

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE INGENIERÍA

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



**“ BACTERIAS NATIVAS OBTENIDAS DE LA PLANTA DE BANANO
SUBGRUPO CAVENDISH “ENANO GIGANTE” (*Musa acuminata* AAA) CON
POTENCIAL ANTIFUNGICO PARA EL CONTROL DE LA SIGATOKA NEGRA:
AISLAMIENTO, SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN ”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA
DAVID ORTIZ MENDOZA**

**DIRECTOR
DR. MIGUEL JUAN BELTRAN GARCÍA**

Mexicali, B. C.

Noviembre de 2010

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada

A la UABC por la oportunidad brindada

INDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	8
OBJETIVOS	13
ANTECEDENTES	14
Cultivo del plátano en México	15
Sigatoka Negra	16
Estrategias de control	17
La pared celular fungica	21
Enzimas involucradas en el efecto antifúngico	22
Quitina y quitinasas	23
Producción de antibióticos	24
Identificación bacteriana mediante ARNr 16s	25
MATERIALES	28
METODOLOGÍA	29
Aislamiento de bacterias	29
Selección por actividad Quitinasa	30
Selección por capacidad de Crecimiento en Medio Agar-Hongo	31
Antibiosis directa contra <i>Fusarium oxysporum</i>	32
Antibiosis contra <i>Micosphaerella fijiensis</i>	33
Pruebas de Afinidad al hospedero	34
Análisis microscópico y respuesta de tinción de Gram	32
Pruebas Bioquímicas	32
Identificación con ARNr 16s	36
RESULTADOS	37
DISCUSION	61
CONCLUSIONES	68
PERSPECTIVAS	70
LITERATURA CITADA	71
APENDICE 1	80
APENDICE 2	94

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Regiones productoras de Banano en la República Mexicana	15
Figura 2. Esquema de pared celular fúngica.	23
Figura 3. Localización de los predios muestreados.	29
Figura 4: Esquema de crecimiento en quitina y del sistema de antibiosis indirecta.	32
Figura 5. Esquema del sistema de antibiosis indirecta.	34
Figura 6. Crecimiento y halos de degradación de quitina coloidal.	38
Figura 7. Medición de Áreas cubiertas por las colonias bacterianas.	40
Figura 8. Incremento de tamaño de las colonias cultivadas en medio de quitina coloidal.	40
Figura 9. Diferente capacidad de crecimiento en quitina coloidal.	41
Figura 10. Incremento de tamaño de las colonias cultivadas en medio de Micelio de hongo.	42
Figura 11. Diferente capacidad de crecimiento en micelio de hongo.	43
Figura 12. Gráfica de porcentaje de inhibición del crecimiento de micelio de <i>F. oxisporum</i> . ..	44
Figura 13. Comparación de diferentes porcentajes de inhibición de micelio de <i>F. oxisporum</i>	45
Figura 14. Gráfica de porcentaje de inhibición del crecimiento de micelio de <i>M. fijiensis</i>	46
Figura 15. Ejemplos de Inhibición del crecimiento de micelio de <i>M. fijiensis</i>	46
Figura 16. Resultados de desarrollo de colonias en tres medios de cultivo	51
Figura 17. Crecimiento igual en cualquier medio de cultivo probado.	53
Figura 18. Crecimiento inhibido por el extracto de hoja.	53
Figura 19. Crecimiento potenciado por el extracto de hoja.	54
Figura 20. Crecimiento exaltado por presencia de ambos nutrientes.	54
Figura 21. Aspectos Macro y Microscópicos de las cepas seleccionadas.	56
Figura 22. Secuencias de ADN de genes de ARNr 16s	60

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Bacterias aisladas de predios de Colima y Jalisco.	37
Tabla 2: Bacterias seleccionadas.	39
Tabla 3. Valores de p-value para pruebas de Análisis de Varianza	47
Tabla 4. Resumen de las pruebas realizadas y determinación de las cepas seleccionadas. .	49
Tabla 5. Respuesta a Tinción de Gram de las cepas con un alto potencial antifúngico.	55
Tabla 6. Resultados de pruebas bioquímicas.	57
Tabla 7. Resultados de la identificación de bacterias mediante ARNr 16s	58

RESUMEN

La Sigatoka negra del Banano que afecta la producción de plátanos en México y el mundo es causada por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis*, microorganismo que posee una elevada tasa de resistencia a los fungicidas utilizados para el control de la enfermedad y cada vez es más agresiva con el cultivo. La constante exposición a los fungicidas ha provocado que el hongo sea más resistente y se deban utilizar dosis cada vez mayores de fungicidas o que las aplicaciones ocurran en periodos más cortos, lo que incide en los costos de producción. El interés de este trabajo radica en la búsqueda e impulso de alternativas biotecnológicas que conduzcan al desarrollo de un biofungicida comercial efectivo para el control de la Sigatoka negra que afectan la producción de banano en México y el mundo. Se obtuvieron 210 aislamientos de bacterias epífitas de las hojas de banano provenientes de huertos de los estados de Colima y Jalisco de las cuales 42 tuvieron una actividad quitinolítica aparente al ser capaces de desarrollarse en medio con quitina coloidal como única fuente de carbono. Posteriormente se seleccionaron utilizando los siguientes criterios: a) Crecimiento en quitina coloidal, b) Crecimiento en quitina de *Mycosphaerella fijiensis*, c) Antibiosis contra *Fusarium oxysporum* y d) Antibiosis contra *Mycosphaerella fijiensis*. De las 42 cepas, 18 tienen un marcado potencial antifúngico, inhibiendo entre un 20.14 % y un 99.88 % de *M. fijiensis* y *F. oxysporum*, De éstas 18 cepas seleccionadas, 10 resultaron Gram + y 8 Gram -. Destaca la cepa TV2 la cuál presentó la máxima inhibición al crecimiento tanto de *M. fijiensis* (99.88%) como de *F. oxysporum* (66.83%). Además se realizaron pruebas hipotéticas de afinidad al huésped, y se observaron 4 comportamientos distintos: a) Inhibición de crecimiento, b) Incremento de crecimiento, c) Crecimiento igual entre prueba y testigo, y d) Efecto sinérgico entre los tratamientos. Lo anterior, nos sugiere que algunas cepas podrán ser aplicadas directamente sobre las hojas, mientras que otras deberán ser utilizados únicamente sus exudados. Las bacterias seleccionadas, muestran un potencial

antifúngico, que nos permitirá la formulación de un biofungicida el cual será patentado incluyendo las especies bacterianas obtenidas en este trabajo.

ABSTRACT

The Banana Black Sigatoka, which affects banana production in Mexico and the world, is caused by the Ascomycete fungus *Mycosphaerella fijiensis*, a microorganism with a high resistance to fungicides used to control the disease and is each time more aggressive to that crop. Constant exposure to fungicides has made the fungus more resistant each time and thus progressively larger fungicide doses have to be used, or applications must be made more frequently, all of which increases production costs. The aim of this work is to search and foster the use of biotechnological alternatives that would lead to the development of an effective commercial biofungicide to control black Sigatoka. A total of 210 isolates of epiphytic bacteria were obtained from the leaves of banana plants cultivated in the Mexican states of Colima and Jalisco, of which 42 had evident chitinolytic activity, as they were capable of developing in a growing medium with colloidal chitin as the only source of carbon. They were later selected using the following criteria: a) Growth in colloidal chitin, b) Growth in chitin from *Mycosphaerella fijiensis*, c) Antibiosis against *Fusarium oxysporum* and d) Antibiosis against *Mycosphaerella fijiensis*. Out of the 42 strains, 18 have marked antifungal potential, inhibiting from 20.14% to 99.88% the development of *M. fijiensis* and *F. oxysporum*. From these 18 selected strains, 10 were Gram+ and 8 were Gram-. TV2 strain (*Pseudomonas* sp.) sticks out, which showed the maximum inhibition of growth for both *M. fijiensis* (99.88%) and *F. oxysporum* (66.83%). In addition, host-affinity hypothetical tests were performed, and four different behaviors were observed: a) Growth inhibition, b) Growth enhancement, c) Same growth between trial and blank, and d) Synergic effect between the treatments. This suggests that some strains could be applied directly on banana leaves, while for others, only exudates should be used. The selected bacteria show an antifungal potential that will allow the production of a biofungicide with a patent including the bacterial species evaluated in this work.

INTRODUCCIÓN

Las *Musáceas* (bananos y plátanos) son el cuarto cultivo más importante del mundo, después del arroz, el trigo y el maíz. En México se encuentra en el octavo lugar dentro de los cultivos más importantes. En 2007 la región Pacífico-Centro (Nayarit, Jalisco, Colima y Michoacán) participo con una producción de 371,979 toneladas y sembró 18,330 que produce el 20% del total de la producción nacional de plátano. A pesar de estos números en el contexto nacional debemos resaltar que la producción de plátano ha disminuido año con año pese al incremento de áreas de siembra, sobresaliendo Jalisco cuya producción disminuyo un 55% mientras que el número de hectáreas sembradas se redujo únicamente un 11% en los últimos tres años, (SIAP, 2007). La planta de plátano está expuesta a varias condiciones adversas que disminuyen el rendimiento de la fruta, sin embargo la disminución de los últimos años es debida a la Sigatoka negra, la enfermedad que más afecta la producción comercial de bananos y plátanos en la mayoría de las regiones productoras del mundo causada por el desarrollo del hongo ascomiceto fitopatógeno, *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, (Ploetz, 2000). Esta enfermedad es estrictamente foliar, lo que causa la reducción de la tasa fotosintética de la planta. La infección produce la disminución del tamaño de fruto y su maduración prematura disminuyendo notoriamente la vida de anaquel. Existen otras enfermedades que afectan la producción de banano en México, causadas por diferentes agentes, como los hongos: mal de Panamá razas 1 y 2 (*Fusarium oxysporum f. sp.cubense*), mancha foliar café por cordana (*Cordana musae* A. Zimmerm), antracnosis (*Colletotrichum musae*), las causadas por bacterias: moko del plátano (*Ralstonia solanacearum* raza 2), y la pudrición del pseudotallo, causada por *Erwinia*, incluso por el nemátodo barrenador (*Radopholus similis* [Cobb] Thorne), Existen también otras enfermedades que amenazarían potencialmente la producción de bananos y plátanos en México en caso de ser introducidas: el mal de Panamá raza 4, la mancha rojiza causada por la bacteria *Ralstonia sp.*, pecas del plátano causada por el hongo *Guignardia*

musae, el virus del cogollo racemoso o Bunchy top (por sus siglas en ingles: VBT) y el virus del mosaico de las brácteas. (Beltrán-García 2009).

El control de estas enfermedades se basa principalmente en el uso de agentes químicos, los cuales, por su uso excesivo ha provocado un aumento en la tasa de resistencia en las poblaciones de hongos fitopatógenos y no patógenos en general, lo que conlleva a un alto costo de producción y daños en la salud de las personas que están en contacto directo con los fungicidas.

Se gastan más de 500 millones de pesos en fungicidas anualmente y se depositan en el ambiente más de 7 millones de kilos de producto activo (Beltrán-García et al, 2009a). Esto ha conducido a la presión de selección de cepas del hongo resistentes y tolerantes a los fungicidas, por lo que ahora se deben utilizar fungicidas cada vez más agresivos para los humanos y el medio ambiente para únicamente limitar su crecimiento. Esto promueve la búsqueda de alternativas biotecnológicas para el control de las plagas que afectan la producción de alimentos en México. El desarrollo y uso de Biofungicidas es por lo tanto ya una necesidad para los productores de banano en el País.

Estudios de genética de poblaciones en *M. fijiensis*, revelan un alto nivel de diversidad genética y estructura entre continentes y a diferentes niveles geográficos con la aparición de nuevos genotipos del hongo capaces de tolerar diferentes grupos de fungicidas que comúnmente se aplican en plantaciones comerciales de plátano (Carlier *et al.*, 1996), (Aguilar-Barragán A. 2009). De forma paralela el uso de los fungicidas provoca la acumulación de residuos en el medio ambiente y en la fruta, intoxicaciones y enfermedades en el hombre (cáncer, malformaciones genéticas e infertilidad), tanto en los trabajadores de las zonas productoras y en los vecinos a las mismas. Ante esto las zonas bananeras hoy en día se consideran dentro de las más contaminantes en la industria agrícola.

Los estados de Colima y Jalisco tienen cepas resistentes a los tres principales fungicidas sistémicos, el benomilo, la azoxiestrobina y el propiconazol, que se usan para el control de la Sigatoka negra (Garcia-Torres, 2009; Odriozola-Casas et al., 2009). El mecanismo de toxicidad de los fungicidas de contacto y sistémicos es a través de la generación de especies de oxígeno reactivas (EOR's), que a través de procesos de oxidación de proteínas, lípidos y los ácidos nucleicos provocan la muerte de la célula fúngica, sin embargo estudios de Beltrán-García et. al. (2009b) indican que *M. fijiensis* posee un sistema de eliminación de las EOR's eficiente que evade la muerte celular. Estos hallazgos bioquímicos y moleculares explican en parte la razón de la baja efectividad de los fungicidas químicos usados y justifica ampliamente la necesidad de realizar investigación para el desarrollo de biofungicidas a base de bacterias. Sin embargo estos biofungicidas deben cumplir características básicas, como que las bacterias contenidas no sean patógenas para el hombre, sobrevivir en el ambiente del cultivo, y tener compatibilidad con las otras alternativas de manejo de la enfermedad.

Para el control del hongo de la Sigatoka negra existen algunos acercamientos para el uso de bacterias. Por ejemplo, el biofungicida comercial Serenade^{MR}, que contiene una cepa de *Bacillus subtilis* fue utilizado para el control de la Sigatoka negra, sin embargo no se observó un efecto antagonista *in planta* (Villalta y Guzman, 2006), esto se debió a que esta bacteria no fue capaz de sobrevivir en el ambiente del cultivo de banano, debido a que las condiciones ambientales existentes en el sitio del cuál fue aislada esta cepa, eran muy distintas a las condiciones en las que se pretendió aplicar.

También se ha probado el uso de hongos antagonistas del género *Trichoderma*, sin embargo su efectividad no es tan notoria, esto puede ser debido a que *Trichoderma* es un hongo nativo de suelo y es afectado por la radiación UV.

En los últimos 6 años, en el laboratorio de Sigatoka negra y estrés oxidativo de la UAG, se han realizado trabajos estableciendo acercamientos con cepas aisladas de bacterias obtenidas del filoplano de plantas de banano, concentrándose en aquellas que demuestren poseer una mayor actividad de enzimas quitinasas. Tuesta-Popolizio (2006) aísla 4 cepas bacterianas con actividad de quitinasa, y realizó pruebas sobre germinación de conidias de *F. oxysporum*. Las especies aisladas fueron *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus alvei* y *Serratia marcescens*. Mendoza-Ceja (2008) se concentró en el aislamiento de bacterias del género *Bacillus*, considerando su inocuidad y el alto potencial de colonización que exhiben. Martínez-Molina (2009) logró seleccionar 12 cepas bacterianas capaces con actividad quitinolítica, y capaces de retener el crecimiento de *M. fijiensis* y *F. oxysporum*, sobresaliendo las siguientes: *Enterobacter cloacae*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus thuringensis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas auruginosa*, *Raoultella viridans*, *Lactobacillus pentosus* y *Aerococcus viridans*.

Ante la ineffectividad de los fungicidas es necesario buscar nuevas alternativas para el control de la Sigatoka negra, donde el control biológico por bacterias nativas tiene grandes oportunidades. El control biológico se fundamenta en la utilización de hongos o bacterias para reducir los efectos indeseables de los patógenos de las plantas. En la naturaleza existe una interacción continua entre los potenciales patógenos y sus antagonistas de forma tal la disminución de estos últimos en el ambiente de la planta contribuyen a que haya enfermedad en la mayoría de los casos, es decir la pérdida del equilibrio en la comunidad microbiana reduce un control biológico que funciona naturalmente (Warrior, 2000). El mecanismo general del control biológico en los hongos fitopatógenos implica la prevención de crecimiento hifal, limitando la infección del patógeno al punto inicial de infección (Gohel *et al.* 2006).

Este trabajo forma parte de un proyecto de investigación apoyado por el Fondo Mixto CONACYT-Gobierno del estado de Colima (FOMIXCOL 2008-01, #82615),

que busca reducir el uso de productos químicos nocivos para la salud del hombre e impulsar alternativas biotecnológicas en función del desarrollo de un biofungicida patentable, para el control de la Sigatoka negra.

OBJETIVO GENERAL

Seleccionar bacterias epífitas con actividad de quitinasa colectadas del filoplano y rizosfera de plantas banano de banano cultivar Enano Gigante para el control del hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la Sigatoka Negra. Obtenidas de campos de cultivo de la región productora Pacífico Centro.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Selección de Bacterias que puedan utilizar la quitina como su fuente de carbono, probando su capacidad de desarrollo en dos diferentes medios:
 - a. Quitina Coloidal
 - b. Quitina de micelio de *M. fijiensis*
- 2 Seleccionar las cepas con mayor capacidad antifúngica a través de la determinación del efecto de las bacterias sobre el desarrollo de hongos fitopatógenos, realizando pruebas de:
 - a. Antibiosis contra micelio de *F. oxysporum*.
 - b. Antibiosis contra micelio de *M. fijiensis*.
- 3 Analizar la afinidad hipotética al hospedante mediante cultivos a base de extractos de hoja de banano.
 - a. Medio Agar-Extracto Hoja de Banano
 - b. Medio Agar-Extracto Hoja de Banano-Caseína de Soya.
 - c. Medio Agar-Caseína de Soya (TESTIGO)
- 4 Caracterización microscópica y realización de pruebas bioquímicas de las bacterias seleccionadas.
- 5 Identificación a nivel de especie mediante análisis de RNA16s.

ANTECEDENTES

Los bananos y plátanos son plantas incluidas en la familia *Musaceae*, constituida por los géneros *Musa* y *Ensete*. El género *Ensete* se reproduce por semilla, es de uso ornamental y de hábitat subtropical. El género *Musa* está formado por cuatro secciones: *Australimusa*, *Callimusa*, *Rhodochlamys* y *Eumusa*.

Eumusa es la sección con mayor importancia económica y difusión geográfica, ya que en ella se incluyen los bananos y plátanos comestibles. En esta las especies silvestres *Musa acuminata* Colla y *Musa balbisiana* Colla son las más importantes debido a que por hibridación y poliploidía, dieron origen a los plátanos y bananos cultivados actualmente. Se han clasificado en grupos que indican la contribución genotípica y el grado de poliploidía con que está constituida cada clon o cultivar. El grupo triploide de *M. acuminata* (AAA) contiene a los clones comerciales más difundidos (SEDER, 2005).

El origen del banano se considera del Sureste Asiático, incluyendo el Norte de la India, Burma, Camboya y sur de China, así como las Islas mayores de Sumatra, Java, Borneo, las islas Filipinas y Taiwán.

Como alimento es considerado uno de los cultivos más importantes en el mundo, ocupando el cuarto lugar en importancia, después del arroz, trigo y el maíz. Los bananos son consumidos extensivamente en los trópicos, donde se cultivan y en las zonas templadas es apreciado por su sabor, gran valor nutritivo y por la disponibilidad durante todo el año. El banano es un fruto muy digerible y útil en la alimentación. En los países desarrollados, las personas piensan en los bananos como una fruta sabrosa; sin embargo para más de 500 millones de habitantes en los países en vías de desarrollo (en los trópicos) es un alimento básico. Su mayor índice de consumo mundial *per capita* es en Uganda (450 kg/año), donde las palabras banana y comida tienen el mismo significado.

Cultivo del plátano en México

En México el plátano o banano es producido a nivel comercial ocupando el segundo lugar en importancia económica de los frutales cultivados. Se cuenta con 82,089 hectáreas cultivadas que producen 1,964,545 toneladas de fruta, de las cuales el 95% se destina al consumo nacional y el 5% restante a la exportación (Beltrán-García, et al. 2009). Las áreas productoras se localizan en las regiones tropicales y subtropicales de la costa del Golfo de México y Océano Pacífico. Los principales estados productores son Chiapas, Tabasco, Veracruz, Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit y Oaxaca, los cuales se agrupan en tres regiones productoras: Región del Golfo de México que ocupa el 42.6% de la superficie cultivada, comprendiendo los estados de Veracruz, Tabasco y Oaxaca. Región del Pacífico Centro con 24.4% con los estados de Nayarit, Colima, Jalisco y Michoacán. Por último, la Región del Pacífico Sur con 30.1% que comprende el estado de Chiapas y Guerrero. Los grupos taxonómicos más importantes que se cultivan en México son: AAA (Enano Gigante y Valery, Subgrupo Cavendish), AAB (Macho y Dominico, Subgrupo Plantain), AAB (Manzano), ABB (Pera o Cuadrado) y AA (Dátil).

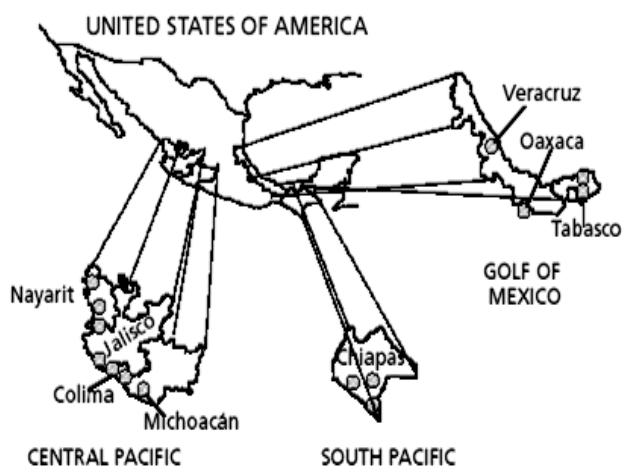


Figura 1. Regiones productoras de Banano en la República Mexicana.

Biología del agente causal de la sigatoka negra.

La enfermedad es causada por el hongo ascomiceto llamado en su fase sexual (teleomórfico) *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (anamorfo *Pseudocercospora fijiensis* Morelet Deighton) en su fase asexual. Debido a sus características biológicas de mayor producción de ascosporas, mayor número de ciclos sexuales por año y una tasa elevada de colonización de tejidos, la Sigatoka Negra logra rápidamente predominar sobre otras enfermedades foliares del banano menos agresivas (Jacome, 2002).

La Sigatoka negra (**SN**) actualmente es la enfermedad más importante que afecta la producción comercial del banano Cavendish en México. Desde su aparición en México en la década de los 90's en el Estado de Chiapas, la enfermedad se propaga con rapidez a prácticamente todas las regiones bananeras del País.

El género al que pertenece este agente fitopatógeno es de los más numerosos, más de 1,000 especies han sido reportadas, *Mycosphaerella* es quizás, el género más grande de hongos fitopatógenos existentes en la naturaleza (Crous *et al.*, 2002; Goodwin *et al.*, 2001, 2004). Una característica general en los hongos de este género es el desarrollo de manchas foliares que dañan pero no matan a su hospedero, lo que provoca pérdidas económicas considerables sobre una amplia diversidad de cultivos incluyendo cereales, cítricos, soya, jitomate, fresa y algunos miembros perennes (Farr *et al.* 1995). También es particular que los miembros de este género penetren indirectamente a través del estoma sin la producción de un apresorio.

La infección por *M. fijiensis* disminuye la capacidad fotosintética de la hoja de plátano, reduciendo la producción desde un 50 hasta un 100%. Además provoca la maduración prematura del fruto. Ambos fenómenos impactan la economía de los agricultores y la disponibilidad de la fruta.

Mycosphaerella fijiensis, tiene la característica de reproducirse tanto sexual como asexualmente durante su ciclo de vida, lo que dificulta su manejo. La fase asexual, genera conidios que son liberados desde los conidióforos a partir de las primeras lesiones de la enfermedad (pizcas o estrías). La fase sexual produce una gran cantidad de ascosporas desde estructuras llamadas peritecios, los cuales se forman sobre la superficie del estado de lesión más avanzado de la enfermedad (Gauhl *et al.*, 2000). Como producto de la gran capacidad reproductiva del hongo, éste ha alcanzado una amplia variedad genética y patogénica que le ha permitido adaptarse a diversas condiciones ambientales (Carlier *et al.*, 1996 and Rivas *et al.* 2004). Es claro que las conidias y las ascosporas juegan un papel importante en la dispersión de la enfermedad. Las conidias se forman bajo condiciones de elevada humedad, especialmente si hay una película de agua sobre las hojas. La principal forma de dispersión es la lluvia y los chorreos, podemos decir que las conidias se asocian a la diseminación local de la enfermedad y son importantes en periodos de lluvias. Sin embargo, debido a que *M. fijiensis* produce pocas conidias, las ascosporas son consideradas las mas importantes en la diseminación de la enfermedad, ya que se dispersan por el viento a grandes distancias (mas de 100 kilómetros) de la plantación a nuevas áreas de cultivo. Por lo tanto las variables agro-metereológicas que influyen en la germinación, penetración y éxito en la colonización de los tejidos internos y desarrollo de *M. fijiensis*, son la temperatura, la humedad relativa, el viento y la precipitación que definen la dinámica del inóculo y el impacto de la enfermedad en los rendimientos (Marín *et al.* 2003).

Estrategias de control usados para el combate de la Sigatoka Negra

Con el fin de disminuir las pérdidas dentro de los cultivares de banano, se aplican diversas técnicas. A continuación se describe cada uno de ellas:

A) **Cultural:** Serie de prácticas de cultivo orientadas a disminuir la fuente de inóculo dentro de la plantación, en general a reducir las condiciones micro ambientales que favorecen la infección y desarrollo de la enfermedad (deshoje o saneo, deshije, mantenimiento de drenes, control de malezas y fertilización). Los

pequeños productores de plátano utilizan estas técnicas como sistema de baja tecnología y baja inversión en insumos. No obstante, sólo se asegura un manejo parcial, que exige otras medidas complementarias, para evitar las pérdidas considerables en su producción, al no poder cubrir los altos costos requeridos para el control químico de esta enfermedad. (SEDER, 2005 y Riveros y Arciniegas; 2003).

B) **Control Genético:** Otra medida utilizada es la producción de nuevas variedades resistentes a la Sigatoka Negra, la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA) ha desarrollado mediante genética convencional, híbridos tetraploides de plátano y banano “FHIA” con ciertos niveles de resistencia a Sigatoka Negra y otras enfermedades del cultivo. La inducción de resistencia, se ha utilizado como método alternativo para hacer uso de productos naturales. (Riveros y Arciniegas; 2003). Sin embargo a pesar de su efectividad son poco comercializadas debido a la baja calidad del fruto.

C) **Control Químico:** Estrategia empleada con mayor frecuencia en el manejo de las enfermedades de las plantas de banano y plátanos. Los compuestos utilizados son causantes de la muerte celular de los hongos; incluyendo también aquellos productos que inducen resistencia sistémica en las plantas para reducir los daños de las enfermedades. Los más utilizados en el combate de la Sigatoka Negra son los inhibidores de demetilación (DMis), aminas, inhibidores Qo (QoI o estrobilurinas) y benzimidazoles. Existiendo fungicidas de contacto como el Mancozeb y Clorotalonil.

El control químico por fungicidas representa entre el 40 y 60% de los costos de producción. Se estima que en México en el año 2007 se gastaron cerca de 500 millones de pesos en la compra y aplicación de los fungicidas, según el costo promedio por hectárea/anual que es de 1100 dolares (Marín et al., 2003). La enfermedad se combate mediante la aplicación de fungicidas de acción sistémica (que penetran la planta) y por fungicidas protectores por medio de avionetas. En algunas regiones productoras anualmente se aplican entre 15 y 30 ciclos de

aspersión de fungicidas sistémicos y de 40 a 52 ciclos de fungicidas protectantes. Por lo que se calcula que cerca de 7 millones de kilos de ingrediente activo de fungicidas protectantes son depositados a escala nacional (Orozco-Santos et al., 2002). La dependencia excesiva de fungicidas ha ocasionado que la producción de banano sea considerada dentro de las más contaminantes en la industria agrícola, ya que muchos de los agentes químicos usados tienen efectos adversos para la salud. De forma paralela el uso de los fungicidas provoca la aparición de organismos secundarios al eliminar a los enemigos naturales, la acumulación de residuos en el medio ambiente y en la fruta, intoxicaciones y enfermedades en el hombre (cáncer, malformaciones genéticas e infertilidad), tanto en los trabajadores de las zonas productoras y en los vecinos a las mismas.

Estudios recientes de genética de poblaciones de *M. fijiensis*, han mostrado la aparición de nuevos genotipos del hongo capaces de tolerar diferentes grupos de fungicidas que comúnmente se aplican en plantaciones comerciales de plátano. Además provocó que el hongo desarrollara resistencia a prácticamente todos los fungicidas sistémicos utilizados, ya que el hongo de la **Sigatoka Negra** mantiene distintas respuestas moleculares al efecto de los fungicidas que influyen en la modificación de la sensibilidad o en la resistencia.

Trabajos recientes de Aguilar-Barragán (2009) y García-Torres (2009) demuestran que existe resistencia a fungicidas del grupo de benzimidazoles, estrobilurinas y azoles en poblaciones del hongo aisladas del estado de Colima y del pacífico-centro en general. De tal forma que sólo los fungicidas protectantes son funcionales, como es el caso Mancozeb y Clorotonaloil. Siendo éstos demasiado tóxicos para la fauna y el hombre. El efecto de los fungicidas se limita a retener el crecimiento de *Mycosphaerella fijiensis*; por lo que cada vez se requieren de mayores dosis y número de aplicaciones de fungicidas cada vez más agresivos en los campos de cultivos. Es probable que bajo esta dinámica de manejo de la enfermedad en algunos años sea imposible mantener la producción de plátano al

menos con la variedad enano gigante cultivar Cavendish que es la variedad mas producida en el mundo con fines comerciales.

Sumado a esto la aplicación de fungicidas en la región Pacífico Centro ha costado a los agricultores cerca de 80 millones de pesos en el último año, por lo que se deben buscar otras estrategias, siendo el control biológico una buena opción.

D) Control biológico: Este método de control de plagas en plantas consiste en el uso de organismos vivos para eliminar o controlar otro, que en décadas pasadas ha recibido atención considerable como una alternativa para eliminar el uso de fungicidas.

El mecanismo general del control biológico en los hongos fitopatógenos implica la prevención de crecimiento hifal, limitando la infección del patógeno al punto inicial de infección (Gohel et al., 2006). Esto puede ser dividido en efectos directos e indirectos. Los efectos directos incluyen la competencia por nutrientes o espacio, producción de enzimas líticas, inactivación de enzimas de patógenos y parasitismo. Los efectos indirectos incluyen aquellos que producen cambios morfológicos y bioquímicos en la planta hospedera, como tolerancia al estrés a través del fortalecimiento de la raíz y el desarrollo de la planta, solubilización o secuestro de nutrientes inorgánicos y resistencia inducida (Viterbo et al., 2002).

Bacillus subtilis, una bacteria Gram positiva, no patogénica utilizada como un hospedero rentable para la producción de proteínas a nivel industrial por varios años. Es conocida por ser una productora abundante de enzimas, incluidas glucanasas, celulasas, amilasas, proteinasas, quitinasas y productos de metabolitos secundarios. Muchas de estas especies pueden suprimir la actividad fúngica patogénica, pero la actividad quitinolítica se restringe a algunas cepas específicas (Chi-Yea et al., 2008).

Es posible que la importancia ecológica en los complejos quitinolíticos de muchos de los bacilos de suelos difieran de micoparasitos, entomopatógenos y plantas vasculares. Su rol puede residir en proveer a los bacilos con recursos fácilmente metabolizables de carbono y nitrógeno que resultan de la hidrólisis enzimática de la quitina. Esto comprobado por Melent y cols. (2001) que demostraron la habilidad de las quitinasas del *Bacillus sp* 739 para degradar sólo micelio de hongo maduro o muerto presente en suelo.

Estudios previos de Tuesta-Popolizio (2006) Mendoza-Ceja (2008) y Martínez-Molina (2009) han mostrado que el uso de bacterias puede ser una alternativa para lograr la inhibición de *Mycosphaerella fijiensis*. La manera de actuar de dichas bacterias puede ser a través de la excreción de compuestos, aprovechando los cambios bioquímicos en la pared celular.

La pared celular fúngica.

La pared celular de los hongos es una compleja estructura formada típicamente de quitina, 1,3- β - y 1,6- β -glucano, mananos y proteínas (Adams, 2004). Como se muestra en la figura 2.

El crecimiento de una hifa vegetativa es apical y la mayor parte de la quitina empieza a decaer en el apéndice. La pared apical plástica cuenta con unos polímeros no entrecruzados, lo que hace que se convierta de manera progresiva en una estructura rígida por medio de conexiones entre polímeros, ligados en enlaces no covalentes, en especial, los puentes de hidrógeno. Para permitir la extensión, la pared apical debe ser plástica, habiendo evidencia de esta naturaleza versátil. El crecimiento abarca el mantenimiento de la plasticidad del ápice combinado con la dureza de las paredes laterales.

La idea tradicional propuesta es un modelo unitario, consiste en que la pared apical es mantenida en un estado de plasticidad por el rol de enzimas como

quitinasas que están estrechamente relacionadas con la pared celular pudiendo tener papeles durante la extensión y el cruzamiento de polímeros. Se ha identificado que muchas de las hidrolasas de pared celular tienen una actividad de quitinasa o glucanasa (Adams, 2004).

En la pared celular de los hongos se producen quitinasas en todas las etapas del crecimiento, por ejemplo; durante la germinación de la espora, crecimiento exponencial y desarrollo del micelio. La actividad de quitinasa in situ tiene propiedades diferentes en células homogéneas, y parece ser la protección del estrés ambiental.

Por ello, la estructura y biosíntesis de la pared celular fúngica es única pudiendo considerarla un blanco excelente para el desarrollo de productos antifúngicos, además de otras implicaciones biotecnológicas.

Enzimas involucradas en el efecto antifúngico

El estudio de los microorganismos potencialmente antifúngicos, se debe enfocar en bacterias capaces de colonizar las hojas, soportar el ambiente del cultivo del plátano y además secretar moléculas antifúngicas como enzimas degradadoras de la pared celular incluyendo quitinasas, glucanasas, lipasas y proteasas. Algunos trabajos han demostrado que las enzimas con capacidad de degradación de la pared celular como β -1,3-glucanasas, celulasas, proteasas y quitinasas pueden estar relacionadas en el efecto antagónico contra hongos fitopatógenos (Chernin *et al.*, 1995; Dunn *et al.* 1997; Jijakli y Lepoivre 1998; Budi *et al.* 2000).

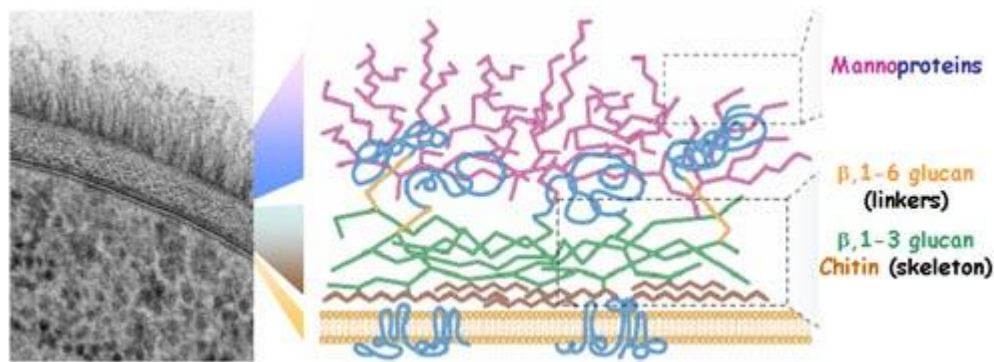


Figura 2. Esquema de pared celular fúngica. Se observa la presencia de Quitina, $\beta(1,6)$ y $\beta(1,3)$ Glucano y manoproteínas. GPI, glycophosphatidylinositol.
Tomada de <http://www.abdn.ac.uk/ims/staff/details.php?id=n.gow>

Quitina y quitinasas

La quitina, un homopolímero de β -1,4 ligada a residuos de N-acetil-D glucosamina, que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza (Hoster et al., 2005). Las funciones fisiológicas de las quitinasas dependen de su fuente. En hongos el rol es fisiológico durante la división celular, diferenciación y nutrición, además se relaciona con la actividad micoparasítica.

Las quitinasas forman parte de un grupo de enzimas hidrolíticas capaces de romper el polímero de quitina en oligosacáridos de quitina, diacetilquitobiosidasa, y N-acetilglucosamina. El rompimiento eficiente de la quitina para metabolizar monómeros requiere la acción de endo y exo-quitinasas para liberar N-acetilglucosamina monomérica, la cual puede ser transformable para generar energía, CO_2 , H_2O y NH_3 (Thompson et al., 2001).

Las quitinasas (EC 3.2.1.14) están presentes en un amplio rango de organismos, que incluyen virus, bacterias, hongos, insectos, plantas y animales. En base de este criterio de secuenciación, las quitinasas están clasificadas en 18 familias y 19

glicosil hidrolasas (Itoh et al., 2003). Los miembros de la familia tienen diferentes estructuras tridimensionales y usan diferentes mecanismos catabólicos.

La familia 18 de quitinasas es omnipresente. Pero la familia 19 de enzimas ha sido identificada mayormente en plantas. Se pensaba como una parte constitutiva de los mecanismos en contra de hongos patógenos para la degradación de la pared celular. En plantas, isoformas específicas pueden jugar un papel en el desarrollo del embrión, polinización y la reproducción sexual (Itoh et al., 2003, Gohel et al., 2006).

Las quitinasas estructuralmente están constituidas por numerosos y diferentes dominios, incluidos el dominio de unión a quitina, fibropectina tipo III, y cadherina. El de unión a quitina tiene un rol importante en la degradación de quitina insoluble; la función de los otros dos dominios está por elucidarse (Thompson et al., 2001).

Estas enzimas son clasificadas en tres categorías basadas en la manera de romper las cadenas de quitina. Las endoquitinasas, exoquitinasas y N-acetilglucosaminasas (Yoon et al., 2009).

Producción de antibióticos

La antibiosis es uno de los mecanismos más importantes contra infecciones causadas por hongos. Los agentes supresores de hongos más reconocidos son las *Pseudomonas fluorescens*, haciendo de este grupo el más ampliamente estudiado como productores de antibióticos en la rizósfera. Siendo los derivados de la fenazina, los más implicados en el biocontrol, contribuyendo a la supresión de enfermedad (Gohel et al., 2006). Las poblaciones microbianas evolucionan y se asocian formando una biopelícula en las raíces y suelo de superficies particulares. Una vez establecidos en la fitósfera, los aislados de *Bacillus* pueden desplegar un arsenal de antibióticos. (Ongena et Jacques 2007). Se demostró que la rizósfera de las plantas de banano constituyen un microambiente favorable para las bacterias de suelo (Sutra et al., 2000).

Uno de los organismos más usados y bien estudiados, es la rizobacteria *Bacillus subtilis* donde el 4- 5 % de su genoma contiene información para la síntesis de antibióticos y cuenta con el potencial de producir más de dos docenas de compuestos antimicrobianos estructuralmente diversos (Stein, 2005).

Los antibióticos peptídicos son una clase abundante de metabolitos especiales producidos por muchas especies microbianas, incluidas las bacterias Gram positivas. (Weid von der et al., 2003). Tres importantes tipos de moléculas se encuentran involucradas en el antagonismo de las bacterias provenientes de la rizósfera contra los patógenos fúngicos: sideróforos, antibióticos y ácido cianhídrico (HCN) (Loper y Schroth 1986; O'Sullivan y O'Gara 1992).

Dentro del estudio realizado por Tendulkar et al., 2007, el péptido obtenido de *B. licheniformis* BC98 fue identificado como surfactina, la cual provoca el mal crecimiento de hongo para formar el apresorio necesario para la penetración del tejido del hospedero. Los resultados indican que el péptido afectó la distribución de los elementos del citoesqueleto, actina y tubulina y como consecuencia se perdió el crecimiento direccional del hongo.

Identificación bacteriana mediante estudio de RNAr 16s.

La secuenciación de los genes del RNAr 16s se ha convertido en el patrón de referencia de la taxonomía bacteriana. El gen 16S ADNr tiene unos 1.600 nucleótidos de longitud, y en su secuencia existen unas porciones conservadas y otras variables y específicas de cada especie llamadas oligonuclótidos firmas. Se trata de secuencias específicas cortas que aparecen en todos (o en la mayor parte de) los miembros de un determinado grupo filogenético, y nunca (o sólo raramente) están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos. (Woo PC 2003). Por ello, los oligonucleótios firma pueden utilizarse para ubicar a cada bacteria dentro de su propio grupo. El elevado grado de conservación evolutiva del 16S ADNr lo hace muy útil para realizar estudios genéticos a nivel de especie, considerando lo siguiente:

- 1 . Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales. Constituye, por tanto, una diana universal para su identificación.
- 2 . Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios.
- 3 . Los cambios ocurren de manera suficientemente lenta, como para aportar información acerca de todos los procariotas; contienen sin embargo, suficiente variabilidad para diferenciar no sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos.
- 4 . El tamaño relativamente largo de los ARNr 16S (1500 nt) minimiza las fluctuaciones estadísticas.
- 5 . La conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso.
- 6 . Dado que resulta relativamente fácil secuenciar los ADNr 16S existen bases de datos amplias, en continuo crecimiento.

El método molecular de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S incluye tres etapas: a) amplificación del gen a partir de la muestra apropiada; b) determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón, y c) análisis de la secuencia. (Cook V.J. 2003).

Amplificación

La amplificación del ADNr 16S se realiza en un termociclador, gracias a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Como sustrato se utiliza normalmente ADN purificado a partir de un cultivo bacteriano puro. Para la amplificación del ADNr 16S, las regiones conservadas facilitan el diseño de oligonucleótidos

iniciadores (20 nt, aproximadamente). Cuando se pretende amplificar el ADNr 16S prácticamente completo, se utilizan iniciadores diseñados en base a secuencias conservadas próximas a los extremos 5' y 3' del gen, que originan amplicones de 1.500 pb, aproximadamente. Sin embargo se ha demostrado, que una identificación precisa no siempre requiere la amplificación, y posterior secuenciación, del ADNr 16S completo. En estas circunstancias se utilizarán oligonucleótidos que permitan la amplificación de fragmentos de menor tamaño, preferentemente las 500 pb correspondientes al extremo 5' del gen.

Secuenciación del amplicón

En esta etapa se llevan a cabo las reacciones de secuenciación y el análisis de los productos por electroforesis. Actualmente, la disponibilidad de secuenciadores automáticos facilita enormemente la etapa de detección. El número de bases generadas por un secuenciador automático es de 500 a 900. La identificación de una bacteria a nivel de especie no requiere necesariamente la secuenciación del ADNr 16S completo. De hecho, aunque existen posiciones filogenéticamente informativas a lo largo de todo el gen, la mayor variabilidad se concentra en las primeras 500 bases, correspondientes al extremo 5'. Generalmente, esta secuencia de 500 bases será suficiente para la correcta identificación de un aislado clínico, necesitándose únicamente 2 iniciadores

Análisis de la secuencia

La última etapa será la comparación de la secuencia del ADNr 16S con las depositadas en bases de datos. Actualmente existen distintas bases de datos, algunas públicas, cuyo acceso es libre a través de internet, como GenBank, NCBI (National Center for Biotechnology Information), EMBL (European Molecular Biology Laboratory), RDP (Ribosomal Database Project), RIDOM (Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms).

MATERIALES

Reactivos

Acetona (Analytyca)
Agar bacteriológico (Bioxon)
Agar Eosin Azul de metileno (EMB) (Bioxon)
Agar Papa Dextrosa (PDA) (Difco)
Agar Trypticaseína de Soya (CASO) (Bioxon)
Agar Eosina (Bioxon)
Caldo Papa Dextrosa (PDB) (Difco)
Cloruro de Amonio (Baker)
Cloruro de Sodio (Baker)
Caldo Trypticaseína de Soya (CASO) (Bioxon)
Fosfato de potasio monobásico (Baker)
Fosfato de potasio dibásico (Baker)
Peptona de Carne (Bioxon)
Quitina de concha de cangrejo grado reactivo (Sigma)
Reactivos de tinción GRAM

Equipos

Agitador orbital
Bomba de Vacío
Microscopio AxioLab Carl Zeiss
Estufa de incubación Felisa
Campana de Flujo Vertical (Bacteriológica)
Esterilizador

METODOLOGÍA

Aislamiento de bacterias provenientes del filoplano y rizosfera de plantas de banano de huertos comerciales de cultivar Enano Gigante var. Cavendish de la Región Productora Pacífico Centro.

Las bacterias fueron aisladas de muestras de material procedente de hoja y suelo de dos predios: A) “La Uva”, en Cihuatlán, Jalisco, y B) “Valdovinos”, ubicado en Armeria, Colima. como se muestra en la Figura 3.

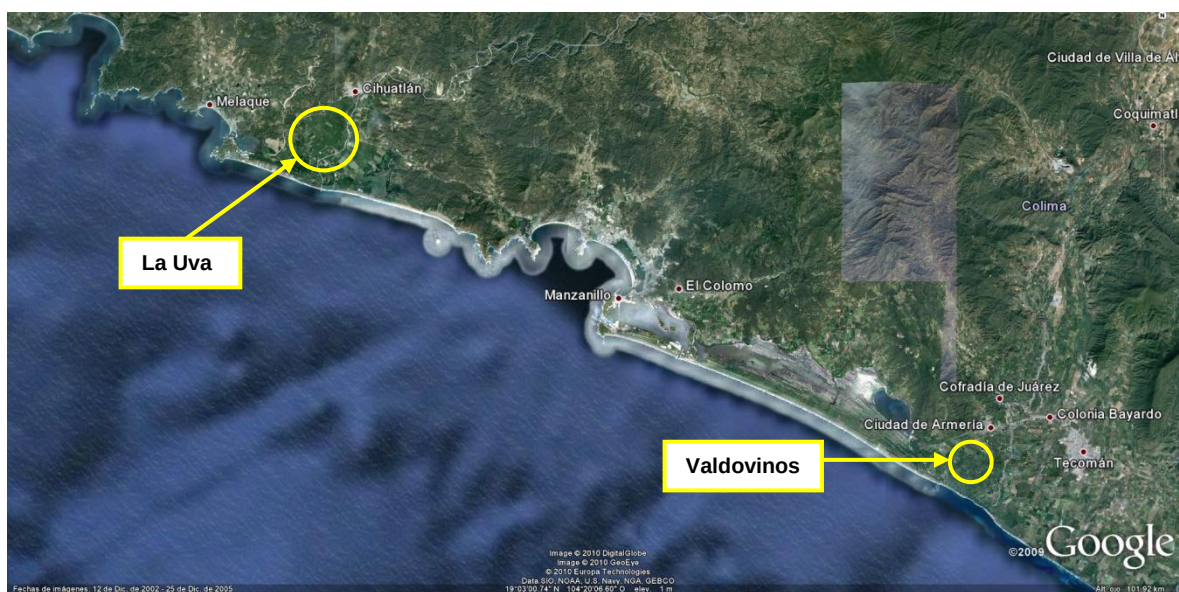


Figura 3. Localización de los predios muestreados: A) La uva, Cihuatlán, Jalisco. B) “Valdovinos”, Colima.

Se colectaron dos hojas por planta, las cuales fueron conservadas en bolsas de papel para su traslado. Para el mismo fin, se tomaron muestras de tierra, procedentes del lugar donde se encontraba la planta, haciendo una excavación de más de 30 cm de profundidad y teniendo cuidado de colectar porciones significativas adyacentes a la raíz, ya que se ha demostrado que la rizósfera de las plantas de banano constituyen un microambiente favorable para las bacterias del suelo (Sutra et al. 2000).

De las muestras obtenidas se tomó una porción equivalente a 1g de material, la cual fue incubada en un matraz Earlenmeyer de 250 ml con 100 ml de caldo tripticaseína de soya (CASOY). Se incubó 24 horas a 35°C sin agitación puesto que no se trataba de producción de biomasa, por lo que no fue necesario el uso de aireación.

Una vez incubadas se tomó una muestra con un asa de nicromo para su siembra en cajas petri con agar CASOY (Triplicaseína de Soya). Fueron incubadas por 24 horas a 37°C.

Se seleccionaron las colonias con apariencias morfológicas distintas. En los casos donde no se observó un buen aislamiento se debió resembrar para hacer una segunda selección.

1. Selección de Bacterias que puedan utilizar la quitina como su fuente de carbono, probando su capacidad de desarrollo en dos diferentes medios:

a. Selección de Bacterias que puedan utilizar la quitina coloidal como su fuente de carbono.

A partir de las colonias bacterianas crecidas en CASOY, se seleccionó una colonia la cual se transfirió con un hisopo a una cajas de petri conteniendo un medio reducido de Agar-quitina coloidal al 0.35%. Las cajas se marcaron en tres cuadrantes, y se realizó la transferencia de una colonia aislada a una de las tres áreas colocándola en el centro de cada área en la menor superficie posible. Se inocularon 2 de las 3 áreas (Figura 4A). Se cultivaron a 37°C por 48 hrs observando el crecimiento de la colonia y la formación de halos de degradación de quitina, los cuales se manifiestan como una región de transparentación del medio inmediata al borde de la colonia. Se realizaron mediciones del área sembrada, y del área colonizada a las 96 hrs.

Preparación de quitina coloidal

A 5g de quitina comercial se le agregaron 100 ml de H_3PO_4 al 85% en agitación. La mezcla se mantuvo a 5° C por 24 horas. Posteriormente se añadió agua corriente, hasta la formación de un material gelatinoso de coloración café que fue vertido dentro de un embudo Buchner conectado a un sistema de filtración por vacío. Se efectuaron lavados con agua corriente hasta que el filtrado alcanzó un pH 6.5.

Conservación de las bacterias aisladas

Las bacterias quitinasa positivas seleccionadas se resembraron en cajas petri con agar CASO y se tomó una colonia para su preservación en viales con 30 g/l de peptona, 3 g/l de NaCl y 14 g/l de agar. Las muestras se conservarán por triplicado a cuatro grados dentro del refrigerador, con el fin de mantener las cepas disponibles para posteriores pruebas.

b. Selección de Bacterias que puedan utilizar micelio de *M. fijiensis* como su fuente de carbono.

Se colectó micelio de *M. fijiensis* de cultivos puros obtenidos en el laboratorio. El micelio se separó del agar, se filtró y lavó con agua destilada. Una vez escurrido se le agregó acetona cubriendo todo el micelio y se permitió su evaporación con la finalidad de deshidratarlo completamente, complementando el secado con estufa a 65 °C. El material seco se fragmentó utilizando mortero y nitrógeno líquido hasta obtener un polvo que se tamizó por malla de 100 μm . Se prepararon placas de Agar-Hongo a .35% en cajas de petri de 5 cm de diámetro. Se sembró con isopo una colonia en el centro de la caja, abarcando la menor área posible, y se incubaron por 48 hrs a 37°C. Se realizaron mediciones del área sembrada, y del área colonizada a las 48 hrs.

2. Seleccionar las cepas con mayor capacidad antifúngica a través de la determinación del efecto de las bacterias sobre el desarrollo de hongos fitopatógenos, realizando pruebas de:

a. Prueba de antibiosis contra *Fusarium oxysporum*.

Debido a que *M. fijiensis* presenta un crecimiento de micelio sumamente lento, se decidió utilizar el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* (agente causal del mal de Panamá en banano) para analizar la efectividad de las bacterias contra una cepa de este hongo. Se prepararon cajas de petri con medio Papa Dextrosa Agar (PDA), y se marcaron dos líneas en los extremos opuestos, cada una a 1.5 cm del borde de la caja, mediando una distancia de 4 cm entre cada una (Figura 4B).

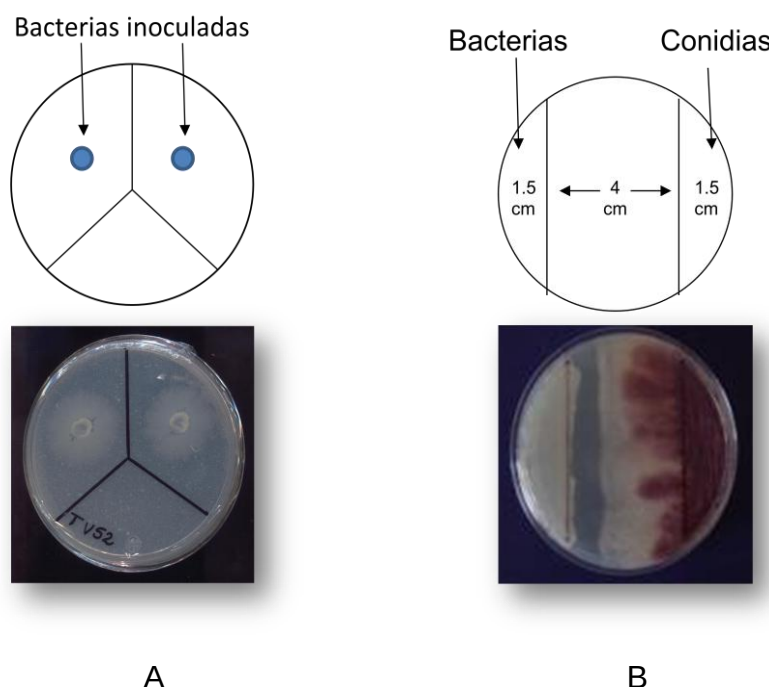


Figura 4. A. Esquema de las pruebas de crecimiento en medio reducido de quitina coloidal y B. análisis de antibiosis directa en la confrontación de la cepa bacteriana y las esporas de *Fusarium oxysporum*.

En una de las áreas, se inoculó con una cepa bacteriana, teniendo la precaución cubrir toda el área pero sin salirse de ella. En el otro extremo se colocaron 2,500 conidias de *F. oxysporum* tomando las mismas precauciones. Se incubaron a

temperatura ambiente, en obscuridad y se procedió a medir el área cubierta por el crecimiento del hongo cada 48 hrs., el experimento se dio por concluido cuando el micelio testigo de *F. oxysporum* tocó la línea del área de siembra de las bacterias. Este ensayo se montó en tres ocasiones por duplicado. Se procedió a medir las áreas cubiertas y a calcular el porcentaje de inhibición.

b. Prueba de antibiosis directa contra *M. fijiensis*

Se prepararon cajas de petri de 5 cm de diámetro, con medio PDA, colocando 8 ml de medio por caja. Se sembraron bacterias tomándolas con isopo y cubriendo totalmente la placa de agar. Se incubaron por 24 hrs a 37°C. En cajas por separado, se vertió 4 ml de medio PDA cubriendo todo el fondo de la caja de petri y se permitió su gelificación, obteniéndose una capa fina de agar de 2 mm de espesor. Posteriormente se despegó con una espátula estéril la lámina de agar y cuidadosamente se cubrió con ella toda el área de cultivo de bacterias de la primera caja, de tal forma que las bacterias quedaron separadas del hongo por la membrana de agar superior de 2 mm de espesor, a través de la cual las bacterias pudieron difundir sus productos de secreción sin entrar en contacto directo con el micelio. Se procedió a colocar tres pellets de 2 mm de diámetro de *M. fijiensis* provenientes de un cultivo en medio líquido (Caldo PD) de 10 a 12 días, como se muestra en la Figura 5. Las cajas selladas se incubaron a temperatura ambiente en obscuridad por 12 días, se midió el diámetro de crecimiento de los pellets, y se calculó el volumen de crecimiento de los mismos. Los ensayos se hicieron por triplicado. Este ensayo tiene importancia práctica debido a que su resultado sugiere que en caso de haber inhibición del crecimiento del micelio, este será causado por productos difundidos a través del agar.

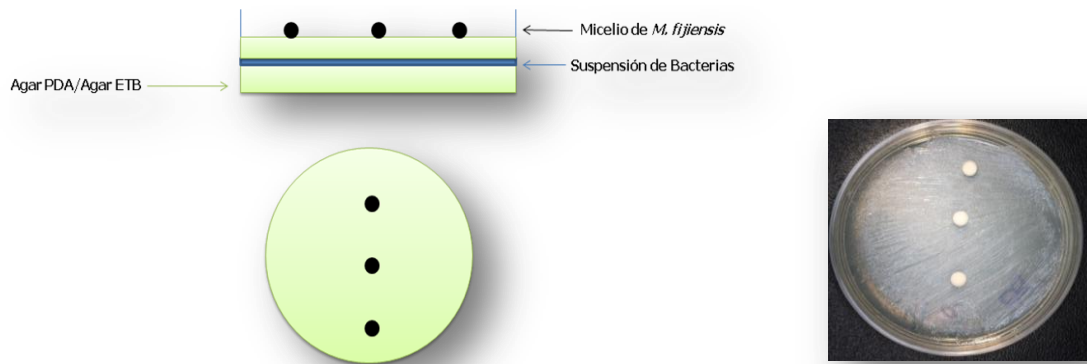


Figura 5. Esquema del sistema de antibiosis indirecta en la confrontación de la cepa bacteriana y los pellets de *M. fijiensis*.

3. Establecer afinidad al hospedero mediante cultivos a base de extractos de hoja de banano.

- a. Medio Agar-Caseína de Soya. (TESTIGO)**
- b. Medio Agar-Extracto Hoja de Banano.**
- c. Medio Agar- Extracto Hoja de Banano-Caseína de Soya.**

Se prepararon cajas de petri de 5 cm de diámetro, con tres medios de cultivo diferente.

- a. Medio Tripticaseína de Soya CASOY (TESTIGO).

Preparación estándar con 40 gr. por litro.

- b. Medio Extracto de Hoja de banano.

Se tomaron 5 gr de hoja de banano sana en la parte central del filoplano. Se maceró en un mortero con 50 ml de agua destilada, hasta obtener un extracto verde oscuro intenso, y se procedió a filtrar con papel filtro en un embudo Buschner con bomba de vacío. El extracto filtrado se aforó a 500ml y se añadió 10 gr de Agar Bacteriológico, obteniéndose una concentración final del extracto V/V de 10%.

c. Medio Extracto de Hoja de banano.

Se realizó la extracción similar al medio b, pero se sustituyó el agar bacteriológico por el agar tripticaseína de soya a la misma concentración del medio a. Se sembró una colonia bacteriana en el centro de cada caja, utilizando un hisopo de algodón generando un área de inoculación de 0.25 cm² aproximadamente. Se incubó por 48 hrs a 37 °C, y se procedió a obtener imágenes para su análisis.

4. Caracterización microscópica y realización de pruebas Bioquímicas de las bacterias seleccionadas.

Análisis microscópico y respuesta de tinción de Gram

Se realizaron frotis de las colonias bacterianas seleccionadas como degradadoras de quitina, para su posterior observación en el microscopio, determinando así su naturaleza positiva o negativa respecto a la tinción Gram. Este análisis también sirvió para distinguir el grado de pureza del cultivo.

Pruebas bioquímicas

Las cepas de bacterias seleccionadas fueron sometidas a una serie de pruebas bioquímicas con la finalidad de obtener un acercamiento a su identificación. Con las cepas bacterianas de cultivos de 14 hrs, se procedió a probar su capacidad de reducir los siguientes azúcares: Manitol, fructuosa, dextrosa, sacarosa, xilosa, galactosa, sorbitol y lactosa. Además, se inocularon en los siguientes medios: Agar de hierro de Kligler, agar citrato de Simmons, agar hierro-lysina (LIA), medio SIM, medio MIO, gelatina nutritiva y caldo urea.

5. Identificación de las especies mediante análisis de RNA 16s.

Para la preparación del DNA se tomaron de colonias aisladas en placa, se resuspendieron en 20 µl de agua destilada y se hirvieron durante 3 minutos. La mezcla de reacción contenía 3 µl de la suspensión, 1X tampón de la enzima, 1 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM del primer 907R (5'-CCG TCA CTT C(N*)T TTG AGC TT-3') 0.025 u/µl Taq DNA Polimerasa (Roche). La amplificación del gen 16S rRNA de bacterias se llevó a cabo en un Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems).

La secuenciación del amplicón se realizó en un secuenciador MacroGene

La comparación de la secuencias del ADNr 16S se realizó con las depositadas en las bases de datos libres a través de internet: GenBank, NCBI (National Center for Biotechnology Information), EMBL (European Molecular Biology Laboratory), RDP (Ribosomal Database Project), RIDOM (Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms).

RESULTADOS

1. Aislamiento de bacterias provenientes del filoplano y rizosfera de plantas de banano de huertos comerciales de cultivar Enano Gigante var. Cavendish de la Región Productora Pacífico Centro.

Se obtuvieron un total de 387 aislamientos bacterianos, a partir de muestras de cuatro predios de Colima y Jalisco, de los cuales, 67 tuvieron actividad quitinolítica. Esto es: fueron capaces de desarrollar colonias en el medio de cultivo Agar-Quitina, o desarrollaron un halo de degradación marcado.

Tabla 1: Bacterias aisladas de predios de Colima y Jalisco. (Martínez-Molina 2009)

A. Bacterias obtenidas de hojas.		B. Bacterias obtenidas de muestras de suelo.	
PREDIO	Número de Bacterias Aisladas	PREDIO	Número de Bacterias Aisladas
Valle Nuevo	51	Valle Nuevo	29
Colomos	32	Colomos	148
Valdovinos	19	Valdovinos	38
La Uva	54	La Uva	16
TOTAL	156	TOTAL	231
C. Organismos con actividad Quitinolítica obtenidos de Hojas		D. Organismos con actividad Quitinolítica obtenidos de Suelo	
PREDIO	Número de Bacterias Aisladas	PREDIO	Número de Bacterias Aisladas
Valle Nuevo	19	Valle Nuevo	7
Colomos	12	Colomos	7
Valdovinos	4	Valdovinos	10
La Uva	8	La Uva	0
TOTAL	43	TOTAL	24

Selección de bacterias provenientes de huertos de banano con capacidad de degradar quitina coloidal como única fuente de carbono

Las cepas aisladas fueron divididas en dos lotes según la procedencia de las muestras de hoja y suelo. Las originarias de los predios de La Uva y Valdovinos fueron destinadas a la realización de éste trabajo, mientras que las provenientes de Colomos y Valle Nuevo, fueron manejadas para la realización de la tesis de licenciatura de Martínez-Molina 2009.

Se pueden apreciar en la Figura 6, la presencia de halos transparentes, causados por la degradación de la quitina coloidal que le da un aspecto opaco al agar. Estos halos, llegaron a ser cercanos a los 5 mm. Este hecho, fue considerado como el primer filtro de selección, para realizar los siguientes experimentos con bacterias que presentaran una notoria actividad quitinolítica, y tomándose la decisión de realizar los siguientes experimentos, únicamente con las 42 cepas bacterianas que respondieron mejor a este tratamiento. Estas cepas se encuentran enlistadas en la Tabla 2.

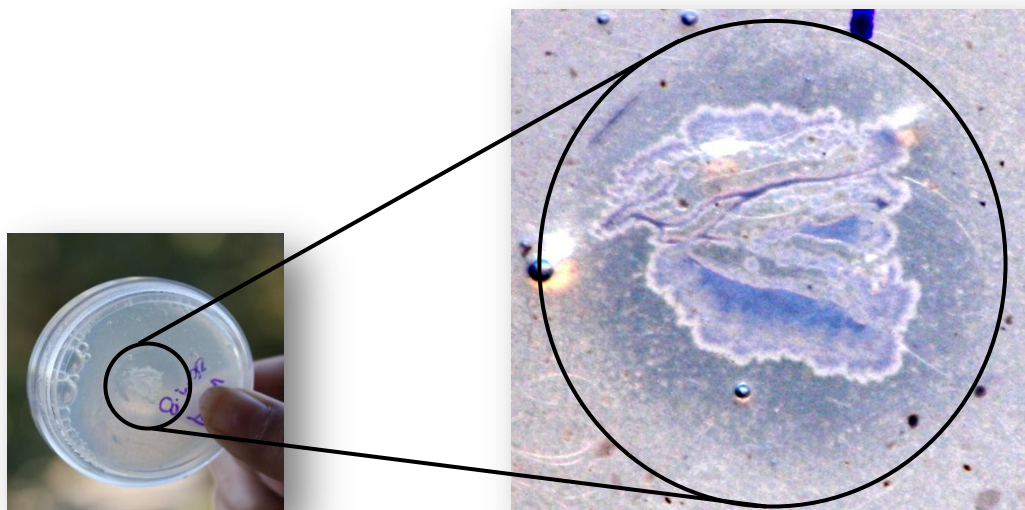


Figura 6. Crecimiento y halos de degradación de quitina coloidal, presentadas por algunas bacterias y considerado como criterio de selección.

Tabla 2. Bacterias seleccionadas de predios de Colima y Jalisco.

CEPA	CEPA	CEPA	CEPA
P1 Va	P4 Vb dg	P6 Vb dg	Tv 42 a
P1 Vb	P4 Vc dg	P6 Vc	Tv 42 cc A
P1 Vd	P4 Vc1	P6 Ve	Tv 42 cc B
P1 Ve	P4 Vc2	P6 Vf	Tv 51 ac
P1 Vg	P4 Vd	P6 Vh	Tv 52
P2 Va	P5 Vb dg	Tv 1c	Tv 5b
P2 Vb	P5 Vd E dg	Tv 1 cA	Tv 5 e
P2 Vb dg	P5 Vg dg	Tv 2	Tv 5f
P2 Ve	P6 Va	Tv 3c	Tv 5g
P4 Va dg	P6 Va dg	Tv 41 ac	Tv 5 ñc
	P6 Vb	Tv 41 bc	

Las medidas de diámetros y superficies de las colonias desarrolladas en los siguientes experimentos, se realizaron con el programa Images Plus 2.0 ML analizando imágenes escaneadas con escáner HP G4050 a 200 dpi, y con fotografías con cámara Canon 40D a 3800 x 2500 pixeles.

La Figura 7, muestra la utilidad del software de análisis de imagen, que después de ser calibrado, brinda datos numéricos de perímetros y áreas de superficies irregulares con una exactitud de centésimas de la unidad empleada.

a. Selección de Bacterias por su capacidad de desarrollo al utilizar la quitina coloidal como su fuente de carbono.

Este bioensayo se realizó en función de evaluar y seleccionar las bacterias que produzcan la mayor actividad quitinolítica. Del análisis inicial de aislamiento, se seleccionaron 42 cepas provenientes del predio La Uva de Jalisco, y Valdovinos de Colima. Como resultado principal se obtuvo que el 100% de las cepas fueron capaces de crecer en medio de quitina, sin embargo, 9 de ellas (21.5%) sobresalieron por tener un buen desarrollo en el agar-quitina coloidal, en un área por lo menos 5 veces superior a la sembrada. (Fig. 8).

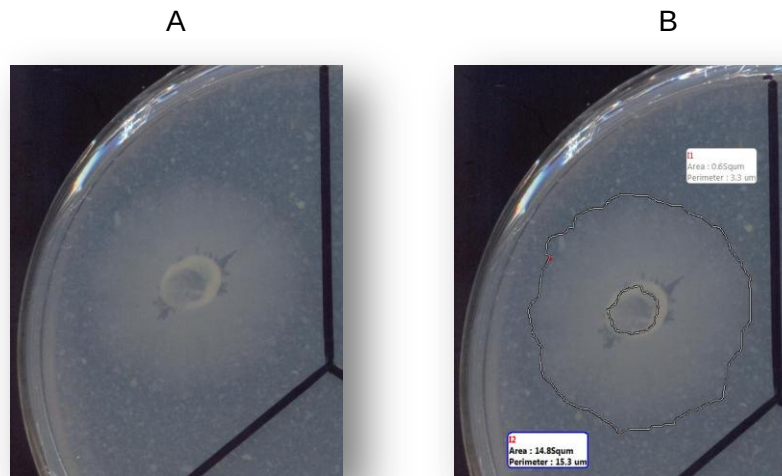


Figura 7. La imagen A fotografiada y contrastada contra un fondo negro, que permite observar el área inoculada con un hisopo, y el desarrollo de una colonia en un medio de agar-quitina. La imagen B corresponde a la misma colonia procesada con la herramienta de medición de perímetros y áreas.

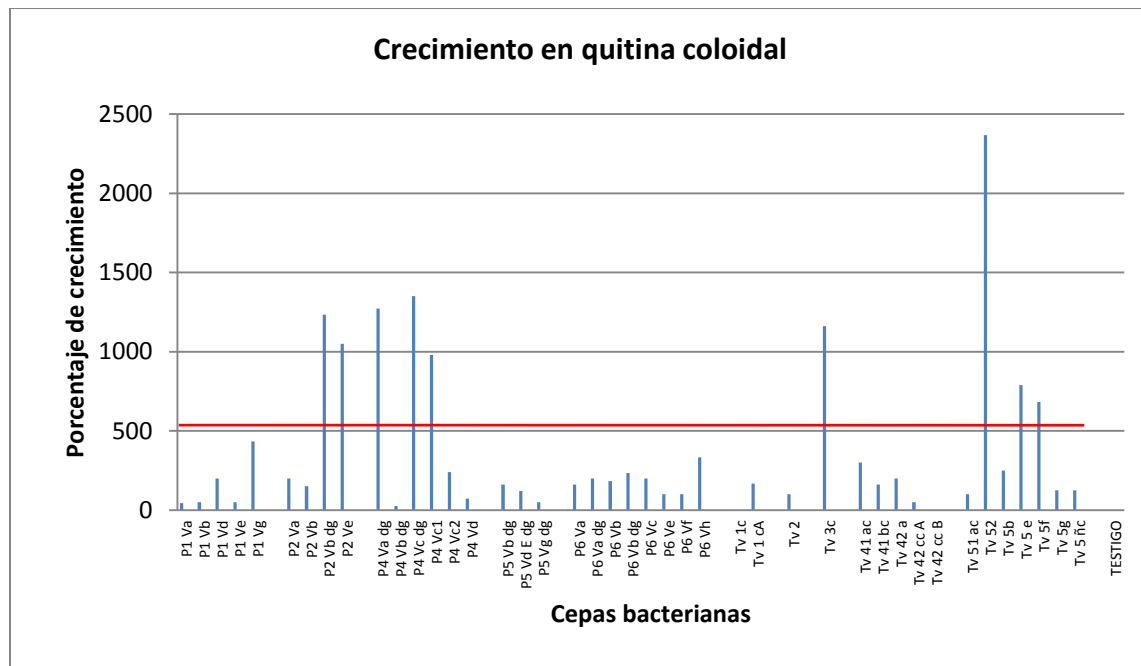


Figura 8. Porcentaje de incremento de tamaño de las colonias de cepas de bacterias cultivadas en medio de quitina coloidal al 3.5%. La línea en el 500 establece el límite inferior del criterio de selección.

Las bacterias que rebasaron el límite inferior superando 5 veces el área sembrada fueron: P2Vbdg, P2Ve, P4Vadg, P4Vcdg, P4Vc1, Tv3c, Tv52, Tv5e y Tv5f. En la Fig. 9 se muestran imágenes que ejemplifican diversos niveles de desarrollo de las colonias. Este crecimiento en el área de las colonias, sugieren que las bacterias pueden ser móviles y consumen eficientemente la quitina coloidal como única fuente de carbono. Los halos de degradación de quitina coloidal, fueron más fácilmente observados en las colonias con un mayor crecimiento.

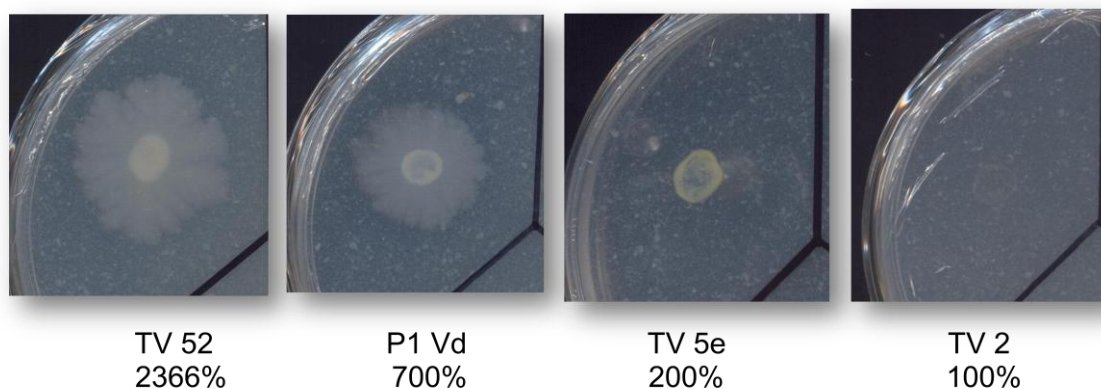


Figura 9. Secuencia comparativa entre diversas cepa de diferente capacidad de crecimiento en Quitina Coloidal a las 96 hrs de incubación.

b. Selección de Bacterias por su capacidad de desarrollar en un medio con fragmentos de micelio de *M. fijiensis* como fuente de carbono.

Utilizando los componentes estructurales del micelio de *M. fijiensis* como fuente nutricional, 39 cepas fueron capaces de crecer en medio de micelio de hongo, sin embargo, 13 de ellas sobresalieron por incrementar la superficie de colonización de la placa de agar micelio de hongo en un área hasta 5 veces superior a la sembrada. (Fig. 10). Esto nos permite no únicamente conocer cuáles cepas bacterianas pueden eventualmente alimentarse de *M. fijiensis*. Más importante resulta que se descarta la posibilidad de que los componentes del hongo puedan causar un efecto inhibitorio al desarrollo bacteriano al entrar en contacto directo, y

además es probable que los componentes del micelio tomados como fuente de nutrientes, induzcan a la secreción de metabolitos distintos o en mayor proporción que en otro medio de cultivo.

Al analizar las cepas con mayor incremento de área de colonización, tanto en agar quitina coloidal (AQC) como en agar micelio de hongo (AMH), únicamente 7 de ellas desarrollan grandes colonias en ambos medios, mientras que 1 de ellas desarrolla mejor en AQC, y otras 6 desarrollan mas en AMH. Esto se debe a que los fragmentos de hongo contienen un gran número de moléculas utilizables como fuente de carbono además de la quitina, tales como grasas, proteínas y ácidos nucleicos. (Pérez-Hernández 2009)

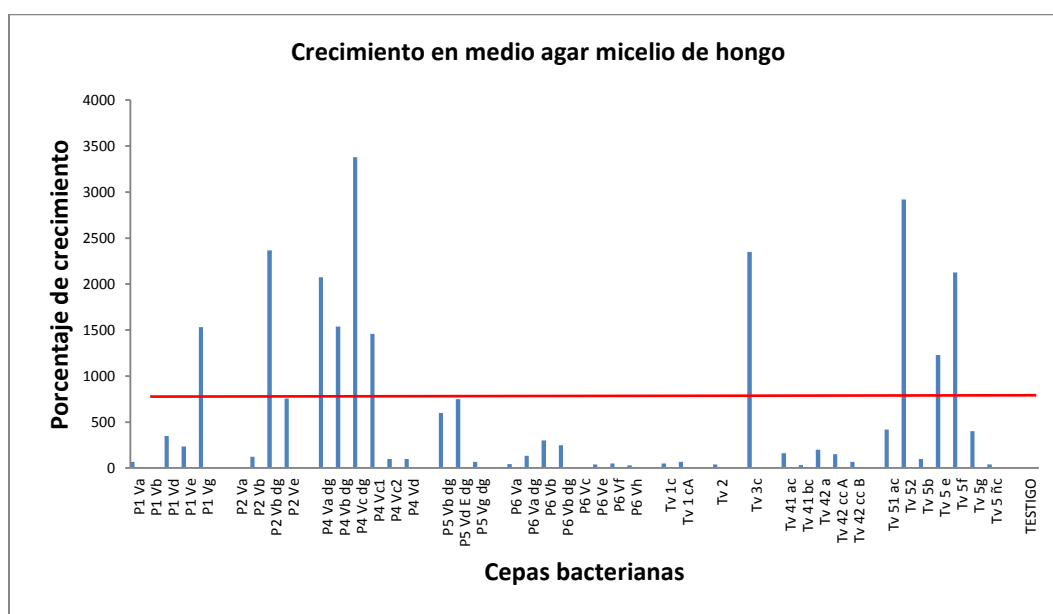


Figura 10. Porcentaje de incremento de tamaño de las colonias de cepas de bacterias cultivadas en medio de cultivo Agar-Micelio de hongo al 3.5%

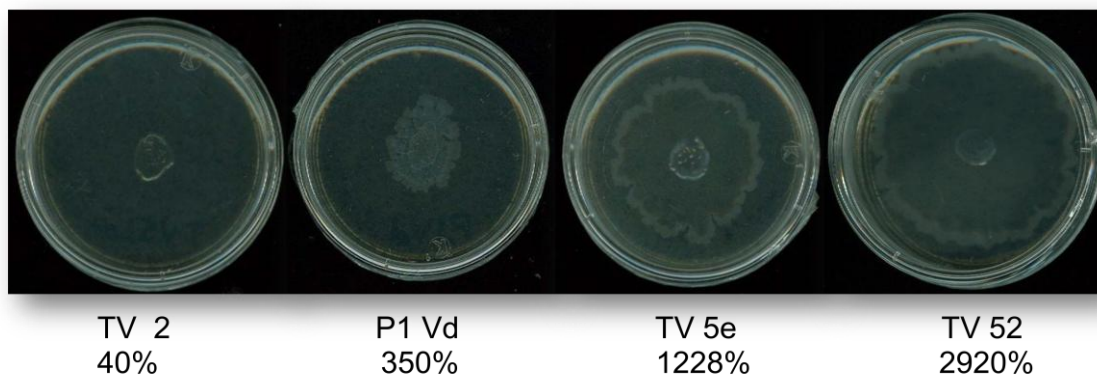


Figura 11. Secuencia comparativa entre diversas cepas de diferente capacidad de crecimiento en Micelio de Hongo a las 96 hrs de incubación. Se indica el porcentaje de incremento de la colonia con respecto al área originalmente sembrada.

Las bacterias que rebasaron el límite inferior superando 5 veces el área inoculada fueron las siguientes: P1Vg, P2Vbdg, P2Ve, P4Vadg, P4Vbdg, P4Vcdg, P4Vc1, P5Vbdg, P5VdEdg, provenientes de hoja, y Tv3c, Tv52, Tv5e y Tv5f aisladas de suelo. Por otro lado, las cepas P1Vb, P2Va y P6Vc, no fueron capaces de desarrollarse, resultando totalmente inhibidas. En la Fig. 11 se muestran imágenes que ejemplifican diversos niveles de desarrollo de las colonias.

3. Selección de las cepas con mayor capacidad antifúngica a través de la determinación del efecto de las bacterias sobre el desarrollo de hongos fitopatógenos, realizando pruebas de:

a. Prueba de antibiosis contra *Fusarium oxysporum*.

Las 42 cepas de bacterias quitinasa positivas, fueron evaluadas por la prueba de antibiosis directa contra *F. oxysporum*. Las muestras provenientes de hoja fueron 26 y 16 aisladas de suelo. El objetivo de éste experimento, es seleccionar a las cepas bacterianas que provoquen un retardo en el desarrollo del micelio, a partir del contacto directo con las bacterias y sus metabolitos que difundidos por el agar, retengan o impidan el crecimiento del hongo.

Se obtuvo como máximo de inhibición de crecimiento del 66.83% ocasionado por la presencia de la cepa TV2 aislada de muestras de suelo. La cepa proveniente de la hoja con mayor capacidad de inhibición del crecimiento micelial fue la cepa P6Vc con un 38.82%. El menor porcentaje de inhibición de crecimiento del hongo se presentó en la prueba utilizando la cepa de hoja P2Va con un 1.22% de inhibición. Como se muestra en la Figura 12. Ninguna bacteria pudo retener el crecimiento al 100%. Se estableció que las bacterias que inhibieran de un 20% en adelante el desarrollo del micelio fueran seleccionadas para pruebas posteriores. Por lo que 19 bacterias cumplieron con este requisito.

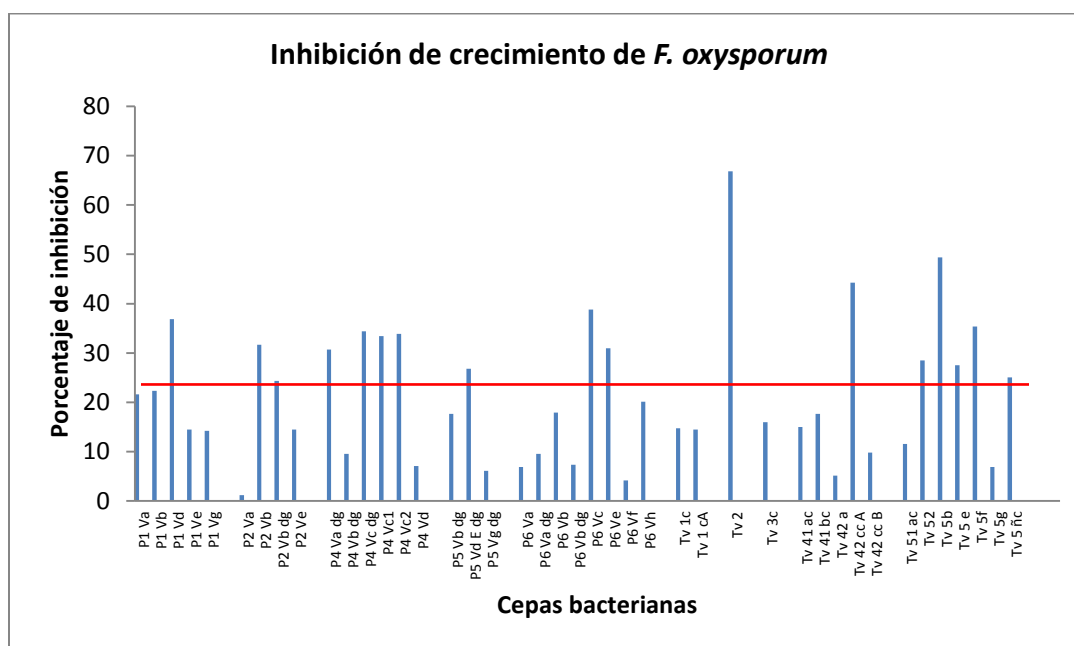


Figura 12. Porcentaje de inhibición causado por exudados bacterianos, con respecto al testigo del crecimiento de micelio de *F. oxysporum*

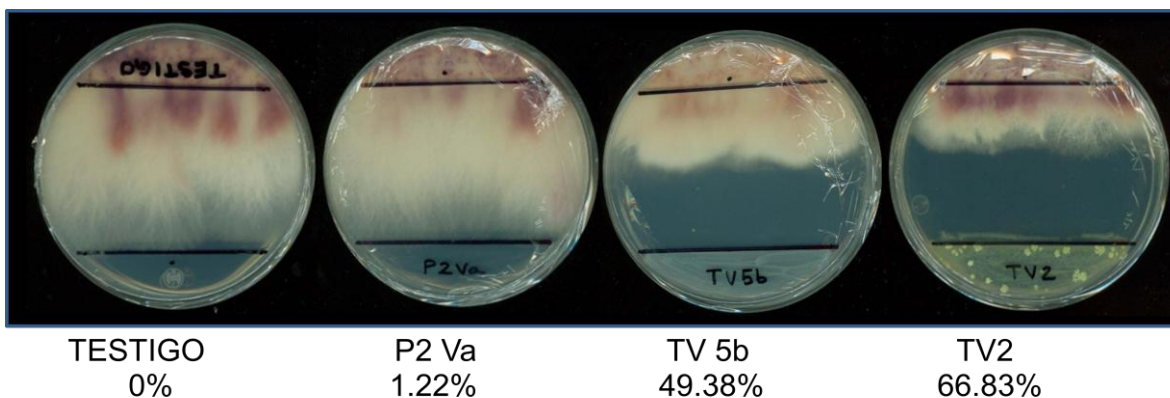


Figura 13. Secuencia comparativa de Inhibición del crecimiento de micelio de *F. oxysporum* causado por cepas bacterianas. El crecimiento del micelio en el testigo, toco la línea inferior, el retado con P2Va creció prácticamente a la par del testigo, mientras que el micelio enfrentado a TV5b cubrió la mitad del área, y con TV2 únicamente la tercera parte.

b. Prueba de antibiosis contra *M. fijiensis*

Con el desarrollo de esta prueba, se busca comprobar que ciertos metabolitos son secretados al medio PDA y se difundan por la delgada capa de agar y provoquen un antagonismo.

En la figura 14 se muestra que de las 42 cepas probadas, 26 mostraron un efecto superior al 80% de inhibición del crecimiento de *M. fijiensis*. Se observó que 8 cepas logran inhibir totalmente el desarrollo del hongo: P1Vb, P1Vd, P4Vcdg, P6Vc, TV1c, TV2, Tv42ccB, y Tv5b. De este grupo de bacterias, 4 fueron obtenidas de la hoja de banano, y otras 4 se aislaron de muestras de suelo.

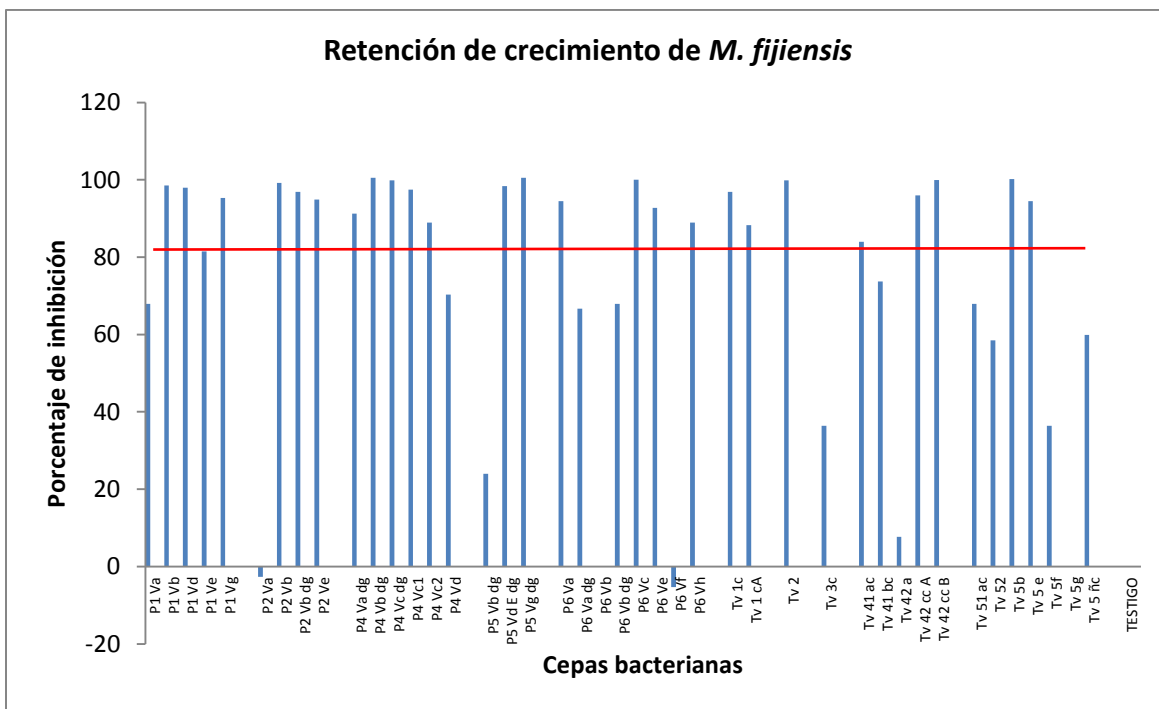


Figura 14. Porcentaje de inhibición causado por exudados bacterianos, con respecto al testigo del crecimiento de micelio de *M. fijiensis*.

En la Figura 15 se muestra un efecto de antibiosis notorio sobre el desarrollo del micelio del hongo causante de la Sigatoka negra utilizado, provocado por la exposición a metabolitos producidos por las bacterias.

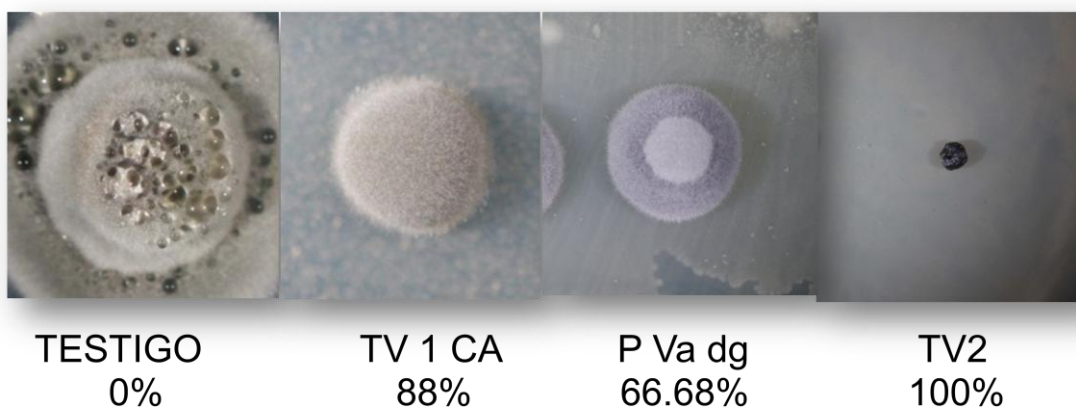


Figura 15. Ejemplos de Inhibición del crecimiento de micelio de *M. fijiensis* causado por cepas bacterianas. En el testigo, es notorio que además del crecimiento del pellet, el micelio se desarrolla sobre la capa de agar, mientras que el efecto de la cepa TV2 impide totalmente el desarrollo del hongo.

Selección de cepas bacterianas con alto potencial antifúngico.

Con la finalidad de concentrar los esfuerzos en las cepas bacterianas que realmente mostraron potencial para ser utilizadas como biofungicidas, se realizaron pruebas de Análisis de Varianza de una vía, estableciendo si existió diferencia significativa entre los testigos y los tratamientos con bacterias en las pruebas de antibiosis directa contra *F. oxysporum*. e inhibición del crecimiento de *M. fijiensis*. Los resultados de los p-value se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Valores de p-value para pruebas de Análisis de Varianza entre testigo y tratamientos de inhibición de crecimiento causado por diferentes cepas de bacterias con actividad de quitinasa. Se considera que existe diferencia significativa cuando los valores p-value son iguales o superiores a 0.0500 (intervalo de confianza del 95%)

CEPA	Inhibición de <i>F. oxysporum</i>		Inhibición de <i>M. fijiensis</i>	
	p-value	Diferencia significativa	p-value	Diferencia significativa
P1 Va	0.0000	SI	0.0000	SI
P1 Vb	0.0000	SI	0.0000	SI
P1 Vd	0.0000	SI	0.0000	SI
P1 Ve	0.0000	SI	0.0001	SI
P1 Vg	0.0000	SI	0.0000	SI
P2 Va **	0.0727	NO	0.0000	SI
P2 Vb	0.0000	SI	0.0000	SI
P2 Vb dg	0.0000	SI	0.0000	SI
P2 Ve	0.0000	SI	0.0000	SI
P4 Va dg	0.0000	SI	0.0000	SI
P4 Vb dg	0.0000	SI	0.0000	SI
P4 Vc dg	0.0000	SI	0.0000	SI
P4 Vc1	0.0000	SI	0.0000	SI
P4 Vc2	0.0000	SI	0.0000	SI
P4 Vd	0.0007	SI	0.0000	SI
P5 Vb dg	0.0000	SI	0.0075	SI
P5 Vd E dg	0.0000	SI	0.0000	SI
P5 Vg dg	0.0002	SI	0.0000	SI
P6 Va	0.0091	SI	0.0000	SI
P6 Va dg	0.0000	SI	0.0001	SI
P6 Vb **	0.0000	SI	0.7850	NO
P6 Vb dg	0.0000	SI	0.0004	SI
P6 Vc	0.0000	SI	0.0000	SI
P6 Ve	0.0000	SI	0.0000	SI
P6 Vf**	0.0072	SI	0.6164	NO
P6 Vh	0.0000	SI	0.0000	SI
Tv 1c	0.0000	SI	0.0000	SI
Tv 1 cA	0.0000	SI	0.0000	SI
Tv 2	0.0000	SI	0.0000	SI
Tv 3c	0.0000	SI	0.0013	SI
Tv 41 ac	0.0000	SI	0.0000	SI
Tv 41 bc	0.0000	SI	0.0000	SI
Tv 42 a	0.0003	SI	0.0000	SI
Tv 42 cc A	0.0000	SI	0.0000	SI
Tv 42 cc B	0.0000	SI	0.0000	SI
Tv 51 ac	0.0000	SI	0.0000	SI
Tv 52	0.0000	SI	0.0001	SI
Tv 5b	0.0000	SI	0.0000	SI
Tv 5 e	0.0000	SI	0.0000	SI
Tv 5f	0.0000	SI	0.0000	SI
Tv 5g	0.0008	SI	0.0008	SI
Tv 5 ñc	0.0000	SI	0.0000	SI

Los datos anteriores muestran que 3 cepas bacterianas no presentaron diferencia significativa entre el testigo y el tratamiento: P2Va para la prueba de antibiosis directa contra *F. oxysporum*, y las cepas P6Vb y P6 Vf en la prueba de inhibición del crecimiento de *M. fijiensis*. Las restantes 39 cepas, mostraron un efecto estadísticamente significativo en la inhibición del crecimiento contra ambos hongos. Los cuadros de ANOVA de todas las pruebas efectuadas se encuentran en Apéndice 1 (*F. oxysporum*,) y Apéndice 2 (*M. fijiensis*).

Al realizar el análisis cuantitativo anterior, se evidenció que de las 42 cepas iniciales, se desecharían únicamente 3, por lo que se decidió considerar además aspectos cualitativos. Se construyó una tabla en la que se resumen los resultados de las cuatro pruebas anteriormente descritas, estableciendo como criterios de selección que las cepas hayan sobresalido en al menos 3 de las 4 pruebas, o bien, que habiendo sobresalido en únicamente en 2, sean capaces de producir la retención total del desarrollo del micelio de *M. fijiensis* durante las pruebas de antibiosis. (Tabla 4).

En la tabla 4, se observa que 20 cepas bacterianas (13 aisladas de hoja y 7 de suelo) fueron capaces de inhibir el crecimiento de *F. oxysporum* y 23 no lo lograron significativamente (12 aisladas de hoja y 11 de suelo). Mientras que 26 cepas fueron efectivas contra *M. fijiensis* (18 aisladas de hoja y 8 de suelo), y únicamente 16 resultaron poco eficaces (8 aisladas de hoja y 8 de suelo). La capacidad de inhibir el crecimiento de un hongo no garantiza que pueda inhibir al otro. Se observa que 4 cepas afectan únicamente el desarrollo de *F. oxysporum* y no el de *M. fijiensis*, mientras que 10 de ellas afectan a *M. fijiensis* y no a *F. oxysporum*. 17 cepas tienen capacidad para inhibir a ambos hongos.

Tabla 4. Resumen de las pruebas realizadas y determinación de las cepas seleccionadas. La marca X significa que superó la prueba, la T significa que retuvo totalmente el desarrollo del micelio.

CEPA	Inhibición de F. oxysporum	Inhibición de M. fijiensis	Crecimiento en Quitina	Crecimiento en Micelio	SELECCIONADA
P1 Va	X				
P1 Vb	X	T			P1 Vb
P1 Vd	X	T			P1 Vd
P1 Ve		X			
P1 Vg		X		X	
P2 Va			X		
P2 Vb	X	X			P2 Vb
P2 Vb dg	X	X	X	X	P2 Vb dg
P2 Ve		X		X	
P4 Va dg	X	X	X	X	P4 Va dg
P4 Vb dg		X		X	
P4 Vc dg	X	T	X	X	P4 Vc dg
P4 Vc1	X	X		X	P4 Vc1
P4 Vc2	X	X			P4 Vc2
P4 Vd					
P5 Vb dg				X	
P5 Vd E dg	X	X		X	P5 Vd E dg
P5 Vg dg		X			
P6 Va		X			
P6 Va dg					
P6 Vb					
P6 Vb dg					
P6 Vc	X	T			P6 Vc
P6 Ve	X	X			P6 Ve
P6 Vf					
P6 Vh	X	X			P6 Vh
Tv 1c		T			
Tv 1 cA		X			
Tv 2	X	T			Tv 2
Tv 3c			X	X	
Tv 41 ac		X			
Tv 41 bc					
Tv 42 a					
Tv 42 cc A	X	X			Tv 42 cc A
Tv 42 cc B		T			
Tv 51 ac					
Tv 52	X		X	X	Tv 52
Tv 5b	X	T			Tv 5b
Tv 5 e	X	X	X	X	Tv 5 e
Tv 5f	X		X	X	Tv 5f
Tv 5g					
Tv 5 ñc	X				

En la misma tabla 4, se observa que 19 cepas no desarrollan ampliamente sobre medio de agar-quitina o sobre agar-micelio de hongo, y sin embargo son capaces de producir un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de alguno de los dos hongos probados. Esto nos señala que el gran desarrollo de algunas colonias puede ser debido a fenómenos de motilidad celular, más que a una incapacidad de alimentarse de los nutrientes existentes en estos medios.

Por lo anterior, se dio prioridad al efecto antifúngico sobre el desarrollo de las colonias con la finalidad de seleccionar las bacterias con las que se continuó el trabajo.

Como se aprecia en la Tabla 4, de las 42 cepas bacterianas originales, se continuó el trabajo con las 19 más prometedoras bajo los criterios establecidos

4. Establecer afinidad al hospedero mediante cultivos a base de extractos de hoja de banano.

Hasta esta parte de este trabajo, se ha demostrado que existen bacterias nativas en la rizosfera y en la hoja del banano, capaces de producir quitinasas, alimentarse de micelio de *M. fijiensis* y de inhibir o retener el crecimiento de hifas de hongos fitopatógenos. Sin embargo, resulta indispensable conocer si las bacterias seleccionadas son capaces de ser reintroducidas en el ambiente, sin que la propia planta limite su desarrollo.

Para cubrir este objetivo, las 18 cepas bacterianas seleccionadas se cultivaron por 48 hrs de forma simultánea en tres medios de cultivo a) agar caseína de soya (CASOY), b) agar-extracto de hoja (AEH) y c) Agar CASOY-extracto de hoja (ACEH). El medio a) CASOY, es un medio no selectivo que reúne todos los nutrientes necesarios para el cultivo de la mayoría de las bacterias de vida libre, por lo que funcionó como testigo. Se esperó que en éste medio se presentaran los máximos desarrollos de colonias. El medio b) AEH, permitió establecer si las cepas seleccionadas pueden sobrevivir en la hoja, tomando eventualmente nutrientes a partir de ella. Se esperaba un crecimiento menor en comparación con el medio a). El medio c) ACEH, nos permitió conocer si la el extracto de hoja contiene algún metabolito que pudiera afectar negativamente el desarrollo de las colonias, de tal forma que si el desarrollo de las colonias resultaba menor al de

medio CASOY puro, podríamos suponer un efecto inhibitorio debido a moléculas obtenidas del extracto de hoja. Los resultados se presentan en la figura 16.

Es notorio que el desarrollo de las colonias no sigue el comportamiento esperado en el cuál el máximo desarrollo se presentara en medio CASOY y el menor en medio AEH. Se pueden agrupar en 4 categorías, de acuerdo al crecimiento observado al comparar los resultados de crecimiento en los tres medios formulados.

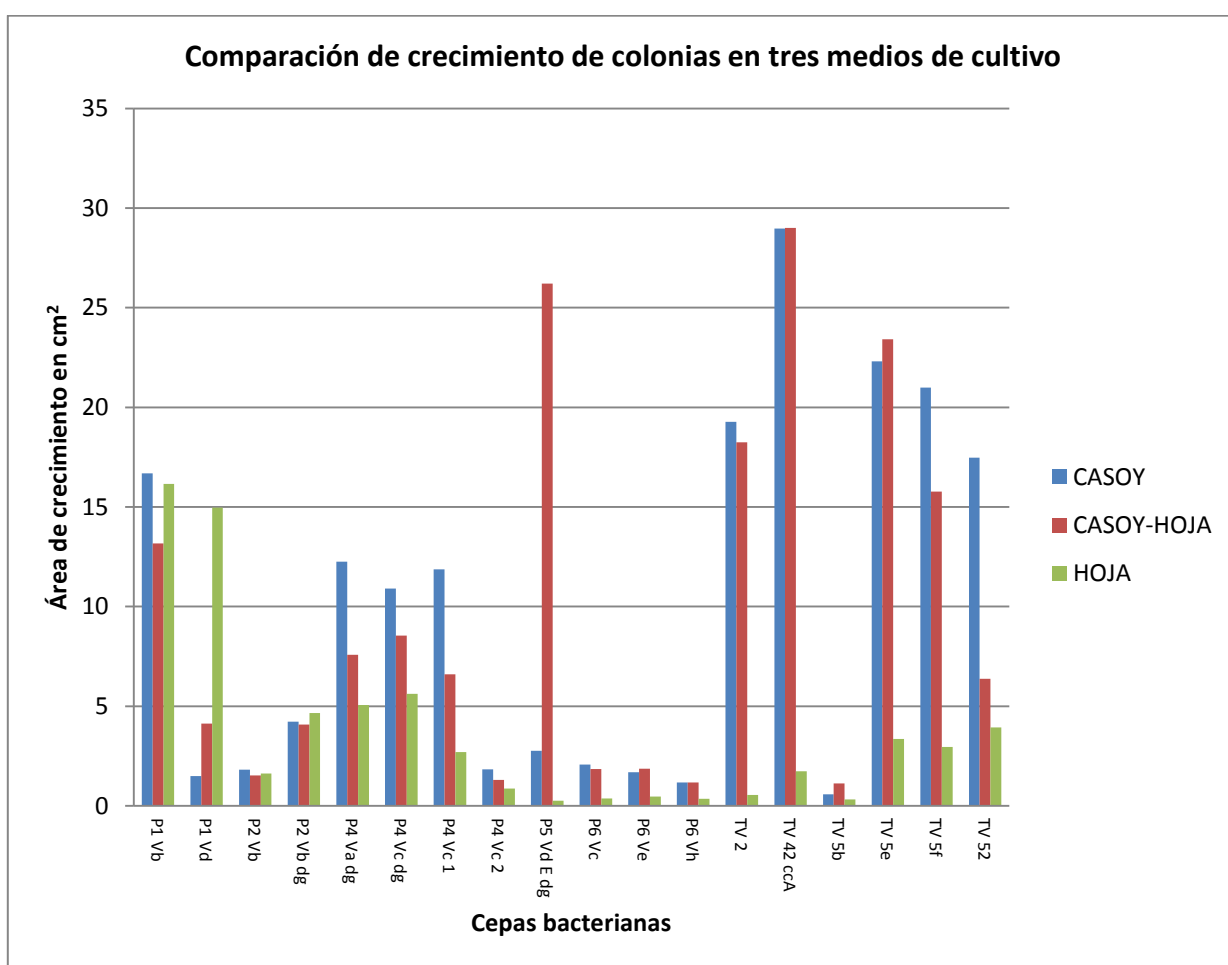


Figura 16. Resultados de desarrollo de colonias (en cm²) en tres medios de cultivo después de un periodo de 48 hrs de incubación.

Grupo 1. Crecimiento no influido por el tipo de medio.

Engloba a 3 cepas, (P1Vb, P2Vb, y P2Vb^{dg}) que no ofrecen una diferencia significativa en su capacidad de desarrollo independientemente del medio de cultivo en el que son sembradas. Crecen de la misma forma en CASOY, en agar-extracto de hoja o en agar-CASOY-extracto de hoja. Por lo cual consideramos que para estas 3 cepas, el extracto de hoja de banano puede ser utilizado como alimento, sin que cause un efecto adverso o perjudicial para su desarrollo. Como se muestran en la Figura 17.

Grupo 2. Crecimiento inhibido por Extracto de Hoja.

En esta grupo se ubican 12 de las 18 cepas estudiadas, y parece ser que es la mayor tendencia de comportamiento. En éstos casos, el mayor desarrollo se presenta en el medio CASOY que es el medio ideal, y el menor sucede en el medio Agar-Extracto de Hoja. Sin embargo, al añadir extracto de hoja a la formulación de CASOY, el tamaño de las colonias resulta sensiblemente menor, posiblemente como consecuencia de compuestos presentes en la hoja que produzcan un efecto inhibitorio. Las cepas con este comportamiento son: P4Va^{dg}, P4Vc^{dg}, P4Vc1, P4Vc2, P6Vc, P6Ve, P6Vh, TV2, TV42ccA, TV5e, TV5f, y TV52. Ejemplo de lo anterior se muestran en la Figura 18.

Grupo 3. Crecimiento potenciado por Extracto de Hoja.

Esta respuesta es mostrada únicamente por la cepa (P1Vd), se observa un desarrollo pobre en CASOY (1.5 cm^2), medianamente en la mezcla de CASOY-Extracto de hoja (4.13 cm^2), y adquiere su mayor desarrollo en el medio preparado exclusivamente con Extracto de Hoja como nutriente (14.96 cm^2). El efecto observado, puede explicarse con el comportamiento de algunas bacterias, que bajo condiciones de estrés por nutrientes, pueden desarrollar motilidad buscando reubicarse en sitios más favorables para su sobrevivencia. Este caso es ilustrado en la Figura 19.

Grupo 4. Crecimiento Sinérgico extracto de hoja-CASOY.

Este grupo comprende solo 2 de las 19 cepas probadas. En ambos casos, las bacterias se desarrollan muy poco al ser cultivadas en CASOY (2.76 cm^2) o en extracto de hoja (0.26 cm^2) cuando se utilizan separados. Pero el desarrollo aumenta hasta (26.21 cm^2) al ser sembradas en la mezcla de ambos. Las cepas que muestran esta respuesta son P5VdE^{dg} y TV5b. Figura 20.

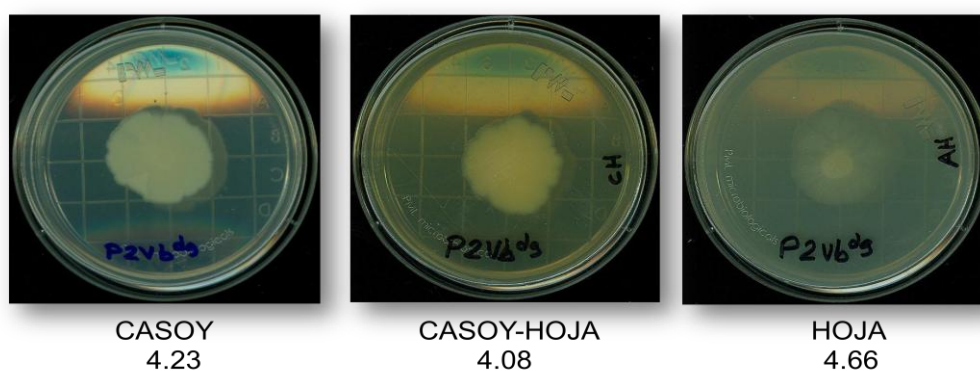


Figura 17. Se muestra la cepa P2Vb^{dg}, la cual mantiene un crecimiento similar en los tres medios de cultivo utilizados. Los valores son en cm^2 .

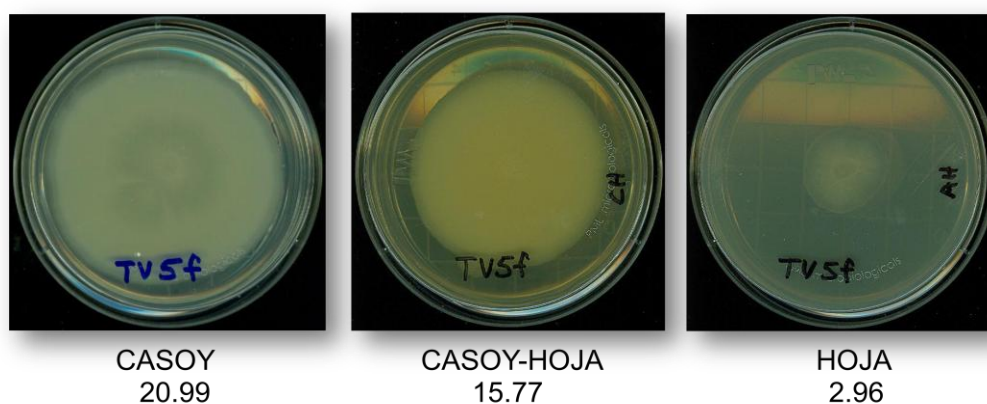


Figura 18. Cepa TV5f como ejemplo de crecimiento inhibido por el extracto de hoja. Es notorio el máximo desarrollo en CASOY con 20.99 cm^2 , el cuál se reduce a 15.77 cm^2 al mezclas ambos medios, llegando a su mínimo crecimiento (2.96 cm^2) en medio agar-extracto de hoja.

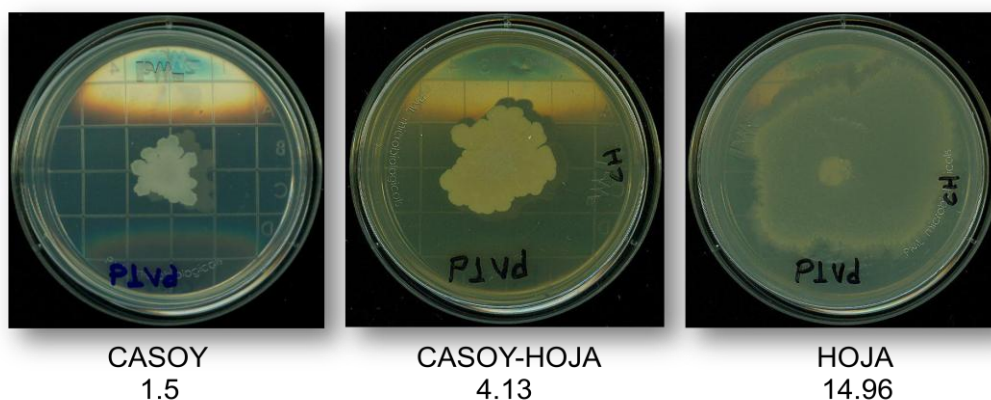


Figura 19. Cepa P1Va la cual muestra un comportamiento único, al mantener una menor área de colonia en CASOY, incrementándola en CASOY-hoja, y obteniendo su máximo valor en agar-hoja. Se observa que en éste último medio, los bordes de la colonia son sumamente irregulares. Los números representan cm^2 de cobertura de la colonia.

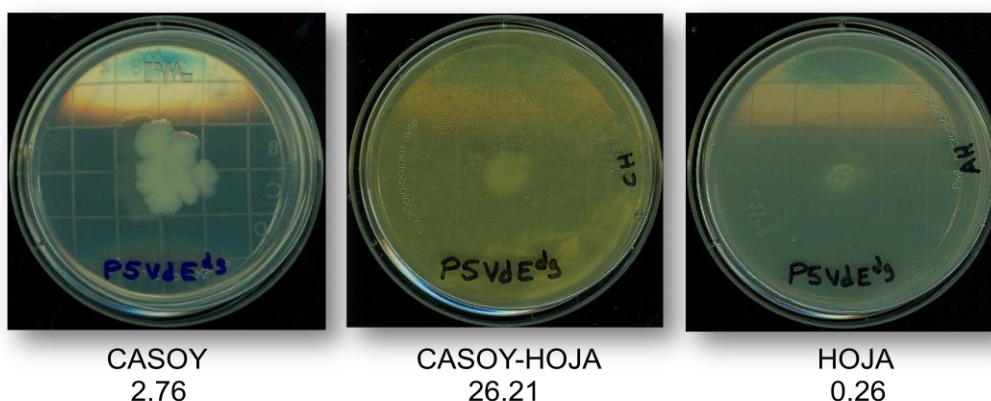


Figura 20. Cepa P5VdEdg, la cuál presenta su mínimo crecimiento en agar-hoja, y su máximo crecimiento en la mezcla de ambos medios. Este efecto sugiere un efecto sinérgico.

5. Caracterización microscópica y realización de pruebas Bioquímicas de las bacterias seleccionadas.

Análisis microscópico y respuesta de tinción de Gram

Se realizaron frotis de las colonias bacterianas purificadas y seleccionadas por su alto potencial antifúngico para la observación en el microscopio, determinando así su reacción positiva o negativa en la tinción Gram. Este análisis también sirvió para distinguir el grado de pureza del cultivo. Los resultados obtenidos se

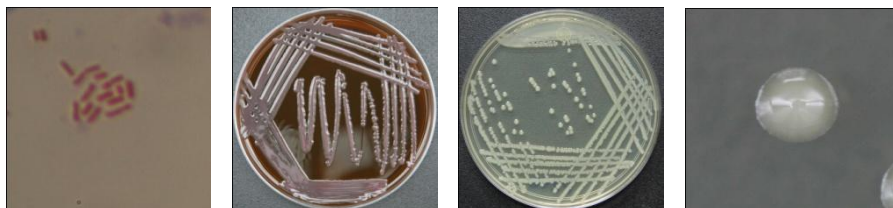
presentan en la Tabla 4. En resumen podemos decir que de acuerdo a la morfología microscópica hubo 5 cocobacilos (todos Gram -), 2 Bacilos pequeños (inferiores a 1 μm de longitud, ambos Gram -), 4 Bacilos medianos (entre 1 y 2 μm de longitud, 1 Gram – y 3 Gram +), y 7 Bacilos grandes (superiores a 2 μm , y todos Gram +).

Tabla 4. Características morfológicas y reacción al Gram de las bacterias con alto potencial antifúngico.

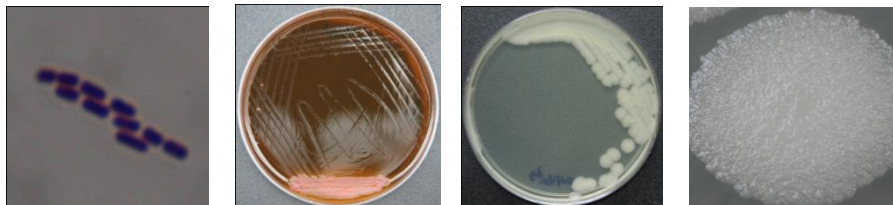
CEPA	Forma Bacteriana	Tinción de Gram
P1 Vb	Bacilo pequeño	Gram negativo (-)
P1 Vd	Bacilo mediano	Gram negativo (-)
P2 Vb	Bacilo pequeño	Gram negativo (-)
P2 Vb dg	Bacilo mediano	Gram positivo (+)
P4 Va dg	Bacilo mediano	Gram positivo (+)
P4 Vc dg	Bacilo grande	Gram positivo (+)
P4 Vc1	Bacilo grande	Gram positivo (+)
P4 Vc2	Cocobacilo	Gram negativo (-)
P5 Vd E dg	Cocobacilo	Gram negativo (-)
P6 Vc	Cocobacilo	Gram negativo (-)
P6 Ve	Cocobacilo	Gram negativo (-)
P6 Vh	Bacilo grande	Gram positivo (+)
Tv 2	Cocobacilo	Gram negativo (-)
Tv 42 cc A	Bacilo grande	Gram positivo (+)
Tv 52	Bacilo grande	Gram positivo (+)
Tv 5b	Bacilo mediano	Gram positivo (+)
Tv 5 e	Bacilo grande	Gram positivo (+)
Tv 5f	Bacilo grande	Gram positivo (+)

Se presentan microfotografías de algunas las bacterias seleccionadas a 100x, colonias en medio CASO, colonias en medio Eosina-Agar (EMB) y macrofotografía de las colonias aisladas después de 24 hrs de incubación. Algunos ejemplos se muestran en la figura 21.

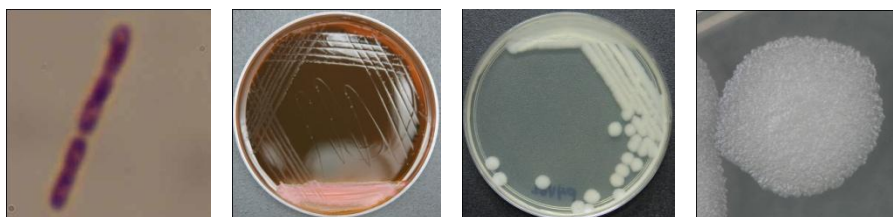
P2Vb Bacilo pequeño Gram –



P4 Va Dg Bacilo Mediano Gram +



P4 Vc 1 Bacilo Grande Gram +



P6 Vc Cocobacilo Gram –



TV 2 Cocobacilo Gram -



A

B

C

D

Figura 21. Diferentes aspectos macro y microscópicos de las cepas seleccionadas.

A. Microfotografía a 100x. **B.** Crecimiento en medio Agar-Eosina Azul de Metileno (EMB).
C. Crecimiento en medio Agar-Caseína de Soya (CASOY). **D.** Macrofotografía de una colonia aislada.

Pruebas Bioquímicas

Se realizaron pruebas bioquímicas a **las cepas bacterianas seleccionadas**, con la finalidad de tener un acercamiento a su identificación, obteniéndose los resultados mostrados en la Tabla 6.

Tabla 6. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas seleccionadas, permitiendo corroborar la identificación.

CEPA	Forma	Tinción de Gram	Agar Eosina-Azul de Metileno	Manitol	Fructuosa	Dextrosa	Sacarosa	Xilosa	Galactosa	Sorbitol	Lactosa	Agar de hierro de Kliger	Agar Citrato de Simmons	Agar Hierri-Lysina (LIA)	Medio SIM	Medio MIO	Gelatina nutritiva	Caldo Urea
P1 Vb	Bac Med	-	Si	-	-	-	-	deb +	deb +	deb +	-	Pico Alc Fondo Alc	deb +	-	M + S - I -	+	Sol	-
P1 Vd	Bac Med	-	Si	deb +	+	+	+	+	-	-	-	Pico Alc Fondo Alc	-	deb +	M + S - I -	+	Liq	-
P2 Vb	Bac Med	-	Si	+	+	-	+	+	+	+	-	Pico Alc Fondo Alc	deb +	+	M + S - I -	+	Sol	-
P2 Vb dg	Bac Gde	+	No	deb +	+	+	deb +	deb +	deb +	deb +	-	Pico Alc Fondo Alc	-	-	M + S - I -	-	Liq	-
P4 Va dg	Bac Gde	+	No	-	+	+	+	-	-	-	-	Pico Alc Fondo Alc	-	-	M + S - I -	-	Liq	+
P4 Vc dg	Bac Gde	+	No	-	+	+	+	-	-	-	-	Pico Alc Fondo Alc	-	-	M + S - I -	-	Sol	-
P4 Vc 1	Bac Gde	+	No	-	+	+	+	-	-	-	-	Pico Alc Fondo Alc	-	-	M + S - I -	-	Sol	-
P4 Vc 2	Bac Peq	-	Si	+	+	+	+	+	+	-	deb +	Pico Alc Fondo Alc	-	Gas -	M - S - I -	+	Sol	-
P5 Vd E dg	Coco	-	Si	+	+	+	+	+	+	+	-	Pico Alc Fondo Alc	+	-	M - S - I -	+	Sol	-
P6 Vc	Bac Peq	-	Deg	+	+	+	deb +	+	+	+	+	Gas Gluc y Lact	-	+	M - S - I + -	-	Sol	-
P6 Ve	Bac Peq	-	Si	+	+	+	+	+	+	+	-	Pico Alc Fondo Alc	-	Gas -	M + S - I -	-	Sol	-
P6 Vh	Bac Gde	+	No	-	-	-	-	-	-	-	-	Gas Gluc y - a Lact	-	+	M + S - I -	+	Sol	-
TV 2	Bac Peq	-	Si	-	-	+	-	-	deb +	deb +	-	Pico Alc Fondo Alc	-	+	M + S - I -	+	Liq	-
TV 42 ccA	Bac Gde	+	No	-	-	-	deb +	-	-	-	-	Pico Alc Fondo Alc	-	+	M + S - I -	+	Sol	-
TV 5b	Coco	+	No	+	+	+	+	+	+	-	+	Pico Alc Fondo Alc	-	-	M + S - I -	-	Sol	-
TV 5e	Bac Gde	+	No	-	+	+	+	-	-	-	-	Pico Alc Fondo Alc	-	-	M + S - I -	-	Sol	-
TV 5f	Bac Med	+	No	-	+	+	+	-	-	-	-	Pico Alc Fondo Alc	-	-	M + S - I -	-	Sol	-
TV 52	Bac Gde	+	No	deb +	+	+	-	-	deb +	+	+	Pico Alc Fondo Alc	-	-	M + S - I -	-	Sol	-

6. Identificación de las especies mediante análisis de RNA 16s.

La comparación entre las secuencias amplificadas del ADNr 16S con las depositadas en las bases de datos GenBank y NCBI (National Center for Biotechnology Information), arroja las identificaciones mostradas en la Tabla 7.

Tabla 7. Tabla de identificación de especies de bacterias mediante análisis de ARNr 16s.

*ND fueron organismos que no desarrollaron y por lo tanto no fue posible su identificación.

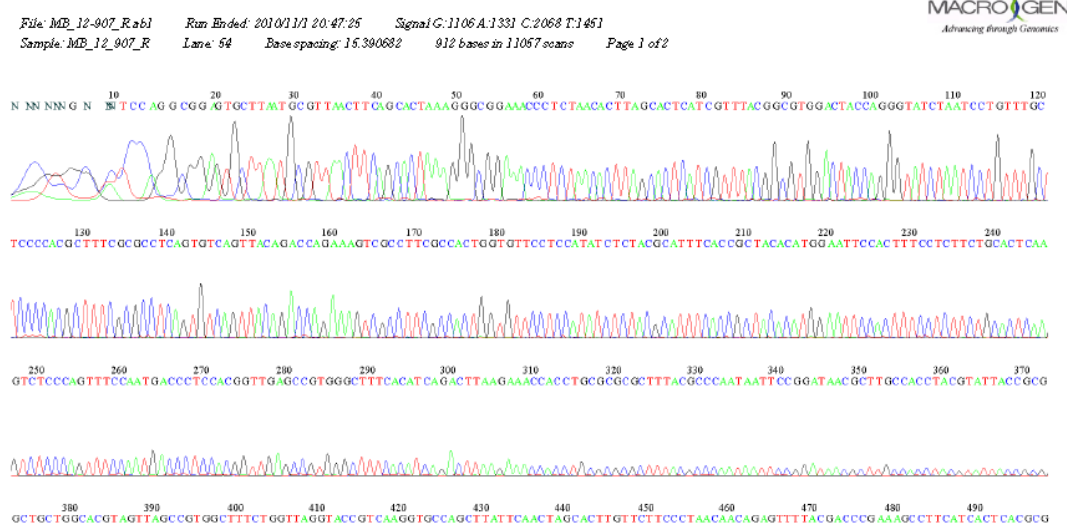
*Actualmente existe controversia con la ubicación taxonómica de éstas especies, considerándose una sinonimia entre los géneros *Bacillus* y *Lysinobacillus* en las especies señaladas.

CEPA	Género y especie
P1 Vb	<i>Bacillus sp.</i>
P1 Vd	<i>Bacillus subtilis</i>
P2 Vb	<i>Bacillus cereus</i>
P2 Vb dg	<i>Bacillus megaterium</i>
P4 Va dg	<i>Bacillus cereus</i>
P4 Vc dg	* ND
P4 Vc1	<i>Bacillus cereus</i>
P4 Vc2	* ND
P5 Vd E dg	<i>Enterobacter cloacae</i>
P6 Vc	<i>Escherichia coli</i>
P6 Ve	<i>Enterobacter sp.</i>
P6 Vh	<i>Bacillus/Lysinobacillus fusiformis</i>
Tv 2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Tv 42 cc A	<i>Bacillus/Lysinobacillus sphaericus</i>
Tv 52	<i>Bacillus cereus</i>
Tv 5b	<i>Enterococcus/Bacillus faecalis</i>
Tv 5 e	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Tv 5f	<i>Bacillus cereus</i>

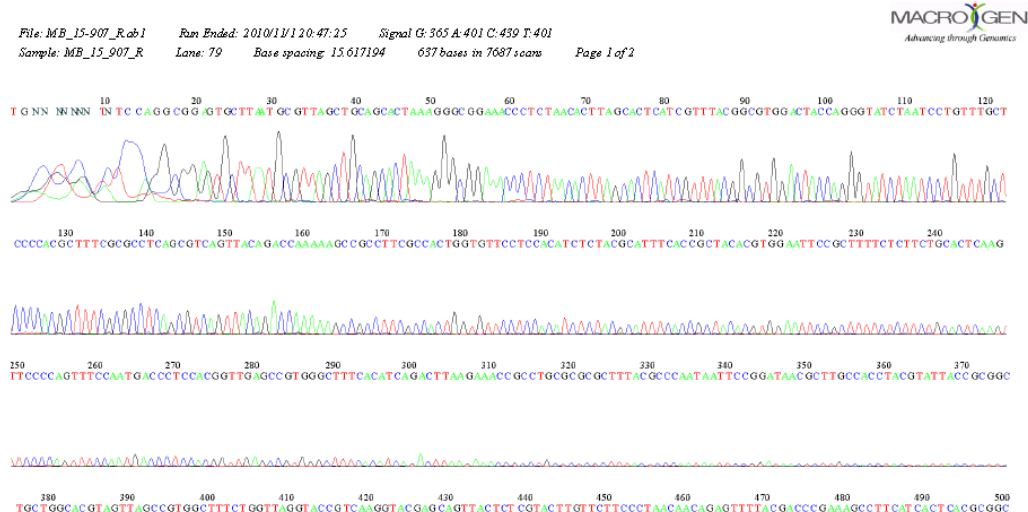
El análisis de ARNr 16s, muestra 10 cepas constituídas por el género *Bacillus*, con las especies *B. cereus* (5), *B. subtilis* (1), *B. megaterium* (1), *B. thuringiensis* (1), *B. faecalis* (1) y una cepa más que no se logró su identificación a especie,

reportándose como *Bacillus* sp. Se determinaron 2 cepas constituídas por organismos pertenecientes a *Bacillus/Lysinobacillus fusiformis* y *Bacillus/Lysinobacillus sphaericus*. Se aislaron dos especies del género *Enterobacter*, uno de la especie *E. cloacae* y el segundo no fue posible llegar a su identificación específica, manteniéndose como *Enterobacter* sp. Se identifico una cepa de *Escherichia coli*, y otra de *Enterobacter cloacae*. Las cepas P4Vc^{dg} y P4Vc2, no fue posible identificarlas.

P4Vc1 *Bacillus cereus*



P2Vb^{dg} *Bacillus megaterius*



P6Vc *Escherichia coli*

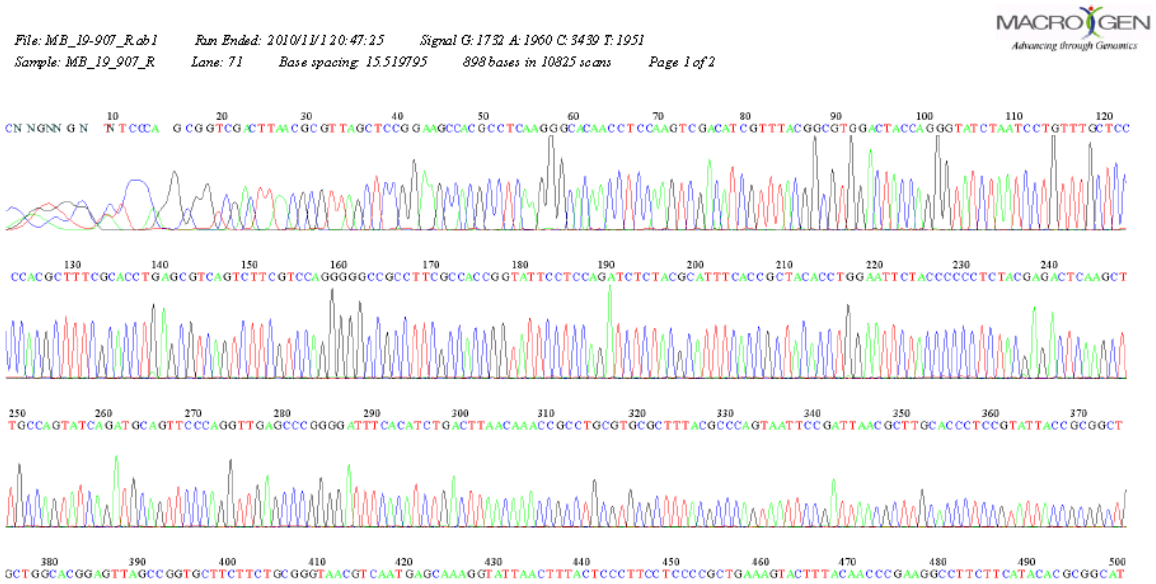


Figura 22. Secuencias de ADN de genes de ARNr 16s de región +10 a región +500 de tres cepas bacterianas.

Discusión

De acuerdo a los resultados obtenidos es notorio que la población bacteriana en hojas es menor a la del suelo, ya que se encontraron 156 bacterias en la hoja y 231 aisladas del suelo, resultando una diferencia del 32%. Esto puede ser debido a que las bacterias en el filoplano del banano están expuestas a condiciones medioambientales más agresivas que las que se presentan en el suelo, tales como humedad, nutrientes y sobre todo, la exposición a la radiación UV. Esto adquiere relevancia en el sentido de que las cepas aisladas de este sitio, han sido capaces de sobrevivir y establecerse en éste microambiente. Lo anterior, nos permite inferir que no presentarán problemas al regresarlas al ambiente del cual se aislaron, y en el cuál evolucionaron, a diferencia de algunos otros biofungicidas previamente desarrollados en los cuales se realizaron intentos con bacterias exóticas, lo que condujo a una incapacidad de éstas para establecerse en un ambiente poco favorable.

La totalidad de las bacterias aisladas, fueron cultivadas en medio de quitina coloidal obtenida por hidrólisis ácida de quitina de cangrejo. Éste procedimiento, nos permitió seleccionar las que desarrollaron utilizando la quitina como única fuente de carbono, debido a su capacidad de secretar quitinasas. Esta capacidad, permite considerar que las bacterias con actividad quitinolítica, tienen una elevada probabilidad de tener un efecto antifúngico, ya que pueden debilitar la pared celular fúngica o inhibir la síntesis de la nueva pared celular, que ocurre en la parte apical de las hifas ya que este es un punto de síntesis y degradación, siendo este el principal sitio de crecimiento (Goody, 1992). La selección con esta prueba redujo la cantidad de aislados a 43 de hoja y 24 de tierra.

Se observaron intensos halos de degradación de quitina (figura 6) producidos por las cepas bacterianas aisladas de la rizosfera del banano y en menor proporción que los producidos por las aisladas de la hoja. Existen numerosos reportes sobre microorganismos aislados de suelo que tienen la capacidad de tomar la quitina como fuente de carbono, principalmente bacterias del género *Streptomyces* (Itho

et al, 2002; Taechowisan et al, 2005; Hoster F. et al, 2004) y *Serratia* (Kishore et al., Sørbotten et al., 2005). En este trabajo se obtuvieron bacterias quitinolíticas del suelo adyacente a la raíz del banano como *Pseudomona aeruginosa*. La presencia de bacterias del genero *Pseudomonas* ha sido reportado previamente por algunos grupos de investigación de la India, ellos han demostrado que *P. aeruginosa* es una bacteria de la rizosfera del banano que tiene un impacto sobre la producción de fitohormonas, la solubilización de sales de fosfato, así como una actividad antifungica hacia algunos hongos fitopatgenos además de la producción de 2,4 diacetilfloroglucinol un antibiótico que tiene efecto sobre algunos patógenos de banano como el *F. oxysporum cubense* y *Cylindrocadium scoparium* (Ayyadurai, 2006). Recientemente a través de un análisis genético del ARN 16s encontraron que la rizosfera de banano es rica en bacterias clasificadas como pseudomonadas fluorescentes entre estas se identifico *P. monteilii*, *P. plecoglossicida*, *P. fluorescens*, *P. fulva*, *P. mosselii*, *P. aeruginosa*, *P. alcaligenes*, and *P. pseudoalcaligenes*, donde *P. monteilii* es considerada la especie dominante (Naik, et al. 2008).

Es muy notorio, que más del 50% de las bacterias seleccionadas como potenciales agentes antifúngicos, pertenezcan al género *Bacillus*. Este hecho, contrasta con los resultados obtenidos por Martínez-Molina (2009) que al estudiar paralelamente a este trabajo, los predios Colomos y Valle Nuevo logra una selección de 12 cepas con potencial antifúngico, pertenecientes a *Enterobacter cloacae* (3 cepas), *Leuconostoc mesenteroides* (2 cepas), *Bacillus cereus* (2 cepas), *Pseudomona luteola* (2 cepas), *Raoultella terrigena* (2 cepas), *Bacillus thuringensis* (1 cepa), *Aerococcus viridans* (1 cepa), *Lactobacillus pentosus* (1 cepa), y *Pseudomona aeruginosa* (1 cepa). Martínez Molina (2009) reporta 15 especies en 12 cepas, ya que condujo todo su experimento manejando como una sola cepa a un ensamble de 2 y 3 cepas respectivamente, logrando de manera circunstancial el primer experimento de inhibición de crecimiento de hongos fitopatógenos, combatidos con mezclas de bacterias. Desafortunadamente, las

especies que fueron estudiadas como mezclas, no fueron encontradas en el presente trabajo.

El cultivo de bacterias en agar-fragmentos de micelio de hongo, es reportada por primera vez. Hasta la fecha, no se ha encontrado en la literatura algún experimento similar. Es significativo para nosotros que las 42 cepas cultivadas, todas fueron capaces de desarrollarse. Sin embargo, observamos que 24 tuvieron un mejor desarrollo en éste medio, y 17 se desarrollaron mejor en el medio agar-quitina coloidal. Esto se explica considerando que el micelio seco de hongo, contiene varios tipos de moléculas que pueden ser utilizadas como fuentes de carbono, tales como carbohidratos diversos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Gracias a esto, podemos considerar que en la biomasa del hongo muerto, no existen moléculas que interfieran con el desarrollo de las bacterias, generando algún tipo de inhibición y además es probable que los componentes del micelio tomados como fuente de nutrientes, induzcan a la secreción de metabolitos distintos o en mayor proporción que en otro medio de cultivo. Esto resulta esencial al desarrollar un biofunguicida, que permita la expresión de la maquinaria bioquímica necesaria para lograr combatir eficientemente al hongo que nos ocupa.

La antibiosis directa se realizó utilizando micelio del hongo *F. oxysporum*. Éste organismo tiene una mayor capacidad de desarrollo comparado con *M. fijiensis*. Los resultados de esta prueba muestran que varias de las cepas aisladas, logran retener el crecimiento en porcentajes que alcanzaron el 66.8% de retención con respecto al testigo. *F. oxysporum* que es un patógeno que se encuentra normalmente en el suelo, es interesante establecer una relación antagónica entre microorganismos patógenos y benéficos en el suelo.

El método del sándwich empleado para enfrentar a las bacterias contra *M. fijiensis*, es sin duda una de las aportaciones más recientes del laboratorio de Sigatoka negra y Estrés oxidativo en donde se desarrolló este proyecto. La relevancia radica en que las bacterias y el micelio, nunca entran en un contacto directo, por lo

que los efectos inhibitorios obedecen a una difusión a través del agar de las sustancias útiles como moléculas antifúngicas. Nuestra hipótesis con respecto a las pruebas de antibiosis, partieron originalmente de la idea establecida en los trabajos de Chernin *et al.*, 1995; Dunn *et al.* 1997; Jijakli y Lepoivre 1998; Budi *et al.* 2000; que mencionan la capacidad de secretar quitinasas es directamente proporcional al efecto antifúngico. Sin embargo, en este trabajo se demuestra que varias de nuestras cepas que presentan la capacidad de desarrollar en quitina coloidal, mantienen una actividad inferior al 30% de inhibición (P5 Vb^{dg} y TV 3c) llegando a casos extremos como la cepa P2Va que no logró retener el crecimiento del hongo con respecto al testigo. Por otro lado, tenemos cepas como TV2 capaces de retener el crecimiento tanto de *F. oxysporum* como de *M. fijiensis*, y sin embargo tener una limitada capacidad de desarrollo en la quitina coloidal e incluso en el micelio del hongo. Esto nos sugiere que la capacidad de degradar la quitina, no es la única condición de selección para obtener una actividad antifúngica, y que las bacterias que exhiben una mayor capacidad de retener el crecimiento del hongo, pueden producir moléculas antifúngicas sin la necesidad quizás de producir quitinasas para ejercer el efecto inhibitorio. Se conocen ya una serie de moléculas producto de bacterias que ejercen la actividad inhibitoria sobresaliendo las iturinas y algunos lipopéptidos. Venegas-Gonzalez, (2006) y Heins-Sherry y colaboradores (2007) establecieron que las iturinas (octapéptido con 7 α -aminoácidos y un β -aminoácido) son capaces de interaccionar con los lípidos de membrana celular del hongo formando poros conductores de iones que facilitan la penetración del K⁺, y de manera simultánea, permeabilizan la membrana permitiendo la salida de compuestos vitales para el hongo, lo que conduce a la muerte celular. Las iturinas son una amplia variedad de compuestos, sobresaliendo Iturina A, Iturina C, Bacilomicina D, L y F, Micosubtilina, Plisastinas y Surfactinas.

La prueba de antibiosis directa con *M. fijiensis* fue derivada de la modificación del método usado por Mendoza-Ceja, (2008). Con el desarrollo de esta prueba se obtuvieron resultados muy notorios sobre la inhibición del crecimiento del pellet del

hongo. En el caso de las cepas P1Vb, P1Vd, P4Vc^{dg}, P6Vc, TV1c, TV2, TV42ccB y TV5b se observó una disminución del tamaño del micelio, lo que sugiere que la bacteria provocó la muerte celular del hongo (Fig.15).

Otro hallazgo importante, consistió en hacer evidente que de las 42 cepas enfrentadas tanto a *M. fijiensis* como a *F. oxysporum*, 30 exhibieron un efecto inhibitorio y 12 no lo tuvieron. 8 cepas de éstas últimas, tampoco desarrollaron en los medios de quitina ni de micelio de hongo. Sin embargo, 3 de ellas lograron desarrollar ampliamente en al menos un medio (1 en quitina, 1 en hongo y 1 en ambos). De las 30 cepas que fueron capaces de inhibir el desarrollo del hongo, 16 de ellas lo hicieron para ambos hongos, 10 inhibieron a *M. fijiensis* y no a *F. oxysporum*, mientras que únicamente 4 lograron el efecto contrario, esto es: inhibieron a *F. oxysporum* pero no tuvieron efecto sobre *M. fijiensis*. Lo anterior, nos permite considerar, que es probable que la relación antagónica hongo-bacteria se comporta de forma específica para cada especie, y por lo tanto, un biofungicida deberá ser diseñado para combatir un tipo de hongo fitopatógeno en especial, no debiendo considerarlo de amplio espectro, a menos que se desarrollen pruebas que así lo demuestren. Este fue el principal problema del Biofungicida SERENADETM. Esto se observa en la Tabla 3.

Se utilizó un medio de cultivo desarrollado a base de extractos de hoja de banano y agar. Contrastándolo con el agar nutritivo (CASO) y con una mezcla de ambos. Esta técnica permitió visualizar la existencia de algún efecto de los componentes químicos de la hoja, y el desarrollo de las bacterias. Se esperaba que el mayor desarrollo se presentara en el medio de cultivo comercial (CASO) ya que es el estándar reconocido y está formulado para permitir el crecimiento de cualquier tipo bacteriano, sin tener un comportamiento selectivo. Los resultados muestran 4 tendencias distintas: A) Crecimiento similar en todos los medios (3 cepas); lo que permite hipotetizar que esas cepas bacterianas, pueden digerir y aprovechar para la construcción de biomasa cualquier medio, sin que exista ningún efecto inhibitorio ni de incremento con respecto al testigo. B) Crecimiento mayor en

CASO (12 cepas), En este caso, consideramos que algunos de los componentes químicos de la hoja producen un efecto inhibitorio que retrasa el desarrollo y reproducción de las células bacterianas. Estos compuestos químicos pueden incluso ser la respuesta molecular de la hoja al tratamiento de molienda, secretando productos antibióticos para su defensa (Ogura-Fujii, T. com. pers.).

C) Crecimiento mayor en extracto de hoja (1 cepa). Esta tendencia se observó en una sola cepa que se desarrolló en mayor superficie en extracto de hoja que en medio comercial CASO. Debemos ser cuidadosos, ya que puede ser una bacteria capaz de producir infecciones bacterianas en el banano, sin embargo, pueden garantizar un mayor porcentaje de colonización y retención de patógenos en la superficie de la hoja. Por otro lado, el efecto observado, puede explicarse con el comportamiento de algunas bacterias, que bajo condiciones de estrés por nutrientes, pueden desarrollar motilidad buscando reubicarse en sitios más favorables para su sobrevivencia. De acuerdo a nuestros resultados del grupo de investigación hemos considerado que algunas de estas bacterias podrán ser consideradas como endófitas facultativas.

D) Crecimiento mayor en la mezcla de medios (2 cepas). Se explica considerando que si bien el medio CASO es un medio general, es posible enriquecerlo con algún compuesto químico existente en la hoja, y para el cual la cepa bacteriana pudiera tener alguna deficiencia metabólica, de forma tal que se potencializa su capacidad de desarrollo al suplementarse los nutrientes obtenidos de ambas fuentes.

Los microorganismos tienen una gran plasticidad de comportamientos, y una misma especie puede comportarse como endófito benéfico para las plantas (mutualismo), como saprófito y obtener recursos nutricionales del tejido vegetal cuando éste no ejerce algún control sobre la microbiota (comensalismo) y por último, como patógenos cuando el microorganismo causa daños a la planta que colonizó (parasitismo). Se desconoce que causa éstas modificaciones en el comportamiento del microbio en la interacción planta-microorganismo. Se requiere hacer más estudios sobre esto.

El desarrollo de este proyecto de tesis, permitió seleccionar y caracterizar 18 de las 387 cepas bacterianas originalmente aisladas. El éxito del proyecto, se debió principalmente a que se partió de la premisa de que no existe un criterio universal que garantice un efecto antifúngico, ya que éste puede ser multifactorial, o incluso presentarse como un efecto sinérgico de varios componentes.

Este trabajo se considera la fase inicial de un proyecto que pretende a corto plazo, el desarrollo de un biofungicida para el control de hongos fitopatógenos que afectan el cultivo de banano en México. Este biofungicida podrá ser utilizado como una alternativa biotecnológica que incida en la disminución del uso de agentes químicos con la consecuente disminución de los costos de producción. Pero aun más importante, pretende colaborar como una tecnología Mexicana en el desarrollo de una agricultura sustentable y ambientalmente amigable, en el estado de Jalisco y Colima, y en las otras regiones productoras de banano y plátano en México. Estos resultados, serán utilizados para generar una patente.

CONCLUSIONES

De un total de 387 bacterias aisladas de muestras de hoja y suelo, en este trabajo se identificaron 42 bacterias con actividad quitinasa positivo, con capacidad potencial para ejercer un efecto antifúngico, que sumadas a las 15 seleccionadas por otra estudiante, abre la oportunidad de desarrollar un producto funcional para el combate de la Sigatoka negra.

Las técnicas de antibiosis realizadas contra *M. fijiensis* y *F. oxysporum* permiten la selección de bacterias con gran capacidad de retención del crecimiento micelial del hongo, de una forma más precisa que utilizando únicamente el criterio de la degradación de quitina.

Las bacterias seleccionadas, exhiben diversos comportamientos ante la presencia de extractos de hoja como fuente única de carbono o como complemento alimenticio, estableciéndose que algunas disminuyen su actividad metabólica mientras que otras la incrementan.

Se demostró que varias cepas bacterianas, pese a tener una capacidad menor de producción de quitinasas, son las que logran la mayor retención al crecimiento de las hifas de hongos, por lo que deberán estar involucradas otros tipos de moléculas antifúngicas.

El 52.63% de las bacterias seleccionadas con alto potencial antifúngico, pertenecen al género *Bacillus*, pudiéndose incrementar hasta un 63.15% si consideramos la controversia de clasificación *Bacillus/Lysinibacillus*.

La cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (TV2), demostró tener el mayor efecto antifúngico tanto contra *F. oxysporum* como contra *M. fijiensis*, por lo que se recomienda proseguir con su estudio.

En este trabajo se aislaron e identificaron 5 cepas de *Bacillus cereus*, las cuales tuvieron comportamientos no homogéneos en las pruebas de antibiosis, proporcionando evidencias que sostienen la idea de que cada cepa podrá tener un comportamiento diferente, frente a los mismos factores.

La presencia de *Enterobacter cloacae*, es un gran hallazgo, ya que ésta especie ha sido reportada como organismo endófito.

La presencia de organismos considerados tradicionalmente patógenos humanos como lo son *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, y *Pseudomonas aeruginosa* dentro de la lista de seleccionados como potenciales para el desarrollo de un biofunguicida nos obliga a pensar en el desarrollo de este biofunguicida a partir de exudados bacterianos, y no necesariamente con la participación de bacterias vivas en su formulación.

PERSPECTIVAS

Se deberá evaluar el efecto antifungico de las bacterias seleccionadas contra varias cepas de *M. fijiensis* con alta resistencia a los fungicidas comerciales.

Se requiere hacer ensayos de antibiosis con los productos de secreción de las bacterias en medios líquidos y su posterior purificación e identificación.

Se sugiere probar combinaciones de las bacterias identificadas con mayor actividad antifungica para descartar una posible inhibición por metabolitos o competencia por el sustrato.

Resulta importante profundizar en los mecanismos moleculares antifúngicos que usan las bacterias nativas aisladas en este proyecto, con la finalidad de lograr el desarrollo de nuevas estrategias de control, lo cual tendrá como consecuencia la reducción del uso de agentes químicos utilizados tradicionalmente para el control de enfermedades fúngicas, influyendo en la disminución de los costos de producción y la contaminación ambiental.

LITERATURA CITADA

- Aguilar-Barragán A. 2009. Variabilidad genética y resistencia a fungicidas en aislados del hongo *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka Negra del banano. Tesis profesional. Escuela de Biología. Universidad Autónoma de Guadalajara.
- Adams J.D. 2004 Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*. 150: 2029-2035.
- Ayyadurai N, Ravindra Naik P, Sreehari Rao M, Sunish Kumar R, Samrat SK, Manohar M, Sakthivel N. 2006. Isolation and characterization of a novel banana rhizosphere bacterium as fungal antagonist and microbial adjuvant in micropropagation of banana. *J. Appl. Microbiol.* 100:926-37.
- Beltrán-García, MJ, Manzo-Sánchez G., Orozco- Santos M., Ogura T. 2009. Sigatoka negra: el cáncer de la producción de banano. *Revista Ciencia y Desarrollo*, Junio Vol. 35, no. 232, p. 58-63.
- Beltrán-García MJ, Manzo-Sanchez G, Guzmán-Gonzalez S, Arias-Castro C, Gomez-Mendiola M & Ogura T. 2009. Oxidative stress response of *Mycosphaerella fijiensis*, the black sigatoka pathogen of banana to hydrogen peroxide and paraquat stress conditions. *Can. J. Microbiol.* 55:887-94
- Bowman Shaun M. y S.J Free. 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays* 28: 799-808
- Budi S.W., D. van Tuinen, C. Arnould, E. Dummas-Gaudot, V. Gianinazzi-Pearson y S. Gianinazzi. 2000. Hydrolitic enzyme activity of *Paenibacillus sp*,

strain B2 and effects of the antagonistic bacterium on cell integrity of two soil borne pathogenic fungi. *Appl. Soil Ecol.* 15: 191-199.

Carlier J, Lebrun MH, Zapater MF, Dubois C. and Mourichon X. 1996. Genetic structure of the global population of banana black leaf streak fungus, *Mycosphaerella fijiensis*. *Mol. Ecol.* 5: 499-510.

Chernin L., Z. Ismailov, S. Haran y L. Chet. 1995. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1720-1726.

Claus H, Bausinger T, Lehmler I, Perret N, Fels G, Dehner U, Preuss J, König H. 2007. Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by *Raoultella terrigena*. *Biodegradation* 18:27-35.

Crous PW, Groenewald JZ, Aptroot A, Braun U, Mourichon X, and Carlier J. 2002. Integrating morphological and molecular data sets on *Mycosphaerella*, with specific reference to species occurring on Musa. Pp 34-57 in: *proc 2nd Int. Workshop on Mycosphaerella leaf spot disease of bananas*. INIBAP, Montpellier, France.

Cook VJ, Turenne CY, Wolfe J, Pauls R, Kabani 2003. A. Conventional methods versus 16S ribosomal DNA sequencing for identification of nontuberculous mycobacteria: cost analysis. *J Clin Microbiol* 2003;41:1010-5 .

Dunn C., J. J Crowley, Y. Moënne-Loccoz., Y. Dowling., D. N de Bruijm y F. O'Gara. 1997. Biological control of *Pythium ultimum* by

Stenotrophomonas maltophilia W18 is mediated by an extracellular proteolytic activity. Microbiol. 143: 3921-3931 .

Fanta N., X. Ortega y L.U. Pérez. 2003. The development of *Alternaria alternata* is prevented by chitinases and β -1,3- glucanases from Citrus limon seedlings. Biol. Res. 36:411-420.

Farr DF, Bills GF, Chamuris GP, Rossman AY. 1995. Fungi on plants and plants products in the United States. APS Press, st. Paul, MN.

Feignier C., F. Besson y G. Michel. 1995. Studies on lipopeptide biosynthesis by *Bacillus subtilis*: Isolation and characterization of iturin-, surfactin+ mutants. FEMS Microbiol. Lett. 127: 11-15.

Fleming LR, Bolzan DN, Dos Santos Nascimento J. 2009. Antimicrobial Substances Produced by Coliform Strains Active Against Foodborne Pathogens. Foodborne Pathog Dis. 2009.

Folders J., J. Algra, M.S. Roelofs, L.C. Van Loon, J. Tommassen y W. Bitter. 2001. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Chitinase, a gradually secreted protein. J. Bact. 183:7044-7052.

Fullerton R.A. Sigatoka leaf diseases. 1994. Compendium of tropical fruit diseases. APS Press. St. Paul, Minnesota. 12-14.

Fullerton R.A. y R.H. Stover. 1990. Sigatoka leaf spot diseases of bananas: Proceeding of an international workshop held at San José, Costa Rica. INIBAP, Montpellier. 374 pp.

García-Torres E. 2009. Primer reporte de resistencia a fungicidas sistémicos en aislados del hongo *Mycosphaerella fijiensis* de la región productora de

plátanos y bananos pacífico-centro de México. Tesis profesional.
Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Guadalajara.

Goodwin SB, Dunkle LD, Zismann VL. 2001. Phylogenetic analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. *Phytopathology* 91: 648-658.

Goodwin SB, Waalwijk C, and Kema GHJ. 2004. genetics of *Mycosphaerella graminicola*: a model of Dothideales. In *Applied Mycology and Biotechnology. An International Series*, Vol. 4 Fungal.

Gohel V., A. Singh., M. Vimal, P. Ashwini y H. S. Chhatpar. 2006. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. *African J. Biotech.* 5: 54-72.

Gooday Graham W. 1992. What are the roles of chitinases in the growing fungus? *FEMS Microbiol. Lett.* 100: 387-392

Heins, Sherry Darlene; Manker, Denise ; Jimenez Desmond, Rito; McCoy Randy; Orjala, Jimmy y Marrone, Pamela. 2007. Nueva cepa de *Bacillus* destinada a uchar contra las enfermedades de las plantas y del gusano de las raices del maíz. Patente Europea No. 98922162.7

Hoster F., J. E. Schmitz y R. Daniel. 2005. Enrichment of chitinolytic microorganisms: Isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. *Appl. Microbiol. Biotech.* 66: 434-442.

Itoh Y., K. Takahashi., H. Takizawa. N. Nikaidou., H. Tanaka., H. Nishihashi., T. Watanabe y Y. Nishizawa. 2003. Family 19 chitinase of *Streptomyces*

griseus HUT6037 increases plant resistance to the fungal disease. Biosci. Biotech. Biochem. 67: 847-855.

Jacome L., P. Lepoivre, D. Marin, R. Ortiz, R. Romero y J.V. Escalante. 2002. *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. INIBAP. 1-317.

Jijakli H. M y Lepoivrep. 1998. Characterization of an exo β 1-3 glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. Phytopathol. 88: 335-343

Kishore G.K., S. Pande y A. R. Podile. 2005. Chitin-supplementer foliar application of *Serratia marcescens* GPS 5 improves control of late leaf spot disease of groundnut by activating defence-related enzymes. J. Phytopathol. 153: 169-173.

Lian J., Z. Wang y S. Zhou. 2008. Response of endophytic bacterial communities in banana tissue cultura plantlets to *Fusarium* wilt pathogen infection. J. Gen. Appl. Microbiol. 54:83-92.

Lodewyckx C., J. Vangronsveld., F. Porteous., E.R.B. Moore., S. Taghavi., M. Mezgeay y D. Von der Lelie. 2002. Endophytic bacteria and their potential applications. Crit. Rev.Plant Sci. 21:583-606.

Loper J.E., y Schroth M.N. 1986. Importance of siderophores in microbial interactions in the rizosphere. In iron siderophores and plant diseases. Swinburne, TR Plenum Publishing Company.

Madmony A, Chernin L, Pleban S, Peleg E, Riov J. 2005. *Enterobacter cloacae*, an obligatory endophyte of pollen grains of Mediterranean pines. Folia Microbiol 50:209-16.

Marín, DH., Romero, RA., Guzman, M., Sutton, D. 2003. Black Sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. *Plant Dis* 87: 208-222.

Martínez-Molina C. Selección de bacterias epífitas nativas de la planta de banano como alternativa biotecnológica para el biocontrol de hongos fitopatógenos. Fase 1 del desarrollo de un biofunguicida para la industria bananera. 2009. Tesis profesional. Escuela de Biología. Universidad Autónoma de Guadalajara.

Melent A.I., G. E. Aktuganov y N.F. Galimzyanova. 2001. The role of chitinase in the antifungal activity of *Bacillus* sp. 739. *Microbiol.* 70:636-641.

Mendoza-Ceja N. 2008. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* del filopiano de la hoja de banano: Agente potencial para el control biológico de hongos fitopatógenos. Tesis profesional. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Guadalajara.

Mourichon X. & R.A. Fullerton. 1990. Geographical distribution of the two species *Mycosphaerella musicola* Leach (*Cercospora musae*) and *M. fijiensis* Morelet (*C. fijiensis*), respectively agents of Sigatoka disease and black leaf streak disease in bananas and plantains. *Fruits* 45(3): 213-218.

Naik P.R., Sahoo N, Goswami D, Ayyadurai N, Sakthivel N. 2008. Genetic and functional diversity among fluorescent pseudomonads isolated from the rhizosphere of banana. *Microb. Ecol.* 56:492-504.

Naosepak SA, Verma R., Shanmugam V. 2006. Extracellular chitinases of fluorescent Pseudomonads antifungal to *Fusarium oxysporum f.sp.dianthi* causing carnation wilt. *Curr. Microbiol.* 52:310-316.

- O'Sullivan D. J. y F. O'Gara. 1992. Traits of Fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in Suppression of Plant Root Pathogens. *Microbiol. Rev.* 56: 662-676.
- Orozco-Santos, M, J. Farías-Larios, G. Manzo-Sánchez y S. Guzmán-González. 2001. La Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en México. *INFOMUSA* 10 (1): 33-37.
- Orozco-Santos M. y J. Orozco-Romero. 2004. La Sigatoka Negra en bananos y plátanos: el caso de México. Publicación especial. XVI Reunión Internacional ACORBAT. 70-78.
- Ploetz R. 2000 Black sigatoka. *Pesticide Outlook* 11:19-23.
- Reiter B., U. Pfeifer, H. Schwab y A. Sessitsch. 2002. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2261-2268.
- Rivas, G.G., Zapater, M.-F., Abadie, C. and Carlier, J. 2004. Founder effects and stochastic dispersal at the continental scale of the fungal pathogen of bananas *Mycosphaerella fijiensis*. *Mol. Ecol.* 13:471-482.
- Riveros Stella A. y A. M. Arciniegas. 2003. Productos naturales como biofungicidas e inductores de resistencia para el manejo de la Sigatoka Negra. *Actas del Taller "Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka Negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas"*. 31-32.
- Sánchez Y. J. M y Peña-Cabriañes JJ. 2000. Potencia de esporas de *Bacillus thuringiensis* en hojas de maíz, de frijol y en el suelo. *TERRA latinoamericana*. 18: 325-331.

- Secretaría de desarrollo rural del gobierno del estado de Colima (SEDER). 2005. Paquete tecnológico para el cultivo del plátano. Paquetes tecnológicos para cultivos agrícolas, en el estado de Colima.
- SIAP, 2007. Servicio de Informacion Estadistica Agroalimentaria y Pesquera. Obtenido de la red: www.siap.sagarpa.gob.mx (consultada 8 /01/08).
- Silva A.S.H., R.S. Romeiro, R. C. Filho., J.A.P. Pereira, E.S.G. Mizubuti y A. Munteer. 2004. Induction of systemic Resistance by *Bacillus cereus* against tomato foliar diseases under field conditions. J. Phytopathol. 152:371-375.
- Sutra L., Resède J.M. and Gardan, L. 2000. Isolation of fluorescent pseudomonads from the rhizosphere of banana plants antagonistic towards root necrosing fungi. Lett. Appl. Microbiol. 31: 289-293.
- Sorbotten A., S. J. Horn, V. G. H. Eijsink y K. M. Vårdum, 2005. Degradation of chitosans with chitinase B from *Serratia marcescens*. Production of chito-oligosaccharides and insight into enzyme processivity. The FEBS J. 272:538-549.
- Taechowisan T., Ch. Lu, Y. Shen y S. Lumyong. 2005. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. Microbiol. 151:1691-1695.
- Thamthiankul S., S. S. Ngay, S. Tantimavanich. 2001. Chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. pakistani. 2001. Appl. Microbiol. Biotech.56:395-401.

- Tendulkar S.R., Y.K. Saikumari., V. Patel., T.K. Munshi y P. Balaram. 2007. Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea* . J. Appl. Microbiol. 103:2331-2339.
- Tuesta-Popolizio D. Selección de bacterias epífitas de hojas en plátano variedad cavendish con actividad de quitinasa como alternativa para el biocontrol de hongos que afectan el cultivo de plátano. 2006. Tesis profesional. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Guadalajara.
- Thomas P, Kumari S, Swarna GK, Gowda TK. 2007. Papaya shoot tip associated endophytic bacteria isolated from in vitro cultures and host-endophyte interaction in vitro and in vivo. Can J Microbiol. 53:380-90.
- Thompson E. S., M. smith, M.C. Wilkinson y K. Peek. 2001. Identification and characterization of a chitinase antigen from *Pseudomonas aeruginosa* Strain 385. Appl. Environ. Microbiol. 67:4001-4008.
- Venegas Gonzalez, Elizabeth Vanessa. 2006. Selección y evaluación de aislamientos de bacterias del género *Bacillus* Cohn, antagonistas de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. y *Fusarium oxysporum* Schlecht, presentes en calas de colores. Tesis de Licenciatura, Universidad Austral de Chile.
- Viterbo A., O. Ramot, L. Chernin, L. Chet. 2002. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma spp.* in the biocontrol of fungal plant pathogens. Anton. Leeuwen. 81: 549-556.
- Warrior P. (2000). Living systems as natural crop protection agents. *Pest Manag. Sci.* 56:681-687.

- Weid von der I. D.S. Alviano, A.L.S. Alviano, Santos, R.M.A Soares, C.S. Alviano y L. Seldin. 2003. Antimicrobial activity of *Paenibacillus peoriae* strain NRRL BD-62 against a broad spectrum of phytopathogenic bacteria and fungi. J. Appl. Microbiol. 95:1143-1151.
- Windstam S, Nelson EB. 2008. Differential interference with *Pythium ultimum* sporangial activation and germination by *Enterobacter cloacae* in the corn and cucumber spermospheres. Appl. Environ. Microbiol. 74:4285-91.
- Woo PC, Ng KH, Lau SK, Yip KT, Fung AM, Leung KW, 2003. Usefulness of the MicroSeq 500 16S Ribosomal DNA-Based Bacterial Identification System for Identification of Clinically Significant Bacterial Isolates with Ambiguous Biochemical Profiles. J Clin Microbiol 2003;41: 1996-2001 .
- Yoon Gyo L., C. Ki-Chul., W. G. Seung., L.C.Jae y B.Hyeun-Jong. 2009. Purification and properties of a chitinase from *Penicillium* sp. LYG 0704. 2009. Protein Express. Pur. 65:244-250.

APENDICE 1 TABLAS DE ANOVA INHIBICION *FUSARIUM OXYSPOURUM*

Analysis Summary

Dependent variable: Area Cubierta cm2
Factor: Tratamiento

Number of observations: 8
Number of levels: 2

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento P1Va

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	155.761	1	155.761	3250.67	0.0000
Within groups	0.2875	6	0.0479167		
Total (Corr.)	156.049	7			

The F-ratio, which in this case equals 3250.67, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento P1Vb

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	166.531	1	166.531	5329.00	0.0000
Within groups	0.1875	6	0.03125		
Total (Corr.)	166.719	7			

The F-ratio, which in this case equals 5329.0, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento P1Vd

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	450.0	1	450.0	15428.57	0.0000
Within groups	0.175	6	0.0291667		
Total (Corr.)	450.175	7			

The F-ratio, which in this case equals 15428.6, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento P1Ve

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	70.805	1	70.805	1807.79	0.0000
Within groups	0.235	6	0.0391667		
Total (Corr.)	71.04	7			

The F-ratio, which in this case equals 1807.79, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento P1Vg

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	67.28	1	67.28	1583.06	0.0000
Within groups	0.255	6	0.0425		
Total (Corr.)	67.535	7			

The F-ratio, which in this case equals 1583.06, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento P2 Va

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.5	1	0.5	4.72	0.0727
Within groups	0.635	6	0.105833		
Total (Corr.)	1.135	7			

The F-ratio, which in this case equals 4.72441, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is greater than or equal to 0.05, there is not a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento P2Vb

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	332.82	1	332.82	8497.53	0.0000
Within groups	0.235	6	0.0391667		
Total (Corr.)	333.055	7			

The F-ratio, which in this case equals 8497.53, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento P2Vbdg

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	197.011	1	197.011	684.26	0.0000
Within groups	1.7275	6	0.287917		
Total (Corr.)	198.739	7			

The F-ratio, which in this case equals 684.265, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento P2Ve

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	70.805	1	70.805	121.55	0.0000
Within groups	3.495	6	0.5825		
Total (Corr.)	74.3	7			

The F-ratio, which in this case equals 121.554, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento P4Vadg

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	315.005	1	315.005	3979.01	0.0000
Within groups	0.475	6	0.0791667		
Total (Corr.)	315.48	7			

The F-ratio, which in this case equals 3979.01, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento P4Vbdg

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	30.8112	1	30.8112	477.08	0.0000
Within groups	0.3875	6	0.0645833		
Total (Corr.)	31.1987	7			

The F-ratio, which in this case equals 477.077, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento P4Vcdg

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	392.0	1	392.0	2627.93	0.0000
Within groups	0.895	6	0.149167		
Total (Corr.)	392.895	7			

The F-ratio, which in this case equals 2627.93, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento P4Vc1

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	374.011	1	374.011	1629.09	0.0000
Within groups	1.3775	6	0.229583		
Total (Corr.)	375.389	7			

The F-ratio, which in this case equals 1629.09, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento P4Vc2

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	385.031	1	385.031	4643.59	0.0000
Within groups	0.4975	6	0.0829167		
Total (Corr.)	385.529	7			

The F-ratio, which in this case equals 4643.59, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento P4Vd

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	17.7012	1	17.7012	40.89	0.0007
Within groups	2.5975	6	0.432917		
Total (Corr.)	20.2987	7			

The F-ratio, which in this case equals 40.8884, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento P5Vbdg

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	103.68	1	103.68	445.94	0.0000
Within groups	1.395	6	0.2325		
Total (Corr.)	105.075	7			

The F-ratio, which in this case equals 445.935, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento P5VdEdg

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	239.805	1	239.805	792.74	0.0000
Within groups	1.815	6	0.3025		
Total (Corr.)	241.62	7			

The F-ratio, which in this case equals 792.744, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento P5Vgdg

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	12.5	1	12.5	61.73	0.0002
Within groups	1.215	6	0.2025		
Total (Corr.)	13.715	7			

The F-ratio, which in this case equals 61.7284, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento P6Va

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	2.0	1	2.0	14.37	0.0091
Within groups	0.835	6	0.139167		
Total (Corr.)	2.835	7			

The F-ratio, which in this case equals 14.3713, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento P6Vadg

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	31.205	1	31.205	285.85	0.0000
Within groups	0.655	6	0.109167		
Total (Corr.)	31.86	7			

The F-ratio, which in this case equals 285.847, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento P6Vb

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	106.58	1	106.58	501.55	0.0000
Within groups	1.275	6	0.2125		
Total (Corr.)	107.855	7			

The F-ratio, which in this case equals 501.553, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento P6Vbdg

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	18.3012	1	18.3012	174.99	0.0000
Within groups	0.6275	6	0.104583		
Total (Corr.)	18.9287	7			

The F-ratio, which in this case equals 174.992, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento P6Vc

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	500.861	1	500.861	649.41	0.0000
Within groups	4.6275	6	0.77125		
Total (Corr.)	505.489	7			

The F-ratio, which in this case equals 649.415, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento P6Ve

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	318.781	1	318.781	787.92	0.0000
Within groups	2.4275	6	0.404583		
Total (Corr.)	321.209	7			

The F-ratio, which in this case equals 787.925, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento P6Vf

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	5.95125	1	5.95125	15.89	0.0072
Within groups	2.2475	6	0.374583		
Total (Corr.)	8.19875	7			

The F-ratio, which in this case equals 15.8877, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento P6Vh

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	136.125	1	136.125	309.96	0.0000
Within groups	2.635	6	0.439167		
Total (Corr.)	138.76	7			

The F-ratio, which in this case equals 309.962, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento TV1c

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	72.0	1	72.0	2468.57	0.0000
Within groups	0.175	6	0.0291667		
Total (Corr.)	72.175	7			

The F-ratio, which in this case equals 2468.57, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento TV1cA

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	70.805	1	70.805	1807.79	0.0000
Within groups	0.235	6	0.0391667		
Total (Corr.)	71.04	7			

The F-ratio, which in this case equals 1807.79, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento TV2

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1487.85	1	1487.85	41044.17	0.0000
Within groups	0.2175	6	0.03625		
Total (Corr.)	1488.07	7			

The F-ratio, which in this case equals 41044.2, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento TV3c

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	85.805	1	85.805	222.39	0.0000
Within groups	2.315	6	0.385833		
Total (Corr.)	88.12	7			

The F-ratio, which in this case equals 222.389, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento TV41ac

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	74.42	1	74.42	176.14	0.0000
Within groups	2.535	6	0.4225		
Total (Corr.)	76.955	7			

The F-ratio, which in this case equals 176.142, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento TV41 bc

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	104.401	1	104.401	371.20	0.0000
Within groups	1.6875	6	0.28125		
Total (Corr.)	106.089	7			

The F-ratio, which in this case equals 371.204, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento TV42a

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	9.46125	1	9.46125	52.68	0.0003
Within groups	1.0775	6	0.179583		
Total (Corr.)	10.5388	7			

The F-ratio, which in this case equals 52.6845, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento TV42ccA

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	651.605	1	651.605	2482.30	0.0000
Within groups	1.575	6	0.2625		
Total (Corr.)	653.18	7			

The F-ratio, which in this case equals 2482.3, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento TV42ccB

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	98.7013	1	98.7013	452.93	0.0000
Within groups	1.3075	6	0.217917		
Total (Corr.)	100.009	7			

The F-ratio, which in this case equals 452.931, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento TV51ac

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	44.18	1	44.18	310.04	0.0000
Within groups	0.855	6	0.1425		
Total (Corr.)	45.035	7			

The F-ratio, which in this case equals 310.035, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento TV52

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	272.611	1	272.611	1782.74	0.0000
Within groups	0.9175	6	0.152917		
Total (Corr.)	273.529	7			

The F-ratio, which in this case equals 1782.74, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento TV5b

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	814.061	1	814.061	1587.12	0.0000
Within groups	3.0775	6	0.512917		
Total (Corr.)	817.139	7			

The F-ratio, which in this case equals 1088.71, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento TV5e

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	253.125	1	253.125	1088.71	0.0000
Within groups	1.395	6	0.2325		
Total (Corr.)	254.52	7			

The F-ratio, which in this case equals 1088.71, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento TV5f

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	419.051	1	419.051	990.86	0.0000
Within groups	2.5375	6	0.422917		
Total (Corr.)	421.589	7			

The F-ratio, which in this case equals 990.86, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento TV5g

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	16.5313	1	16.5313	39.40	0.0008
Within groups	2.5175	6	0.419583		
Total (Corr.)	19.0487	7			

The F-ratio, which in this case equals 39.3992, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Area Cubierta cm2 by Tratamiento TV5ñc

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	211.151	1	211.151	1629.46	0.0000
Within groups	0.7775	6	0.129583		
Total (Corr.)	211.929	7			

The F-ratio, which in this case equals 1629.46, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Area Cubierta cm2 from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

APENDICE 2

TABLAS DE ANOVA

INHIBICION MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS

Analysis Summary

Dependent variable: Diametro mm
Factor: Tratamiento

Number of observations: 6
Number of levels: 2

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento PlVa

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	19.8017	1	19.8017	383.26	0.0000
Within groups	0.206667	4	0.0516667		
Total (Corr.)	20.0083	5			

The F-ratio, which in this case equals 383.258, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento PlVb

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	107.527	1	107.527	1372.68	0.0000
Within groups	0.313333	4	0.0783333		
Total (Corr.)	107.84	5			

The F-ratio, which in this case equals 1372.68, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento P1Vd

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	100.042	1	100.042	1875.78	0.0000
Within groups	0.213333	4	0.0533333		
Total (Corr.)	100.255	5			

The F-ratio, which in this case equals 1875.78, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento P1Ve

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	37.0017	1	37.0017	288.32	0.0001
Within groups	0.513333	4	0.128333		
Total (Corr.)	37.515	5			

The F-ratio, which in this case equals 288.325, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento P1Vg

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	79.2067	1	79.2067	1159.12	0.0000
Within groups	0.273333	4	0.0683333		
Total (Corr.)	79.48	5			

The F-ratio, which in this case equals 1159.12, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento P2Va

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.015	1	0.015	0.05	0.8322
Within groups	1.17333	4	0.293333		
Total (Corr.)	1.18833	5			

The F-ratio, which in this case equals 0.0511364, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is greater than or equal to 0.05, there is not a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento P2Vb

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	117.927	1	117.927	1608.09	0.0000
Within groups	0.293333	4	0.0733333		
Total (Corr.)	118.22	5			

The F-ratio, which in this case equals 1608.09, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento P2Vbdg

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	89.7067	1	89.7067	1454.70	0.0000
Within groups	0.246667	4	0.0616667		
Total (Corr.)	89.9533	5			

The F-ratio, which in this case equals 1454.7, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento P2Ve

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	75.615	1	75.615	1106.56	0.0000
Within groups	0.273333	4	0.0683333		
Total (Corr.)	75.8883	5			

The F-ratio, which in this case equals 1106.56, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento P4Vadg

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	59.535	1	59.535	1020.60	0.0000
Within groups	0.233333	4	0.0583333		
Total (Corr.)	59.7683	5			

The F-ratio, which in this case equals 1020.6, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento P4Vbdg

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	129.735	1	129.735	2684.17	0.0000
Within groups	0.193333	4	0.0483333		
Total (Corr.)	129.928	5			

The F-ratio, which in this case equals 2684.17, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento P4Vcdg

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	131.602	1	131.602	2256.03	0.0000
Within groups	0.233333	4	0.0583333		
Total (Corr.)	131.835	5			

The F-ratio, which in this case equals 2256.03, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento P4Vcl

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	94.4067	1	94.4067	2023.00	0.0000
Within groups	0.186667	4	0.0466667		
Total (Corr.)	94.5933	5			

The F-ratio, which in this case equals 2023.0, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento P4Vc2

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	52.8067	1	52.8067	856.32	0.0000
Within groups	0.246667	4	0.0616667		
Total (Corr.)	53.0533	5			

The F-ratio, which in this case equals 856.324, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento P4Vd

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	22.4267	1	22.4267	420.50	0.0000
Within groups	0.213333	4	0.0533333		
Total (Corr.)	22.64	5			

The F-ratio, which in this case equals 420.5, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento P5Vbdg

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1.70667	1	1.70667	24.98	0.0075
Within groups	0.273333	4	0.0683333		
Total (Corr.)	1.98	5			

The F-ratio, which in this case equals 24.9756, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento P5VdEdg

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	103.335	1	103.335	1937.53	0.0000
Within groups	0.213333	4	0.0533333		
Total (Corr.)	103.548	5			

The F-ratio, which in this case equals 1937.53, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento P5Vgdg

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	105.002	1	105.002	2172.45	0.0000
Within groups	0.193333	4	0.0483333		
Total (Corr.)	105.195	5			

The F-ratio, which in this case equals 2172.45, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento P6Va

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	73.5	1	73.5	1520.69	0.0000
Within groups	0.193333	4	0.0483333		
Total (Corr.)	73.6933	5			

The F-ratio, which in this case equals 1520.69, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento P6Vadg

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	18.375	1	18.375	268.90	0.0001
Within groups	0.273333	4	0.0683333		
Total (Corr.)	18.6483	5			

The F-ratio, which in this case equals 268.902, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento P6Vb

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.00666667	1	0.00666667	0.09	0.7850
Within groups	0.313333	4	0.0783333		
Total (Corr.)	0.32	5			

The F-ratio, which in this case equals 0.0851064, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is greater than or equal to 0.05, there is not a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento P6Vbdg

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	20.1667	1	20.1667	127.37	0.0004
Within groups	0.633333	4	0.158333		
Total (Corr.)	20.8	5			

The F-ratio, which in this case equals 127.368, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento P6Vc

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	136.327	1	136.327	1669.31	0.0000
Within groups	0.326667	4	0.0816667		
Total (Corr.)	136.653	5			

The F-ratio, which in this case equals 1669.31, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento P6Ve

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	66.6667	1	66.6667	1142.86	0.0000
Within groups	0.233333	4	0.0583333		
Total (Corr.)	66.9	5			

The F-ratio, which in this case equals 1142.86, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento P6Vf

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.0416667	1	0.0416667	0.29	0.6164
Within groups	0.566667	4	0.141667		
Total (Corr.)	0.608333	5			

The F-ratio, which in this case equals 0.294118, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is greater than or equal to 0.05, there is not a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento P6Vh

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	53.4017	1	53.4017	1104.86	0.0000
Within groups	0.193333	4	0.0483333		
Total (Corr.)	53.595	5			

The F-ratio, which in this case equals 1104.86, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento TV1c

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	88.935	1	88.935	1840.03	0.0000
Within groups	0.193333	4	0.0483333		
Total (Corr.)	89.1283	5			

The F-ratio, which in this case equals 1840.03, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento TV1CA

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	50.46	1	50.46	540.64	0.0000
Within groups	0.373333	4	0.0933333		
Total (Corr.)	50.8333	5			

The F-ratio, which in this case equals 540.643, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento TV2

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	131.602	1	131.602	2722.79	0.0000
Within groups	0.193333	4	0.0483333		
Total (Corr.)	131.795	5			

The F-ratio, which in this case equals 2722.79, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento TV3c

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	3.84	1	3.84	65.83	0.0013
Within groups	0.233333	4	0.0583333		
Total (Corr.)	4.07333	5			

The F-ratio, which in this case equals 65.8286, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento TV41AC

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	41.6067	1	41.6067	351.61	0.0000
Within groups	0.473333	4	0.118333		
Total (Corr.)	42.08	5			

The F-ratio, which in this case equals 351.606, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento TV41Bc

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	25.6267	1	25.6267	549.14	0.0000
Within groups	0.186667	4	0.0466667		
Total (Corr.)	25.8133	5			

The F-ratio, which in this case equals 549.143, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento TV42a

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.201667	1	0.201667	4.17	0.1106
Within groups	0.193333	4	0.0483333		
Total (Corr.)	0.395	5			

The F-ratio, which in this case equals 4.17241, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is greater than or equal to 0.05, there is not a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento TV42ccA

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	82.14	1	82.14	1202.05	0.0000
Within groups	0.273333	4	0.0683333		
Total (Corr.)	82.4133	5			

The F-ratio, which in this case equals 1202.05, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento TV42ccB

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	132.54	1	132.54	2742.21	0.0000
Within groups	0.193333	4	0.0483333		
Total (Corr.)	132.733	5			

The F-ratio, which in this case equals 2742.21, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento TV51ac

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	19.44	1	19.44	402.21	0.0000
Within groups	0.193333	4	0.0483333		
Total (Corr.)	19.6333	5			

The F-ratio, which in this case equals 402.207, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento TV52

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	13.2017	1	13.2017	273.14	0.0001
Within groups	0.193333	4	0.0483333		
Total (Corr.)	13.395	5			

The F-ratio, which in this case equals 273.138, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento TV5b

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	814.061	1	814.061	1587.12	0.0000
Within groups	3.0775	6	0.512917		
Total (Corr.)	817.139	7			

The F-ratio, which in this case equals 1587.12, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento TV5e

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	253.125	1	253.125	1088.71	0.0000
Within groups	1.395	6	0.2325		
Total (Corr.)	254.52	7			

The F-ratio, which in this case equals 1088.71, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento TV5f

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	419.051	1	419.051	990.86	0.0000
Within groups	2.5375	6	0.422917		
Total (Corr.)	421.589	7			

The F-ratio, which in this case equals 990.86, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento TV5g

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	16.5313	1	16.5313	39.40	0.0008
Within groups	2.5175	6	0.419583		
Total (Corr.)	19.0487	7			

The F-ratio, which in this case equals 39.3992, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.

ANOVA Table for Diametro mm by Tratamiento TV5ñc

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	211.151	1	211.151	1629.46	0.0000
Within groups	0.7775	6	0.129583		
Total (Corr.)	211.929	7			

The F-ratio, which in this case equals 1629.46, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Diametro mm from one level of Tratamiento to another at the 95.0% confidence level.