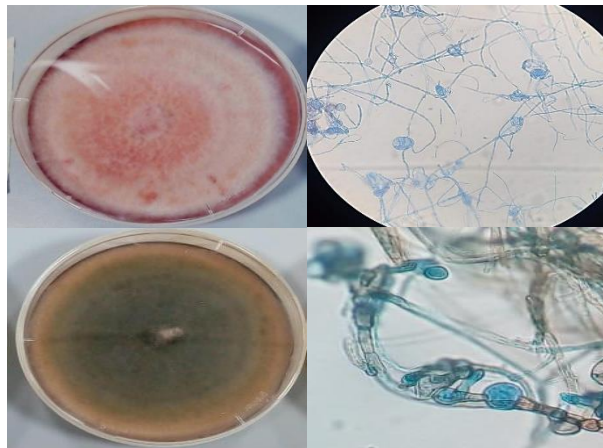


Figura 3. Características del fitopatógeno de limonchillo aislado. a) y b) características en agar czapeck, y agar PDA (c y d).

Los resultados del enfrentamiento *in vitro* indican diferencias significativas según análisis Duncan, en el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (ICM), de todas las cepas, siendo superior la cepa de *Trichoderma* codificada como 7R2, perteneciente al municipio de Rio de oro, ejerciendo un control del 83,8% sobre el patógeno, seguida por la cepa 3G3 de Gonzales con un ICM del 78,6% (Gráfico 1, Figura 4). Lo anterior demuestra la capacidad antagonista de los aislamientos de *Trichoderma* sobre el patógeno probado, lo cual está relacionado con los mecanismos de acción que presente cada uno de ellos.

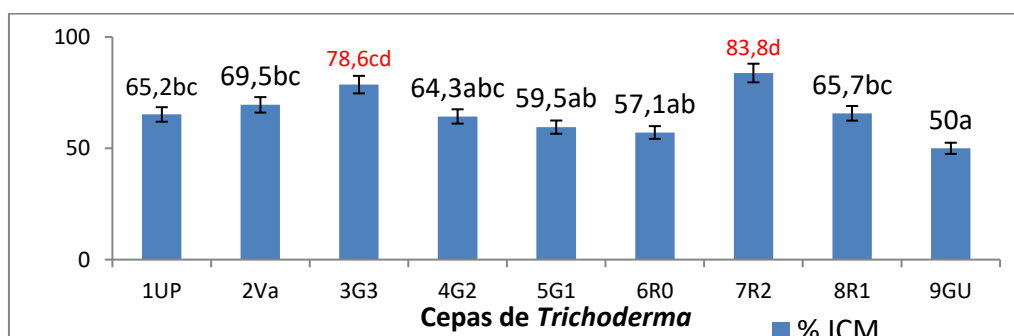


Gráfico 1. porcentaje de inhibición del crecimiento micelial. Valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente según Duncan 0.05.

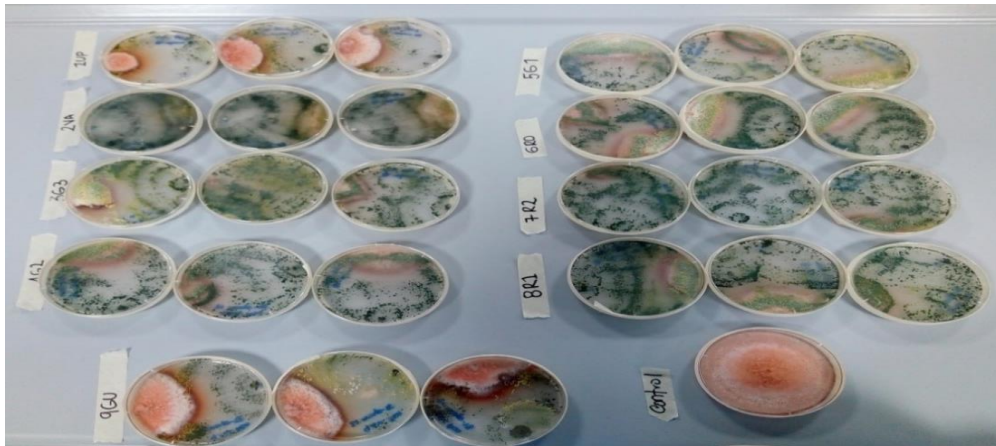


Figura 4. Enfrentamiento de aislados de *Trichoderma* con hongo fitopatógeno de limoncillo por punción, en agar Czapek.

De las Cepas 7R2 y 3G3, microscópicamente se evidenció el desarrollo de hifas ramificadas, aseptadas, de las cuales se desprenden conidióforos también ramificados, a partir de los cuales se desarrollan fiálides en forma de botella que producen los conidios (Vásquez, 2010). Visto al microscopio, los conidióforos (estructura fértil) están ramificados, semejantes a un árbol pequeño, los cuales a su vez terminan en fiálides (célula conidiógena) en las que se forman las esporas asexuales o conidios, muchas veces en formación de cabezas conidiales (Talavera & Tellez, 2016).

En cuanto a la identificación molecular de cepas *Trichoderma* 7R2, *Trichoderma* 3G3 y *Puccinia* sp (Aislado en agar Czapeck), se observa que las regiones amplificadas con los oligonucleótidos ITS1-ITS4 cuyo porcentaje de homología según alineamientos en la base de datos del NCBI-BLAST y la caracterización morfológica previa, permitieron identificar el género *Trichoderma* en aislados de Municipios de González y Río de oro (Cepas con mayor efectividad in vitro). (Figura 5, 6 y 7).

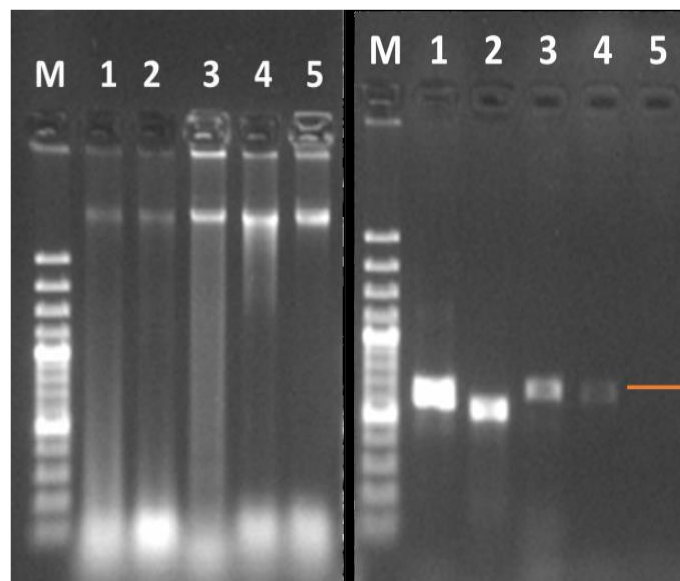


Figura 5. a) Verificación de extracción de ADN por electroforesis en gel de agarosa 1%. M: Marcador 50 pb; 1: *Trichoderma* Río de Oro (suspensión 1); 2: *Trichoderma* González (suspensión 1); 3: *Trichoderma* González (suspensión 2); 4: *Puccinia* Cesar (suspensión 1); 5: *Puccinia* Cesar (suspensión 2). **b)** Verificación de amplificación de la región ITS por electroforesis en gel de agarosa 1%. M: Marcador 50 pb; 1: *Trichoderma* Río de Oro; 2: *Trichoderma* González; 3: *Puccinia* Cesar; 4: Control positivo; 5: Control negativo.

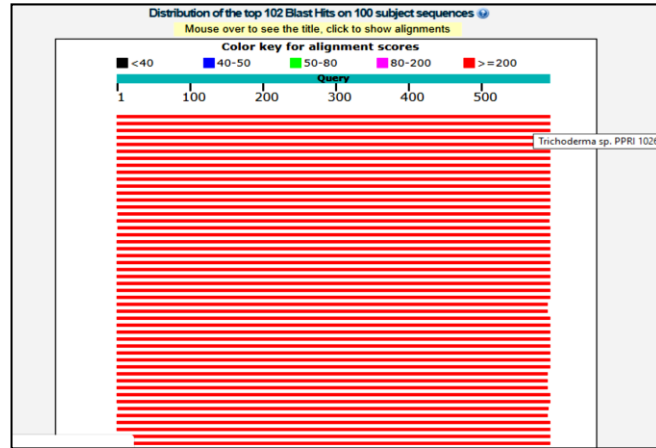


Figura 6. BLAST en el NCBI para el aislamiento *Trichoderma* Río de Oro.

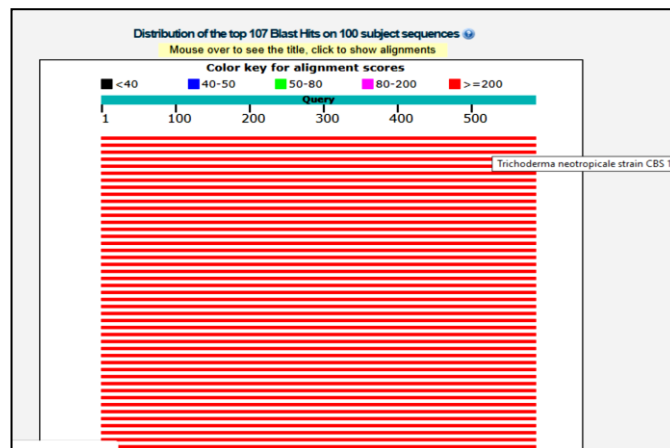


Figura 7. BLAST en el NCBI para el aislamiento *Trichoderma* González.

Por otro lado, la comparación entre características morfológicas del genero *Puccinia* y su identidad con secuencias de ITS no permitieron identificar el agente causal. Dado que las secuencias del NCBI indican una homología del 100% con el género *Epicoccum Sorghinum* (Figura 8).

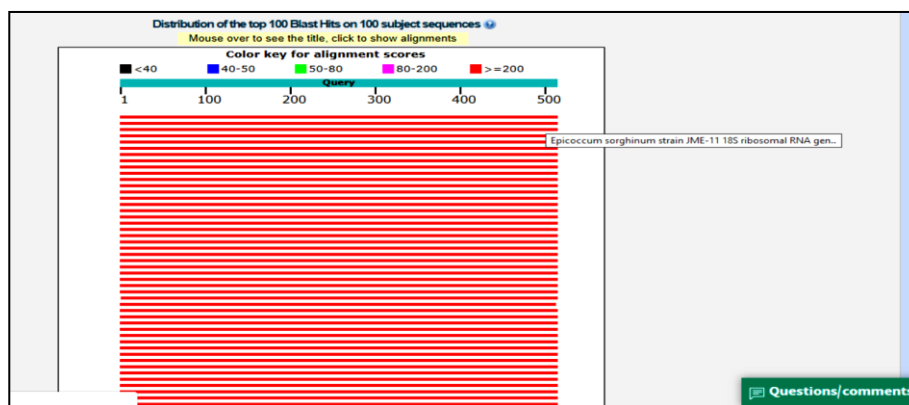


Figura 8. BLAST en el NCBI para el aislamiento *Puccinia* Cesar (*Epicoccum Sorghinum*.)

Finalmente, para la comparación de cepas, se recibieron además un total de 9 muestras de las cuales se aislaron 113 bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* mediante

aislamiento en medio semiselectivo. Dichos aislamientos se conservaron en glicerol y se diseñó una base de datos con su respectiva información. El uso de herramientas moleculares permitió encontrar la identidad de los microorganismos. A continuación se muestran los diferentes aislamientos: *Fusarium* Cesar (Figura 9) (100 % identidad), *Colletotrichum* Cesar (Figura 10) (100 % identidad), *Beauveria* Cesar (Figura 11) (100 % de identidad) con su respectivo código y BLAST en el NCBI.

Código: *Fusarium* Cesar



Figura 9. BLAST en el NCBI para el aislamiento *Fusarium* Cesar.

Código: *Colletotrichum* Cesar



Figura 10. BLAST en el NCBI para el aislamiento *Colletotrichum* Cesar.

Código: *Beauveria Cesar*

Contig:

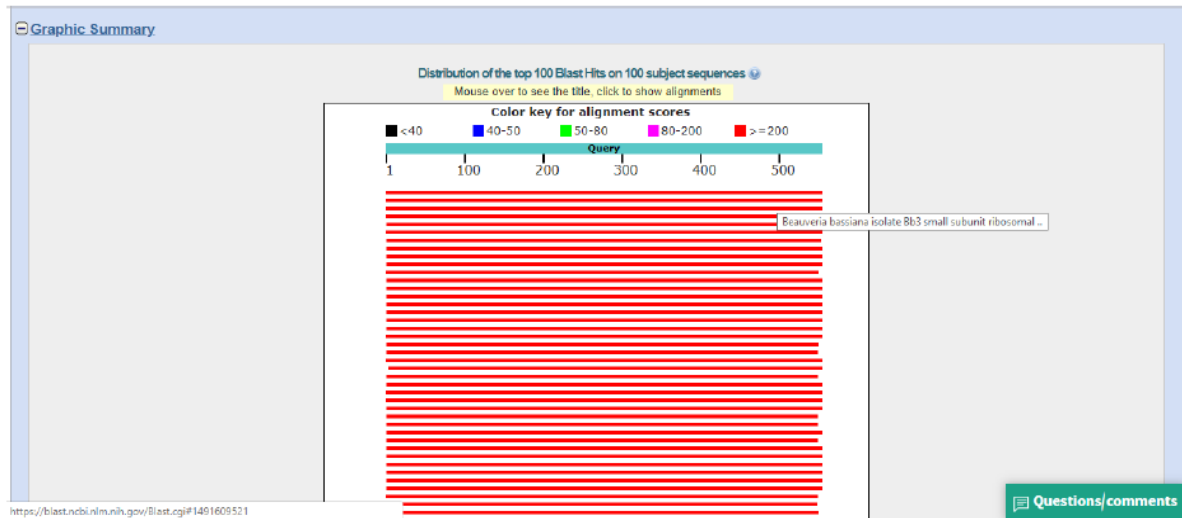


Figura 11. BLAST en el NCBI para el aislamiento *Beauveria Cesar*

Prueba De Control En Vivero

Las plantas de limonaria en los tratamientos T1 y T2, correspondientes a las cepas de *Trichoderma* 3G3 y 7R2 respectivamente, presentaron tanto a los 15 como a los 30 días de infección, sintomatología característica de la roya en su fase inicial, correspondiente a manchas de color blanco-amarillo. Sin embargo, dichos síntomas, ocasionaron solo un nivel de afectación de 17,4 y 20 % sin diferencias significativas entre estos tratamientos, pero si con el testigo en el cual la afectación fue de 74,3 % observando manchas rojizas tan solo a los 15 días de infección, las cuales a los 30 días se volvieron necróticas, y la mayoría de las hojas de las plantas se secaron y murieron prematuramente.

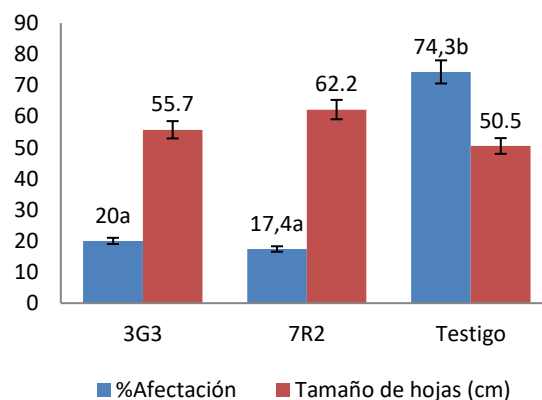


Gráfico 2. Porcentaje de afectación del patógeno a las hojas de *Cymbopogon citratus*. Valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente según Duncan 0.05

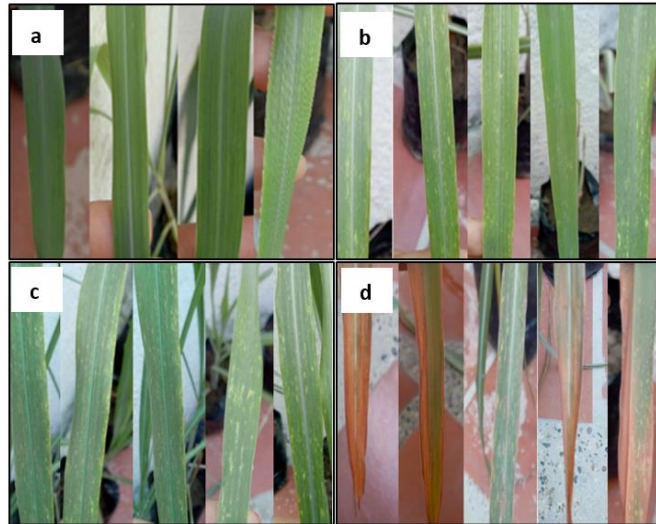


Figura 12. Control en vivero de *Trichoderma sp* en *Cymbopogon citratus* infectadas con Roya roja (30 días) a) Plantas control b) *Trichoderma* 7R2 c) *trichoderma* 3G3 d) testigo sin *trichoderma* .

Caracterización de cianobacterias fijadoras de nitrógeno en suelos cultivado con ají (*Capsicum frutescens*) en el departamento del Cesar.

En el gráfico 3 se muestran los niveles de pH con un promedio de 6,9, siendo una escala entre débilmente ácido a neutro; Rio de Oro obtuvo la escala alta con 7,2, mientras que Manaure con un valor de 6.4 siendo bajo, sin embargo, se puede considerar que no existe variación en cuanto al pH en los distintos suelos. En cuanto a la cantidad de materia orgánica, se registró un promedio de 1,62 %, con valor alto de 2,1 % y 2,0 % para Pueblo Bello y Gonzales respectivamente; el valor bajo se registró en Valledupar con 1,2 %. La densidad se registró un valor de 2g/cc en Manaure y el menor valor fue de 1,4 g/cc para Rio de Oro. En conductividad eléctrica, se registraron valores bajos; el mayor valor fue de 0,34dS.m⁻¹ mientras que el menor valor fue de 0,12dS.m⁻¹. La densidad obtuvo un promedio de 1,7g/cc.

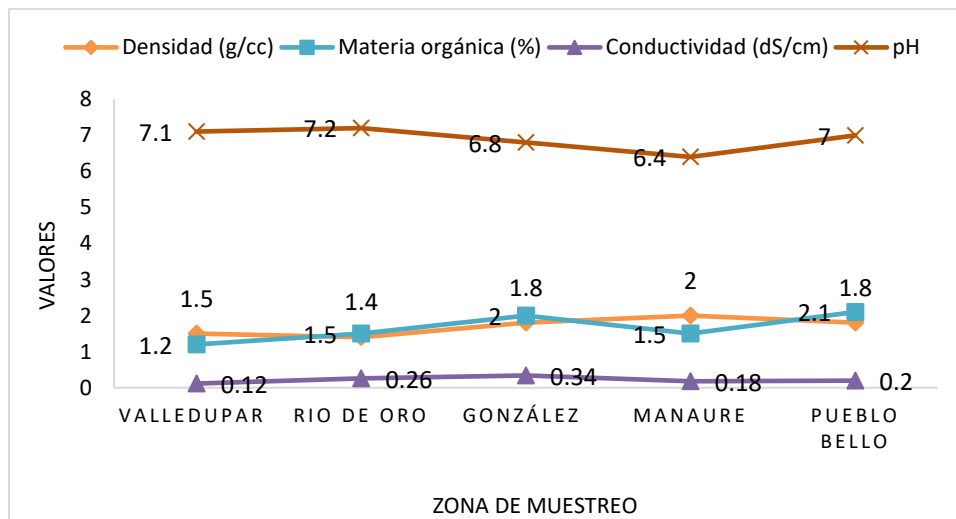


Gráfico 3. Parámetros físicos evaluados en las plantaciones de ají (*Capsicum frutescens*).

En el gráfico 4 se muestra que la temperatura presentó mayor variación en el punto de Valledupar (32 °C), debido a tener menos metros sobre el nivel de mar (168 msnm), sin embargo, se presenta un promedio de 25,4 °C teniendo como referencia los cinco sitios de muestreo. Los suelos analizados presentaron un porcentaje de 75 % y 60 % para Manaure y Rio de oro, respectivamente. Esta humedad del 60 a 80 % en el suelo permite el crecimiento de cianobacterias.

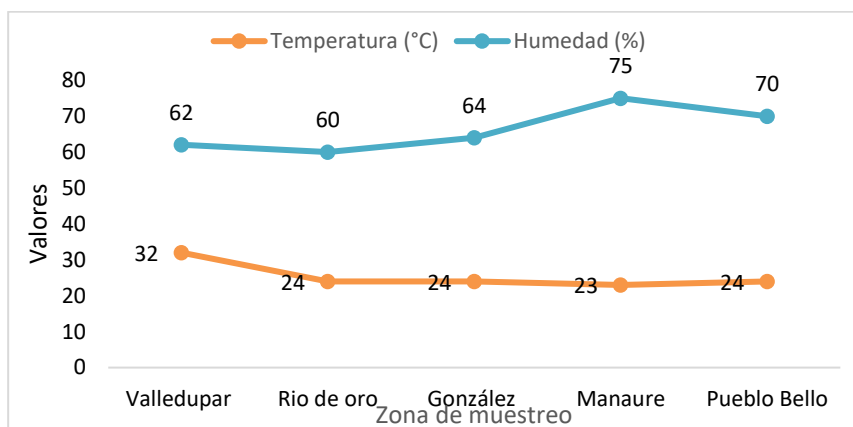


Gráfico 4. Parámetros físicos evaluados en las plantaciones de ají (*Capsicum frutescens*).

En las tablas 2 y 3 se muestran los resultados de las cantidades expresadas en mg/kg y mol/kg, respectivamente, de los diferentes macronutrientes evaluados en suelos cultivados con ají.

Tabla 2. Características químicas expresadas en mg/kg

| Punto de muestreo | Parámetros químicos (mg/kg) | | | | | |
|-------------------|-----------------------------|--------|--------|-------|------|-----------|
| | Fósforo | Azufre | Hierro | Cobre | Boro | Manganeso |
| Valledupar | 48,36 | 3,23 | 97 | 46 | 0,18 | 1,85 |
| González | 130,5 | 2,08 | 85 | 41 | 0,24 | 2,30 |
| Pueblo Bello | 62,5 | 2,88 | 92 | 53 | 0,21 | 4,20 |
| Manaure | 70,4 | 2,63 | 83 | 53 | 0,16 | 2,85 |
| Rio de Oro | 52,8 | 3,14 | 84 | 57 | 0,22 | 3,15 |

Tabla 3. Características químicas expresadas en mol/kg

| Punto de muestreo | Parámetros químicos Cmol(+)/kg | | | | | |
|-------------------|--------------------------------|----------|---------|-------|----------|--------|
| | Calcio | Magnesio | Potasio | Sodio | Aluminio | Acidez |
| Valledupar | 5,69 | 1,54 | 0,13 | 0,08 | 0,00 | 0,0 |
| González | 7,9 | 1,31 | 0,15 | 0,07 | 0,11 | 0,28 |
| Pueblo Bello | 6,43 | 1,42 | 0,12 | 0,072 | 0,0 | 0,0 |
| Manaure | 5,64 | 1,1 | 0,16 | 0,064 | 0,00 | 0,0 |
| Rio de Oro | 7,54 | 1,37 | 0,12 | 0,07 | 0,0 | 0,0 |

El análisis de varianza realizado a los parámetros físicos y químicos del muestreo ejecutado en los diferentes municipios Valledupar, Pueblo Bello, Río de Oro, Manaure y González muestran diferencia significativa en la mayoría de los resultados obtenidos de los parámetros químicos, excepto en la concentración de magnesio (Mg), Potasio (K) y Sodio (Na), que no presentaron diferencia significativa, por lo que no se les realizó prueba de Fisher.

Caracterización fenotípica de las cepas

De las muestras analizadas de los municipios de Valledupar, Manaure, Pueblo Bello, Río de Oro y González; se aislaron un total de 36 cepas de Cianobacterias sp. En la tabla 4 se muestra la distribución de las colonias con respecto a los sitios de muestreo.

Tabla 4. Numero de colonias aisladas por municipio

| Municipio | Numero de colonias |
|---------------------|---------------------------|
| Valledupar | 4 |
| Manaure | 3 |
| Pueblo Bello | 12 |
| González | 10 |
| Río de Oro | 7 |

Características morfológicas

De las 36 colonias, se logró la purificación de siete (7), distribuidas como se muestra en la tabla 5 a las cuales se les realizaron caracterización morfológica. La identificación taxonómica se hizo con base en las claves de acuerdo con Komarek et al., (2014), y Komarek & Anagnóstidis (1989, 1998; 2005). Las características morfológicas de los aislados consideradas para la identificación taxonómica fueron las siguientes: forma y tamaño de las células intercalares y terminales del filamento; grosor del filamento; presencia o ausencia de constricciones en el cruce de la pared; presencia de células necridiales; ausencia o presencia y color de la vaina; número de tricomas por filamentos, presencia, forma y tamaño de los heterocitos.

Tabla 5. Identificación de colonias purificadas

| Municipio | No. de colonias aisladas | Nombre por procedencia |
|---------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| Valledupar | 0 | V1 |
| Manaure | 0 | Mn |
| Pueblo Bello | 2 | P7-1 y P3 |
| González | 5 | M3, M2-2, M2, M2-1 y M3-3 |
| Río de Oro | 0 | M1- M4 |

En la tabla 6, se muestra las características macroscópicas y microscópicas de las cianobacterias por claves dicotómicas.

Tabla 6. Características macroscópicas y microscópicas de las Cianobacterias sp.

| Cepa | Características Macroscópicas | Características Microscópicas | Género identificado |
|--------------------|--|---|---|
| M2-1, M3-3 y P7-1. | Colonias amorfas, mucilaginosas, limosas, azul verdosas, con células densas e irregularmente dispuestas. (Imagen 1-a) | Estructuras con filamentos alargados, delgados, verdes azulados. Se evidencian numerosos tricomas por vaina; la vaina es mucilaginosa (mucosa), con terminación en el ápice. (Imagen 1 – b, c y d) | <i>Oscillatoria</i> sp. |
| M2-2 | | Célula con tricomas largos solitarios, rectos o espiralados, formando cúmulos macroscópicos finos. Son células isodiamétricas vegetativas cilíndricas, con vaina fina. Contenido celular homogéneo, septos poco evidentes, sin aerotopos. Células apicales cilíndricas con ápice redondeado (Imagen 1e) | <i>Planktolyngbya</i> del orden Oscillatoriales |
| M3 | Células alargadas, algunas de color claro y otras color negro, poco abundante. El crecimiento se observa en la superficie del medio. (imagen 1g) | Se observan células redondas irregulares, divididas en dos (fisión binaria), con una aparente vaina mucilaginosa, coloración verde claro. (imagen 1f) | <i>Synechocystis</i> sp. |
| P3 | Muestran talos largos y rectos, también mucilaginosos, con un aparente recubrimiento algodonoso. (imagen 1h) | Células unidas alargadas constituyendo filamentos sin vaina, filamentos móviles que pueden dar lugar a ovas. (imagen 1i) | <i>Microcoleus</i> sp. |
| M2 | Células alargadas de textura lisa o verrugosa, de color negro. (imagen 1j) | Se identificaron estructuras verde azules, de forma alargada que engloban pequeños círculos con aspecto de uvas, translúcida, gelatinosa y esférica. (imagen 1k) | <i>Nostoc</i> sp. |

Evaluación del crecimiento de las cianobacterias.

En el gráfico 5 se muestra el crecimiento de los consorcios de las cianobacterias aisladas teniendo en cuenta el crecimiento medido por turbidez expresados en los cultivos discontinuos durante 30 días de incubación. Los datos reflejan una paridad en el crecimiento de todas las cepas aisladas, teniendo un crecimiento exponencial a partir del día 18 alcanzando porcentajes entre 1 – 1,2 %, excepto la colonia M2 que tuvo un crecimiento inferior al 0,2 %.

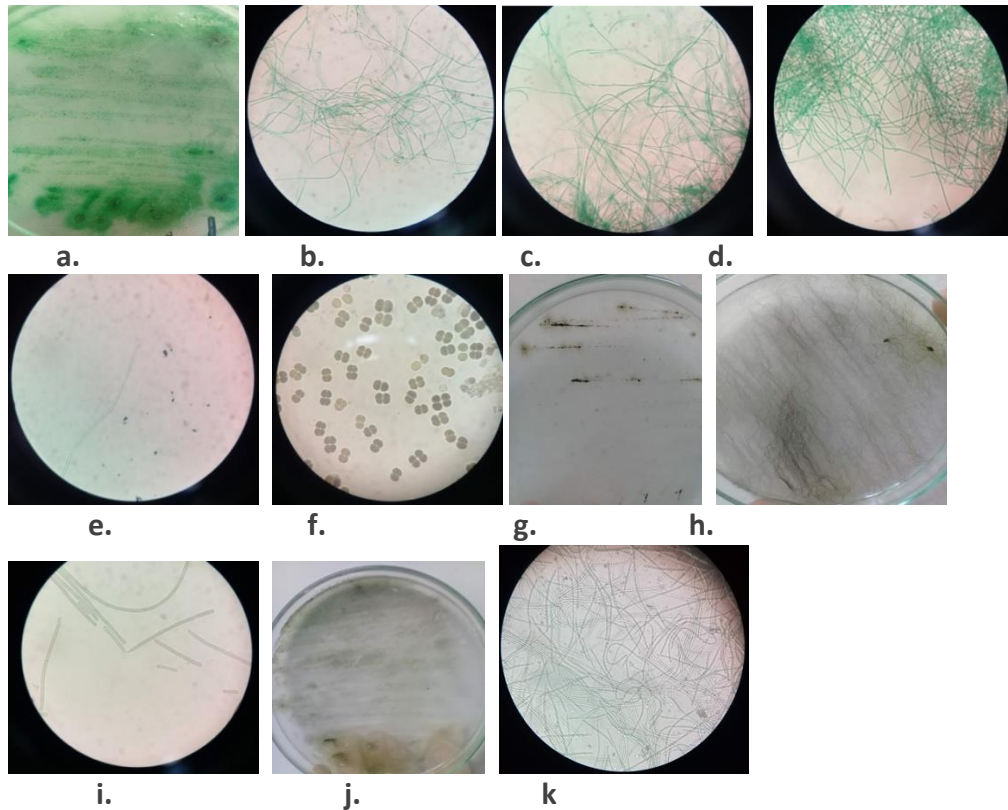


Figura 13. Observación de características microscópicas de cianobacterias en objetivo de 40x (a) M2-1, M3-3, P7-1 (b) M2-1 (c) M3-3 (d) P7-1 *Oscillatoria* sp., (e) M2-2 *Planktolyngbya* sp. (f, g) M3 *Synechocystis* sp., (h, i) P3 *Microcoleus* sp. (j, k) M2 *Nostoc* sp.

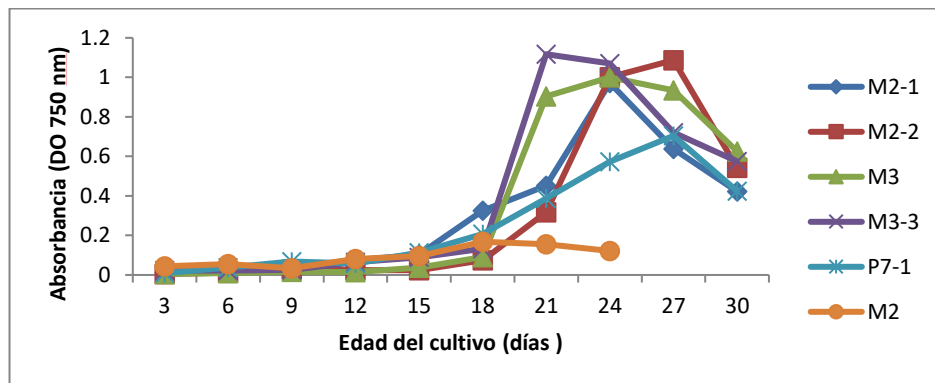


Gráfico 5. Crecimiento de cianobacterias medido por turbidez: M2-1, M3-3 Y P7-1 *Oscillatoria* sp, M2-2 *Planktolyngbya* sp M3-3 *Synechocystis* sp, M2 *Nostoc* sp

Curvas de crecimiento de colonias aisladas

Los gráficos 6, 7 y 8, muestran un crecimiento irregular de las muestras M2-1, M3-3, P7-1,



respectivamente, donde se observa un comportamiento de producción mayor en los pigmentos de ficoeritrina y clorofila, mientras que la producción de carotenoides, ficocianina y aloficianina, se vio limitada.

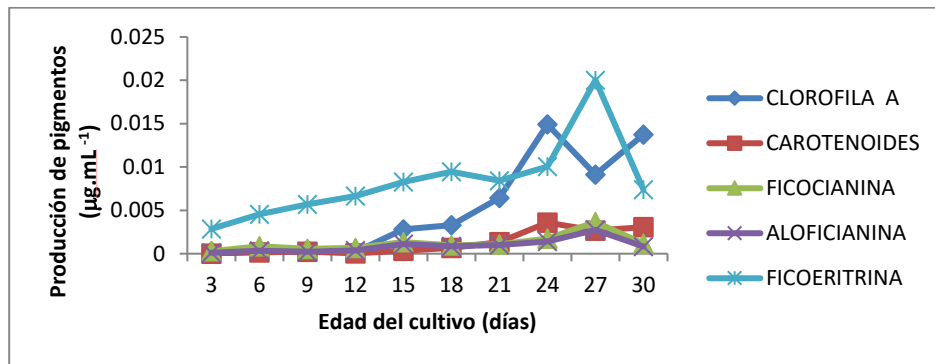


Gráfico 6. Crecimiento de la cianobacteria M2-1 *Oscillatoria* sp.

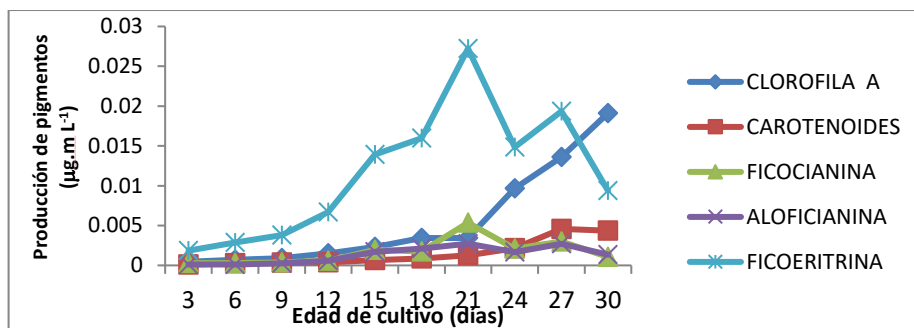


Gráfico 7. Crecimiento de la cianobacteria M3-3 *Oscillatoria* sp.

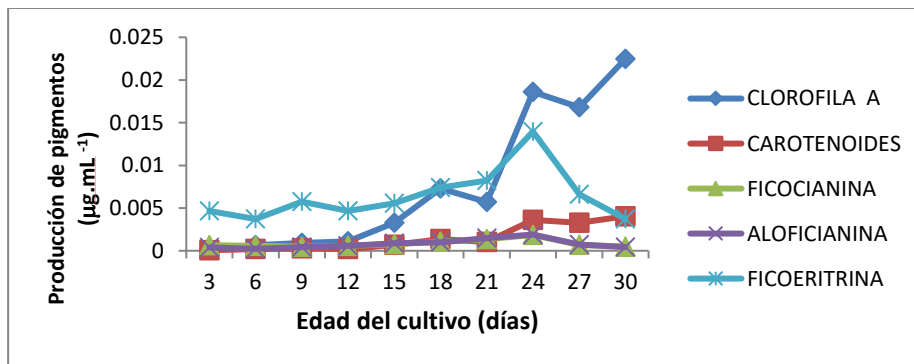


Gráfico 8. Crecimiento de la cianobacteria P7-1 *Oscillatoria* sp.

En el Gráfico 9 se observa el comportamiento irregular de crecimiento en los pigmentos accesorios para la muestra M2-2, donde se evidencia mayor porcentaje de crecimiento en la ficoeritrina y clorofila A, mientras se ve limitada el crecimiento de los pigmentos aloficianina, carotenoides y ficocianina.

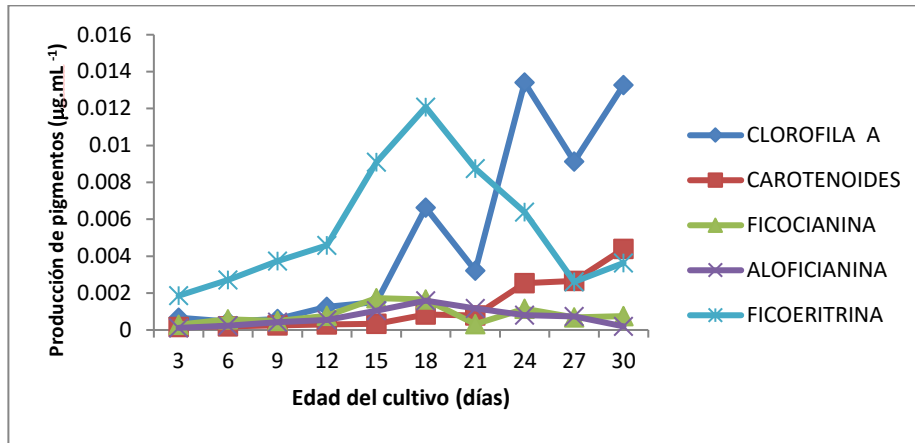


Gráfico 9. Crecimiento de la cianobacteria M2-2 *Planktolyngbya* sp.

En Gráfico 10 se observa el comportamiento del crecimiento de la muestra M3, donde se pudo determinar que a partir del día 24 todos los pigmentos presentaron un aumento en su producción. Sin embargo, la ficoeritrina presentó un mayor porcentaje de crecimiento con respecto a los demás pigmentos evaluados.

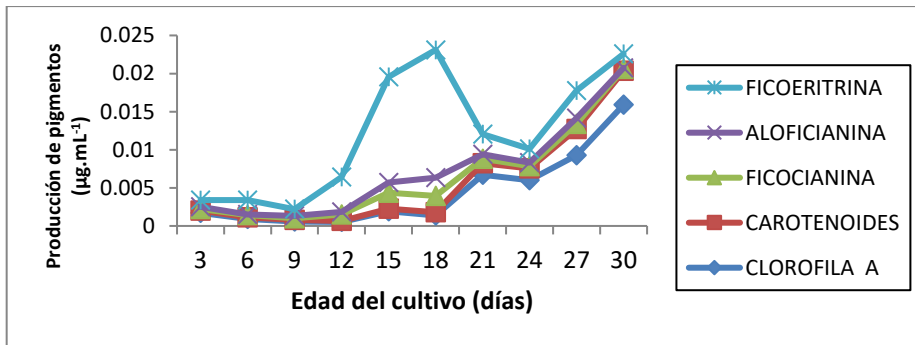


Gráfico 10. Crecimiento de la cianobacteria M3 *Synechocystis* sp

En el Gráfico 11 se observa el comportamiento en cuanto al crecimiento para la muestra M2, presento un mayor crecimiento el pigmento ficoeritrina, mientras que los otros pigmentos mantuvieron bajos porcentajes de producción.

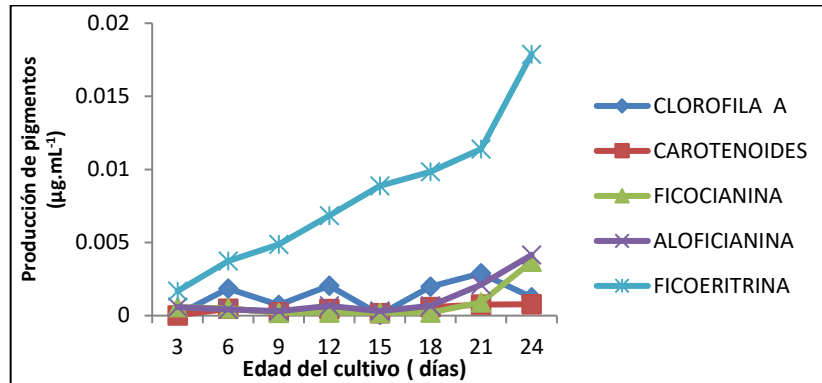


Gráfico 11. Crecimiento de la cianobacteria M2 *Nostoc* sp

Identificación molecular de cianobacterias.

El estudio mediante biología molecular de las colonias permitió establecer la identificación de dos aislados. El análisis del comportamiento molecular determinó las secuencias de ADN para un grupo de microorganismos con características pertenecientes a cianobacterias, dadas las siguientes:

Para la muestra 1, con el nombre asignado M2 corresponde con la secuencia:

```
GGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTG
TAAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAACAATGACGGTACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGG
CTGTGTAAGTCTGCTGTCAAAGAGCAAAGCTCAACTTTGTAAAGGCAGTGGAAGTACACGGCTAGAGT
GCGTTCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTG
GCGAAGGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAG
ATACC
```

Dando como resultado para la opción 1: *Desmonostoc* sp. Porcentaje de identidad: 100%. Código genbank: KR137601.1 / KR137592.1 / KF761564.1. Así mismo, se presentó una opción 2: *Nostoc* sp. Porcentaje de identidad: 100%. Código genbank: MF109994.1 / LC190509.1 / KU645906.1

Para la muestra 2, con el nombre asignado P3, corresponde con la secuencia:

```
GGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAAGACCGCGTGGGGGAAGAAGGCTCTTGGGTT
GTAAACCCCTTTTCTCTGGGAAGAAAGTTGTGAAAGCAACCTGACGGTACCAGAGGAATCAGCATCGGC
TAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAG
CGTCCGCAGGTGGCAGTTCAAGTCTGCTGTCAAAGACCGGGCTTAACTTCGGAAGGCAGTGGAAGT
GAACAGCTAGAGTATGGTAGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGG
AAGAACATCGGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGACCATAACTGACTCAGGGACGAAAGCTAGGGGAG
CG
```

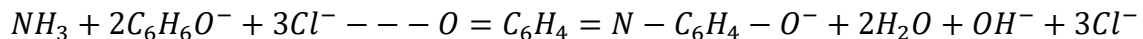



Dando como resultado el nombre del organismo; *Microcoleus vaginatus*. Porcentaje de identidad: 99.76%. Código genbank: MK211228.1 / MK487644.1 / MK478715.1 / MH688845.1

Con respecto al análisis para la identificación molecular obtenida no compartió identidad con todas las secuencias obtenidas de las cianobacterias aisladas e identificadas microscópicamente, lo que resalta la importancia de desarrollar los dos tipos de estudios para entender la biodiversidad de cianobacterias en agro-ecosistemas como el ají o cualquier otro cultivo.

Producción de la enzima nitrogenasa

En cuanto a la producción de la enzima nitrogenasa, la cuantificación del ión amonio llevada a cabo por el método de Berthelot (fenol-hipoclorito) se basa en la formación de un compuesto azul intenso de indofenol, el cual se observó tanto en los patrones como en las muestras analizadas, y que resulta de la reacción de ión amonio (NH) con compuestos fenólicos en presencia de un agente oxidante puede ser hipoclorito de sodio, u o-fenilfenol; también se utilizan catalizadores, principalmente nitroprusiato de sodio o ferrocianato de potasio. La reacción puede ser representada como se muestra a continuación, cuando se utiliza fenol e hipoclorito de sodio.



Las curvas de calibración instrumental realizadas demostraron ser equivalentes a un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$, por tanto, se escogió la ecuación de regresión que presentó la mejor pendiente y distribución de los residuales normales para cuantificar la producción de amonio y que correspondió a: $y=1,0965x-0,064$.

Tabla 7. Concentración promedio de amonio NH_4^+ (mg/l)

| Cepa | Promedio de amonio NH_4^+ (mg/L) | Desviación estándar (s) |
|-------------------|------------------------------------|-------------------------|
| M2 ^a | 0,048 | 0,003 |
| M3-3 ^b | 0,067 | 0,005 |
| P7-1 ^b | 0,048 | 0,004 |
| M2-2 ^c | 0,042 | 0,017 |
| M2-1 ^b | 0,050 | 0,004 |

Caracterización molecular de las cepas respectivamente ^a*Nostoc* sp o *Desmonostoc* sp, ^b *Oscillatoria* sp, ^c*Planktolyngbya* sp.

En la tabla 7 se resume los valores promedios (determinados por triplicado), de la concentración de ión amonio NH_4 (mg/L) producido por las diferentes cianobacterias aisladas. Los valores consignados en la tabla 8 corresponden a valores corregidos al restar del sistema (suelo inoculado), los blancos de suelo; por tanto, el valor mostrado se refiere al amonio producido de la actividad microbiana específica. De los aislados y caracterizados molecularmente todos produjeron concentraciones de ión amonio (NH_4^+) cuantificables siendo los más representativos



M3-3, M2-1, P7-1 y M2; respectivamente *Oscillatoria* y *Nostoc* sp o *Demonostoc* sp, y menor producción M2-2 *Planktolyngbya* sp.

Banco de Cepas.

En la tabla 8 se relacionan los diferentes aislamientos obtenidos, el tipo de microorganismo y el método de conservación e identificación.

Tabla 8. Banco de Cepas

| AISLAMIENTO | TIPO | ORIGEN | CONSERVACIÓN E IDENTIFICACIÓN |
|--------------------|-------------|---------------|--|
| Frijol1 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| Frijol2 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| Frijol3 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Frijol4 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Frijol5 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| Frijol6 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Frijol7 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| Frijol8 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Frijol9 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| Frijol10 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| Frijol11 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Frijol12 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Frijol13 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Frijol14 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Motilonia3.1 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| Motilonia3.2 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| Motilonia3.3 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Motilonia3.4 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| Motilonia3.5 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Motilonia3.6 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| Motilonia3.7 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| Motilonia3.8 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |



| | | | |
|----------------|----------|---------|--|
| Motilonia3.9 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Motilonia3.10 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Motilonia3.11 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Motilonia3.12 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Motilonia2.1 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Motilonia2.2 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Motilonia2.3 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| Motilonia2.4 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Motilonia2.5 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| Motilonia2.6 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Motilonia2.7 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| Motilonia2.8 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Motilonia2.9 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Motilonia1.1 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Motilonia1.3 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Motilonia1.4 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Motilonia1.5 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Motilonia1.6 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Motilonia1.7 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Motilonia1.8 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Motilonia1.9 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Motilonia1.10 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Motilonia1.11 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Motilonia1.12a | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación gram |
| Motilonia1.12b | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| Bosque1 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Bosque2 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Bosque3 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Bosque4 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Bosque5 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Bosque6 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Bosque7 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Bosque8 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Bosque9 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Bosque10 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Bosque11 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Bosque12 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Bosque13 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol |



| | | | |
|--------------|----------|------------|--|
| Palmas1 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Palmas2 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Palmas3 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Palmas4 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Palmas5 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Palmas6 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Palmas7 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Palmas8 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Palmas9 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Palmas10 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Palmas11 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Palmas12 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Palmas13 | Bacteria | Codazzi | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Cacao1 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Cacao2 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Cacao3 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Cacao4 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Cacao5 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Cacao6 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Cacao7 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Cacao8 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Cacao9 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Cacao10 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Cacao11 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Cacao12 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Cacao13 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol |
| Cacao14 | Bacteria | Manaure | Conservada en agar blando y en glicerol |
| González2.6 | Bacteria | González | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación gram |
| González5.21 | Bacteria | González | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| González3.22 | Bacteria | González | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| González3.7 | Bacteria | González | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| RíodeOro2.18 | Bacteria | Río de Oro | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| González1.5 | Bacteria | González | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| González6.4 | Bacteria | González | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| González3.24 | Bacteria | González | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |



| | | | |
|------------------------|----------|------------|--|
| González1.20 | Bacteria | González | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| González1.11 | Bacteria | González | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| RíodeOro2.16 | Bacteria | Río de Oro | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| RíodeOro4.1 | Bacteria | Río de Oro | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| RíodeOro5.3 | Bacteria | Río de Oro | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| RíodeOro2.10 | Bacteria | Río de Oro | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| RíodeOro3.25 | Bacteria | Río de Oro | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| RíodeOro1.8 | Bacteria | Río de Oro | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| RíodeOro1.17 | Bacteria | Río de Oro | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| González2.23 | Bacteria | González | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| RíodeOro3.12 | Bacteria | Río de Oro | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| RíodeOro1.19 | Bacteria | Río de Oro | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| RíodeOro1.15 | Bacteria | Río de Oro | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| González4.14 | Bacteria | González | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| RíodeOro2.2 | Bacteria | Río de Oro | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| González4.13 | Bacteria | González | Conservada en agar blando y en glicerol Identificación Gram |
| Trichoderma Cesar | Hongo | | Conservado en agua destilada estéril y glicerol, aceite mineral - Identificación molecular |
| Trichoderma Río de Oro | Hongo | Río de Oro | Conservado en agua destilada estéril y glicerol, aceite mineral - Identificación molecular |
| Trichoderma González | Hongo | González | Conservado en agua destilada estéril y glicerol, aceite mineral - Identificación molecular |
| Beauveria sp. | Hongo | Cesar | Conservado en agua destilada estéril y glicerol, aceite mineral - Identificación molecular |
| Fusarium sp. | Hongo | Cesar | Conservado en agua destilada estéril y glicerol, aceite mineral - Identificación molecular |
| Colletotrichum sp. | Hongo | Cesar | Conservado en agua destilada estéril y glicerol, aceite mineral - Identificación molecular |



| | | | |
|--------------|-------|-------|--------------------------|
| Puccinia sp. | Hongo | Cesar | Identificación molecular |
|--------------|-------|-------|--------------------------|

Discusión

Trichoderma, se haya comúnmente en la rizósfera de cultivos agrícolas, ya que actúa como biocontrolador, por lo que es habitual encontrarlo en el suelo ya sea como parte de la microflora normal o como biopreparado (FAO, 2011). Las cepas seleccionadas en este estudio, fueron aisladas principalmente de rizósfera de pasto, de cultivos de Yuca, *Aloe vera*, Ají y Frijol. Lo cual está de acuerdo con estudios que indican la viabilidad de aislamientos en dichos cultivos. García (2015), en su investigación, evaluó cepas nativas de *Trichoderma sp.*, provenientes de cultivos orgánicos de sábila (*Aloe vera*). Las cuales se aislaron principalmente de las raíces de las plantas y el suelo.

Según el DANE (2016), la yuca extrae grandes cantidades de nutrientes del suelo, estimadas en kilogramos (kg) por cada tonelada de raíces frescas cosechadas; especialmente nitrógeno (N), potasio (K), calcio (Ca) y (P) fósforo, por lo que es muy común que *Trichoderma sp* se encuentre en estos cultivos en asociación con la planta (González y Fuentes, 2015). Así mismo, el acuerdo N° 020 para la construcción del desarrollo integral y sostenible, en la zona alta del municipio Rio de Oro se hayan cultivos, como lo es el de frijol; y debido a que los suelos son de baja productividad, requieren de abonos orgánicos (estiércol de bovino seco). El cual es uno de los residuos agropecuarios más importantes y se ha utilizado como compostaje en la agricultura tradicional; uno de los hongos que se pueden encontrar en este tipo de compostaje es precisamente *Trichoderma sp* (Parra, 2008).

Adicionalmente, la no identificación de *Trichoderma* en los cultivos de cacao y yuca de los municipios de Pueblo Bello y La Paz, respectivamente, estaría asociado a las características del suelo, las cuales juegan un papel muy importante en el desarrollo de este hongo. En el municipio de Pueblo bello, la humedad es alta (MADR, 2006), lo cual dificulta su crecimiento, ya que este hongo tiene un bajo nivel de tolerancia osmótica, por lo que crece mejor en humedales moderadas, debido a la aireación del suelo y por ende el suministro de oxígeno (Poalacin, 2015). Por el contrario, según el perfil productivo del municipio de la Paz, realizado por el Ministerio de trabajo en el año 2013, el 55 % del suelo en esta zona es muy seco, mientras que el 33 % tiene una gravedad de desertificación catalogada como alta o muy alta, lo cual puede tener una influencia en la ausencia de *Trichoderma* en este municipio

Por otro lado, en Colombia Álvarez y Morales en el año 2014, realizaron una investigación similar, en la que de igual forma evidenciaron sintomatología característica de la roya roja en plantas de *Cymbopogon citratus*, y al hacer un análisis de las hojas afectadas confirmaron que se trataba del hongo fitopatógeno *Puccinia purpurea*. En este estudio, la identificación de estructuras típicas de



Puccinia, se realizó de muestras foliares de cultivos de limonaria afectados, provenientes de Ataque Cesar, el cual es un corregimiento de Valledupar con una humedad alta de 97 %, y su temperatura se mantiene en los 22 °C. Dichas condiciones climáticas, favorecen el desarrollo de este patógeno, ya que la temperatura de crecimiento óptima para la germinación de esporas y esporulación es de 15-24 °C y en climas húmedos la enfermedad es más severa (Senasica, 2016).

Aunque los ataques de *Curvularia* a plantas de limonaria no son muy comunes, si se ha reportado la presencia de este patógeno sobre las hojas mismas, tal y como lo demuestran Monteiro & Barreto en el año 2002, quienes observaron que en las hojas de *Cymbopogon citratus*, se estaban presentando inicialmente lesiones lineales de color rojizo en las porciones centrales y márgenes del limbo, mismas que progresaban llegando a ocupar la totalidad del área foliar y al hacer un análisis de las hojas, la morfología del patógeno, correspondía a *Curvularia andropogonis*.

Un estudio de la diversidad de hongos endófitos en plantas de *Cymbopogon citratus*, señala tres especies del género *Curvularia*; *C. lunata*; *C. andropogonis* y *C. tritici* con una incidencia del 7,95 %, 6,35 % y 4,6 % respectivamente. Si bien es cierto que la mayoría de los hongos endófitos se encuentran en asociación con la planta sin causarle ningún daño, cuando se presentan las condiciones adecuadas o existe la presencia de otro patógeno, como en este caso la roya, estos hongos pueden causar grandes pérdidas económicas (Perla, 2014).

La discordancia entre los resultados del laboratorio de microbiología y la técnica molecular., se asocia a que, en los ensayos realizados en los laboratorios de la Universidad Popular del Cesar, se identificaron microscópicamente estructuras típicas de *Puccinia sp*, como lo son las uredosporas y basidiosporas, precisamente el estadio infectivo de este fitopatógeno (Zuluaga *et al.*, 2008), tanto en agar Czapeck como en agar PDA, con una conservación de la cepa inferior a 30 días. En las pruebas moleculares elaboradas en la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), se determinó que la cepa enviada, identificada inicialmente como *Puccinia sp* correspondía al hongo *Epicoccum sorghium*; lo anterior, pudo deberse a que dicho análisis molecular del patógeno, el traslado y manejo inadecuado de la muestra pudo destruir el ácido nucleico, y en consecuencia ocurrir una contaminación, ya que *Epicoccum* puede presentarse en algunas ocasiones como oportunista e invasor secundario de plantas (Bleoju, 2007), siendo probable que haya aprovechado la ausencia de *Puccinia*, o que su desarrollo se haya incrementado o predominado más que esta; prevaleciendo en la prueba molecular, generando resultados no deseados (Carballés, 2007).

Por otro lado, son escasos o nulos los estudios que demuestren el ataque de *Epicoccum sohrginum* sobre plantas de *Cymbopogon citratus*; por el contrario, este género microbiano se ha descrito como endófito en dichas plantas tal como lo reportan Cándida *et al.*,(2017).

También es de anotar reportes de fallas en el procedimiento de identificación molecular mediante



el uso de cebadores específicos de tipo de ITS según Virtudazo et al (2001), *la filogenia del árbol del gen ITS puede no reflejar la verdadera filogenia de las especies en este grupo de hongos de la roya.*

Finalmente, el estudio comprueba el efecto biocontrolador que poseen los aislamientos de *Trichoderma* evaluados, lo cual sugiere, que, aunque las especies utilizadas como antagonistas, no protegieron en su totalidad a las plantas inoculadas, éstas mostraron resistencia a la enfermedad. Salazar *et al.*, (2011) señalan que los aislamientos de *Trichoderma* pudieran no controlar ciertos patógenos, pero sí pueden proporcionar a las plantas mejor desarrollo radical, lo cual mejoraría su habilidad para resistir el efecto perjudicial del patógeno.

En otros estudios, también se ha evaluado la capacidad antagónica de *Trichoderma* sobre las Royas y fitopatógenos que atacan diversos cultivos, arrojando resultados satisfactorios. Roíz *et al.*, (2013), en su estudio, evaluaron la capacidad antagónica de *Trichoderma* sobre la roya del café (*Hemileia vastatrix*), logrando resultados positivos, al evidenciar una invasión del micelio de *Trichoderma* sobre las hojas infectadas con *Hemileia vastatrix*, demostrando una vez más la acción controladora de este antagonista mediante el parasitismo.

Del mismo modo, Cruz *et al.*, (2015), determinaron la capacidad de *Trichoderma asperellum* para controlar hongos fitopatógenos en plantas de frijol, entre estos la Roya (*Uromyces appendiculatus*); obteniendo excelentes resultados al concluir que el ataque de este patógeno a dicho cultivo tuvo un índice y una distribución menor (88,6 % y 74,5 respectivamente) luego de aplicar el control. Buratto *et al.*, en el año 2017, evaluaron aislados de *Trichoderma* sobre el crecimiento micelial de *Curvularia sp in vitro*; evidenciando que el tratamiento 2 y 4 (T2 y T4), redujeron la velocidad del desarrollo del patógeno a 2,0 y 2,07 cm respectivamente, en relación con el testigo con 2,95 cm, concluyendo que la acción antagónica en estos tratamientos puede haber ocurrido debido a una menor competencia por los nutrientes del medio.

En cuanto la caracterización de cianobacterias, los resultados ilustran la presencia de macronutrientes en las muestras de suelos analizadas y una similitud en los valores en cada uno de los puntos de muestreo, demostrando esto que el tipo de suelo cultivado en cada zona climática guarda condiciones similares para el desarrollo de estos. Es muy probable que la presencia en altas o bajas cantidades, sean el resultado de los procesos de fertilización que se realizan utilizando compuestos orgánicos. En el estudio realizado por Jaurixje et al., (2013) determinaron las propiedades físicas y químicas del suelo y su relación con la actividad biológica bajo diferentes manejos, dentro de los suelos se encontraban plantaciones con ají, encontrando valores similares de fósforo (67,8) y potasio, a los registrados en esta investigación.

La capacidad cosmopolita de las cianobacterias les ha permitido adaptarse y desarrollarse en diferentes ambientes, siendo precursores idóneos del mejoramiento de los suelos, debido a la presencia de la enzima nitrogenasa en estos organismos que es capaz de romper el triple enlace



en el N molecular y transformarlo en amonio, convirtiéndolo en una fuente de nitrógeno en los suelos (Troncoso et al., 2013).

Sin embargo, con los resultados obtenidos cabe destacar que los géneros encontrados presentan un mayor crecimiento en ambientes con temperaturas no superiores a los 24 °C, siendo un factor determinante para su presencia.

Araujo et al., (2018), aislaron e identificaron cianobacterias asociadas a cultivos de arroz, determinando la presencia de los géneros *Oscillatoria* sp, *Mycrocistys* sp, *Chroococcus* sp, entre otros. Mencionan que la abundancia de cianobacterias pertenecientes al orden *Oscillatoriales* demuestra una alta producción de nitrógeno en esos suelos.

Sin embargo, Selvi y Sivakumar (2012), reportaron treinta (30) especies de cianobacterias formadoras de heterocistes provenientes de siete géneros en cultivo de arroz de la India. La abundancia de cianobacterias formadoras de heterocistos, como el caso del género *Leptolyngbya*, está asociada a bajos niveles de nitrógeno.

El estudio realizado por Jonte et al., (2003) concluyeron que especies de cianobacterias como *Nodularia* y *Anabaena*, presentan un comportamiento diferente en bajas concentraciones de la luz, expresando mayores porcentajes de turbidez con valores promedio de 350×10^8 cel/mL⁻¹. Mientras que organismos pertenecientes al género *Oscillatoria agardhii* presentan un óptimo crecimiento a bajas o moderadas intensidades luminosas, con porcentajes no mayores a $0,9 \times 10^8$ cel/mL⁻¹.

Por lo anterior se puede considerar que los resultados de esta investigación son pertinentes y obedecen al patrón de crecimiento de cianobacterias pertenecientes al orden *Oscillatoriales*.

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede determinar que las colonias aisladas son productoras, en su gran mayoría, del pigmento ficoeritrina. Esta proteína se encuentra asociada con el grupo de las ficobiliproteínas, las cuales son proteínas fluorescentes, que contienen grupos tetrapirrólicos covalentemente unidos a la apoproteína. Están organizadas en un complejo macromolecular, el ficobilisoma, cuya principal función es la captación y conducción de luz hasta los centros de reacción fotosintéticos (Bunster et al., 2000). En cuanto al crecimiento de los pigmentos, Rosales–Loaiza et al., (2017) determinó la producción de clorofila, carotenoides y ficocianina, a diferentes concentraciones, de una cepa de *Nostoc* sp. Con su trabajo pudo determinar que esta cianobacteria tiene la capacidad de producir los pigmentos antes mencionados, algunos en mayor cantidad que otros.

La cianobacteria con nombre asignado P3, no presentó resultados en cuanto al crecimiento de los pigmentos. En el trabajo realizado por Carrerra et al., (2018), determinaron que las



concentraciones de clorofila y ficocianina en el género *microcoleus* sp presentan un mejor rendimiento en pH de 7,25 - 8,5. En los resultados expresados en esta investigación los niveles de pH promediaron en 6,9 por lo cual se puede considerar que fue el factor limitante del crecimiento.

Autores como Mayz-Figueroa (2004), reportan a especies *Nostoc* sp y *Anabaena* sp, como organismos de vida libre con capacidad para la fijación de nitrógeno por la presencia de heterocistos, donde se encuentran confinada la enzima nitrogenasa, proceso que utilizan como mecanismo de protección para la reducción del oxígeno.

Hernandez et al., (2016) identificaron 21 microorganismos, dentro de los cuales se encontraron un grupo de cianobacterias de los géneros *Aphanizomenon aphanizomenoides*, *Leptolyngbya* sp. y *Anabaena oscillarioides*, consorcio que mostró una elevada capacidad de fijación de nitrógeno (10,294 nmoles etileno g⁻¹ peso seco h⁻¹).

El aislamiento y la evaluación de microorganismos autóctonos fijadores simbióticos de nitrógeno del departamento del Cesar que favorezcan los rendimientos en los cultivos por sus aportes de nitrógeno, ofrecen una alternativa viable y de gran valor para la agricultura sostenible de la región. Los resultados obtenidos en el presente trabajo darán las bases para el desarrollo a futuro de nuevos biopreparados (biofertilizantes), acorde con las necesidades del sector agrícola del Cesar que sustituyan o minimicen la utilización de productos químicos.

El suelo es un recurso viviente y dinámico que condiciona la producción de alimentos. El suelo no sólo es la base para la agricultura, sino que de él depende toda la vida del planeta ya que la mayor parte de las etapas de los ciclos biogeoquímicos tienen lugar en él. La actividad microbiana del suelo da cuenta de las reacciones bioquímicas que suceden dentro de este complejo y heterogéneo sistema (Cano, 2011). La rizosfera, definida como la porción del suelo influenciada por las raíces vegetales, es el sitio de máxima interacción entre microorganismos edáficos y entre éstos y los cultivos. Por ello, el conocimiento detallado de este ambiente y la caracterización de su biodiversidad constituyen pilares fundamentales para lograr agroecosistemas sustentables (García, 2011). Es por ello por lo que se sugiere realizar una identificación más completa de los organismos encontrados en el suelo que incluya pruebas bioquímicas y moleculares. En este primer acercamiento con la identificación de los microorganismos se pudieron aislar géneros de hongos reconocidos en la literatura por su potencial para solucionar problemáticas en el sector agropecuario y que son cada vez más usados en diferentes campos por sus beneficios.

El uso de estos microorganismos constituye una estrategia potencialmente viable. Hasta hace algunos años las investigaciones se habían limitado a la identificación de aquellos microorganismos importantes en la medicina. Hoy día las investigaciones que incluyen la presente están dirigidas a incrementar la tasa de producción para muchos más sectores, como el agrícola.



Estas estrategias se muestra como una alternativa a solucionar problemáticas actuales y que se conviertan en opciones biocorrectivas como ejemplo para la recuperación de suelos degradados (Torres, 2003).

En el presente estudio se muestra una vez más la enorme capacidad que tienen los microorganismos, de acá que su identificación sea de gran importancia para asegurar la viabilidad e integridad morfológica, fisiológica y genética para su posterior utilización en producción y que se mantengan así las características de las cepas evaluadas y se constituya una nueva vía de gran utilidad en la agricultura y de más campos de importancia para el hombre (Elvira Sánchez-Fernández et al., 2013; Khan, Bashir, & Ghosia, 2014).



Conclusiones

Con la presente investigación se logró aislar e identificar microorganismos benéficos para el desarrollo de cultivos de especies aromáticas y cultivos acompañantes. Se demostró, además, su eficiencia *in vitro* y vivero, y el significativo aporte al desarrollo de dichas plantas, con potencial uso en manejo integrado de dichas cultivadas, mediante el control de fitopatógenos con *Trichoderma spp*, y aplicación de biofertilizantes a base de las cianobacterias géneros *Nostoc sp.* y *Microcoleus*.

Específicamente, se logró obtener nueve cepas de *Trichoderma sp*, provenientes de municipios del departamento del Cesar, dos de las cuales, correspondientes a *Trichoderma* 7R2 (Municipio de Rio de oro) y *Trichoderma* 3G3 (Municipio de Gonzales) presentaron efectividad entre el 78 y 84 % en el control tanto *in vitro*, como en condiciones de vivero de la roya roja en plantas de *Cymbopogon citratus*, cuyo agente causal fue asociado a un complejo de hongos fitopatógenos correspondientes a *Puccinia* y *Curvularia* identificadas mediante microscopía óptica y el fitopatógeno endófito *Epicoccum sorhguinum* identificado mediante técnicas moleculares.

A partir de la colección de microorganismos establecida, se cuenta con un importante acervo de biodiversidad con capacidad para realizar diferentes funciones biológicas y que puede ser punto de partida para el desarrollo de productos en biofertilización y control biológico.

Adicionalmente, se lograron establecer características macroscópicas y microscópicas de los géneros *Oscillatoria sp*, *Nostoc sp*, *Synechocystis sp* y *Planktolyngbya sp*, en un total de siete colonias purificadas de 36 que se lograron aislar. La prueba de biología molecular permitió la identificación de dos organismos específicos como *Nostoc sp.* o *Demonostoc sp.* y *Microcoleus vaginatus*, de los cuales la primera especie mostró resultados en la cuantificación del ion amonio de 0,067 mg.L – 0,048 mg.L, donde se comprobó la producción de la enzima nitrogenasa.

Así mismo, se logró determinar la naturaleza del suelo donde se encontraban los cultivos de ají (*Capsicum frutescens*), identificando sus principales características físicas y químicas, logrando establecer que los resultados de los parámetros evaluados reflejaban la optimización de un suelo para el crecimiento de las cianobacterias.

En consecuencia, se recomienda ampliar el estudio para identificar la dinámica de infección de los fitopatógenos identificados en este estudio y otros reportados en cultivos de limoncillo, incluyendo la optimización del protocolo de aislamiento en medio de cultivo y la identificación mediante técnicas moleculares de *Puccinia* que permita identificar las especies asociadas y la interacción planta-patógeno que produce la sintomatología de la roya roja.



También es importante que se identifiquen las especies de *Trichoderma* para potencializar su efectividad tanto *in vitro* como en campo.

A partir de los resultados expresados, se puede recomendar realizar investigaciones para identificar la capacidad de la especie *Nostoc* sp. como organismo promotor de crecimiento vegetal en diferentes cultivos que presenten deficiencia en los niveles de nitrógeno. Así como realizar la identificación de cianobacterias en otros cultivos que se encuentren en alta producción en el departamento del Cesar, para determinar su capacidad en la producción de la nitrogenasa.

También es importante realizar cultivos discontinuos de cianobacterias para medir su eficiencia de crecimiento a diferentes niveles de pH, ensayar pruebas en campo de las cianobacterias productoras de nitrogenasa para determinar su efecto en los cultivos de plantas aromáticas y hortalizas como ají, del departamento del Cesar y finalmente realizar un consorcio de cianobacterias y evaluar su efectividad en campo, en diferentes cultivos de importancia económica en departamento del Cesar.



Referencias Bibliográficas

- Alarcón, J. (2011). Plantas aromáticas y medicinales, enfermedades de importancia y sus usos terapéuticos. Instituto Agropecuario Colombiano (ICA). 32-33.
- Álvarez & Salazar. (2014). Caracterización morfológica de las royas (Pucciniales) que afectan el limoncillo (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) en Colombia. *Bioagro Medellín, Colombia*. 26(3), 171-176.
- Antolínez, J; De Colmenares, N; Usubillaga, A; Darghan, E & Linares, S. (2008). Evaluation of agronomical variables in the cultivation of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) for the production of essential oil *Interciencia*, 33(9), 693-699.
- Araujo, D., Hernández, R. y Vanegas, J. (2018). Efecto de la Inoculación de Cianobacterias en Cultivos de Interés. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*. Volumen 5(1), Enero - Junio 2018, pp. 20 - 31
- Cándida *et al.*, (2017). Fungos endofíticos aislados do capim citronela e seleção de antagonistas a fitopatógenos. *Biota Amazonia*. 7(3), 84-88.
- Cano A. (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. *Rev U.D.C.A Act & Div Cient*. 14(2): 15-31
- Carballés, V. (2007). Diagnóstico de leucemia felina: resultados discordantes elisa-pcr. Gattos Centro Clínico Felino. Recuperado de: <https://www.gattos.net/images/Publicaciones/Vanesa/Conferencias/DIAGNOSTICODELEUCEMIAFELINARESULTADOSDISCORDANTESELISA-PCR.pdf>
- Carrera, Silvia, Velasco, Luz Adriana, & Barreto-Hernández, Alix. (2018). Potencial de microalgas bentónicas del Mar Caribe como alimento en maricultura. *Revista de biología marina y oceanografía*, 53(3), 321-333.
- Chacón, C., Andrade, C., Cardenas, C., Araujo, I., y Morales, E. (2004). Uso de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp en la remoción de nitrógeno, fosforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela. *Bol. Centro. Inv. Biol*. 38. Pp 94 -106
- Chiriboga, H; Gómez, G & Garcés, K. (2015). Protocolos para formulación y aplicación del bioinsumo: *Trichoderma* sp. Para el control biológico de enfermedades. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). Paraguay. 6-14. Recuperado de: <http://www.iicabr.iica.org.br/wp-content/uploads/2016/05/Trichoderma-SSP2.pdf>



- Cires, S y Quesada, A. (2011). Catálogo de cianobacterias planctónicas potencialmente tóxicas de las aguas continentales españolas. Ministerio del medio ambiente y medio rural y marino. Madrid, España.
- Cruz, A; Rivero, D; Echeverría, A; Infante, D; Martínez, B. (2015). *Trichoderma asperellum* en el manejo de hongos fitopatógenos en los cultivos de arroz (*Oryza sativa* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y soya (*Glycine max* L.). Grupo de Fitopatología, Dirección de Sanidad Vegetal. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). 30, 87.
- Cruz, L. (2007). Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* Thoo3 mediante fermentación bifásica a escala piloto. (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
Recuperado de: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis23.pdf>
- DANE. (2016). El cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Boletín mensual insumos y factores asociados a la producción agropecuaria. Recuperado de:
https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/Bol_Insumos_abr_2016.pdf
- Esquivel, E. (8 febrero de 2011). La Roya de la Hierba-Limón, *Cymbopogon citratus Stapf* causada por *Puccinia nakanishikii Dietel*. En Panamá [Blog Post]. Agrocienapanamensis.
- Freire, E., Koch, A., y Salvador, L. (2016). Evaluación Del Potencial Biofertilizante De Consorcios De Cianobacterias En Pasto Raygrass (*Lolium multiflorum*). Revista Agrocalidad. Vol 4.
- García. (2011). Microorganismos del suelo y sustentabilidad de los agroecosistemas. Revista Argentina de Microbiología. 43: 1-3
- Group, E. (2017). Beneficios de la Limonaria para Apoyar Su Salud. Global Healing Center. Recuperado de: <https://www.globalhealingcenter.net/salud-natural/6-beneficios-de-la-limonaria-para-apoyar-su-salud.html>
- Hernández, D., Carmona, J., Hidalgo, M., Deendoven, L., Marsch, R., y Cañizares, R. (2016). Identificación morfológica y filogenética de un consorcio microbiano fotosintético de posible interés biotecnológico. Revista científica hidrobiológica. ISSN 0188-8897. Volumen 26 (2). Pp 311-321
- Hurtado, J y Polanía, J. (2014). Técnicas moleculares para la detección de cianobacterias en los embalses Riogrande II y La Fe, Colombia. Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744), 62 (1): 403-419.



- Ji, S., Li, W., Xin, H., Wang, S., & Cao, B. (2015). *Improved Production of Sublancin 168 Biosynthesized by Bacillus subtilis 168 Using Chemometric Methodology and Statistical Experimental Designs*. 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/687915>
- Jonte, L., Rosales, N, Briceño, B, y Morales, E. (2003). La salinidad y la irradiancia modulan el crecimiento de la cianobacteria *Synechocystis minuscula* en cultivos discontinuos. *Multiciencias*, 3 (1),p.
- Katoh, H., Furukawa, J., Tomita-Yokotani, K., y Nishi, Y. (2012). Isolation and purification of an axenic diazotrophic drought-tolerant cyanobacterium, *Nostoc commune*, from natural cyanobacterial crusts and its utilization for field research on soils polluted with radioisotopes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1817(8), 1499–1505. <http://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.02.039>.
- Khan, A. A., Bashir, A., & Ghosia, L. (2014). *biologically active secondary metabolites as chemical industries and genetic engineering for the production of biologically active secondary metabolites F ungi*. (September 2015). <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014APJTB-2014-0230>
- Layton, C., Maldonado, E., Monroy, L., Corrales, L. C., & Sánchez, L. C. (10 de Noviembre de 2011). *Bacillus* spp. perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. Obtenido de Hemeroteca UNAD: <http://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/nova/article/view/501/1061>
- Mayz-Figueroa, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista UDO agrícola*. 4 (1). Pp 1-20.
- Morales, E., Martinez, R., Suarez, G. (2014). Aislamiento, cultivo, viabilidad y evaluación de un consorcio Cianobacteria-Microalga como Acondicionador de suelo. *Revista de Medicina y ciencias biológicas*. 35, 51. Pp 51-71.
- Osorio-Fajardo, A., & Canal, N. (2011). Selección de Cepas de Hongos Entomopatógenos para el Manejo de *Anastrepha obliqua* (Macquart, 1835)(Diptera: Tephritidae) en Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 64(2), 6129–6139. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0304-28472011000200010&script=sci_abstract
- Pedraza-Zapata D.M, Sanchez-Garibello M., Quevedo-Hidalgo B., Moreno-Sarmiento N. & Gutierrez-Rojas I. (2017). Promising cellulolytic fungi isolates for rice straw degradation. *Journal of Microbiology*. 55(9), 711–719
- Perla, L. (2014). Utilização do silício no manejo da queima foliar em Capim-limão *Cymbopogon*



citratus (d.c.) stapf. Minas Gerais- Brasil. Recuperado de: <http://docplayer.com.br/45553167-Lylian-perla-diniz-utilizacao-do-silicio-no-manejo-da-queima-foliar-em-capim-limao-cymbopogon-citratus-d-c-stapf.html>

- Rodríguez, R; Ruiz, C; Arias, G; Castro, H; Martínez, J & Stashenko, E. (2012). Estudio comparativo de la composición de los aceites esenciales de cuatro especies del género *Cymbopogon* (Poaceae) cultivadas en Colombia. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 11(1), 77-85.
- Roiz, D; De León, L; Paniagua, O. (2013). Evidencia de un Antagonismo *in vitro* de especies de *Trichoderma* contra la roya del café (*Hemileia vastatrix*). Centro de Ingeniería Bioquímica, Instituto de Investigaciones. Universidad del Valle de Guatemala. 61-65.
- Salazar *et al.*, (2011). Efectividad de aislamientos de *Trichoderma spp* en el control de la fusariosis del tomate en condiciones *in vitro* e *in vivo*. Instituto de Botánica Agrícola. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. 23(3), 185-190.
- Salazar, A., & Guerrero, C. (2013). Aislamiento e identificación de actinomicetos fijadores de nitrógeno en suelo del jardín botánico de la universidad tecnológica de pereira., 115.
- Sánchez, C. I., Benintende, S. M., y Benintende, M. C. (2007). Comunidad de cianobacterias durante el ciclo de cultivo de arroz (*Oriza sativa* L.). Ciencia Del Suelo, 25(1), 1–6.
- Sánchez-Fernández, R., Lorena Sánchez-Ortiz, B., Monserrat Sandoval-Espinosa, Y. K., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., Claudia García-Méndez, M., & Lydia Macías-Rubalcava, M. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Tip*, 16(2), 132–146. [https://doi.org/10.1016/s1405-888x\(13\)72084-9](https://doi.org/10.1016/s1405-888x(13)72084-9)
- SENASICA. (2016). Roya del tallo del trigo (*Puccinia graminis f. sp. tritici* raza Ug99). Dirección General de Sanidad Vegetal. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. Cd. México. Ficha Técnica No. 25. 14 p.
- Soto, M; Alvarado, P; Rosales, L; Castillo, J. (2017). Efecto del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (dc.) stapf “hierba luisa” en los niveles de ansiedad de estudiantes de educación secundaria. In Crescendo. Institucional. 8(1): 26-33.
- Tercer Censo Nacional Agropecuario, DANE (2015). Inventario agropecuario en las unidades de producción agropecuaria (UPA). Recuperado de: <https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/agropecuario/censo-nacional-agropecuario-2015>



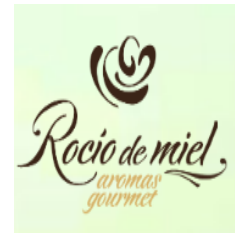
- Tofiño, A; Cabal, D; Gil, L. (2015). Análisis de componentes del sistema productivo de aguacate, con incidencia probable de *Phytophthora* en Cesar, Colombia. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CorpoICA). 16(2): 63-90.
- Torres, D. (2003). El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos. *Ecosistemas*, XII(2), 5.
- Villegas, L. (2016). Componentes para el manejo integrado de plagas en cultivos de *Mentha spicata* del Oriente Antioqueño. Universidad Nacional de Colombia. Medellín-Antioquia. Pág. (3).
- Zuluaga, et al. (2011) Filogenia de hongos roya (Uredinales) en la zona andina colombiana mediante el uso de secuencias del ADN ribosomal 28S. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Laboratorio de Biología Celular y Molecular. 59(2), 517-540.
- Wolf E. 2010. Wheat stripe rust. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service. EP-167.



Instituciones participantes



Instituto Nacional de
Tecnología Agropecuaria



Secretaría Técnica Administrativa



Con el apoyo de:



www.fontagro.org

FONTAGRO
Banco interamericano de Desarrollo
1300 New York Avenue, NW, Stop
W0502, Washington DC 20577
Correo electrónico: fontagro@iadb.org