

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, MOLECULAR Y BIOQUÍMICA DE HONGOS Y
BACTERIAS ASOCIADOS A PIÑUELA *Bromelia karatas* L. EN LOS MUNICIPIOS EL
PATIA Y MERCADERES CAUCA

PRESENTADO POR:

GEYSSON HERNANDEZ ROMERO.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE PALMIRA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

2018

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, MOLECULAR y BIOQUÍMICA DE HONGOS Y
BACTERIAS ASOCIADOS A PIÑUELA *Bromelia karatas* L. EN LOS MUNICIPIOS DEL
PATIA Y MERCADERES CAUCA

GEYSSON HERNÁNDEZ ROMERO

**Tesis para optar al título de Magister en Ciencias Agrarias línea de investigación
de protección de cultivos.**

DIRECTOR:

EYDER DANIEL GÓMEZ

Ph. D Biotecnología

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE PALMIRA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

2018

*“A mis padres Nepomuceno Hernández y María del Carmen
Romero por su tenacidad, dedicación, el amor, la confianza y
el apoyo Incondicional...”*

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, por la beca de exención de derechos académicos y el apoyo económico a través del sistema HERMES.

Al Dr. Eyder Daniel Gómez López por la oportunidad, la confianza, su orientación, el apoyo, los consejos y su amistad.

A mis compañeros de laboratorio y grupo de investigación Carlos A. Huertas, Jhon Córdoba, Viviana Sánchez, Ángela Domínguez y David Velásquez, por la compañía, su camaradería y la buena energía.

Al MSc. Fernando Solarte por la colaboración y buena actitud.

A Mayra Alexandra Benavides por el amor, el apoyo y su compañía.

A mi hermano Cristian Andrés P. R. por el apoyo, la motivación y por ser un punto de referencia.

RESUMEN

La piñuela (*Bromelia karatas* L.), es una de las especies, productoras de frutos comestibles, pertenecientes a la sub-familia Bromelioidae. Sus frutos, además de sus magnas propiedades organolépticas presentan características fito-químicas de gran interés en áreas como la Agronomía y Agroindustria. Este estudio tuvo como objetivo realizar la identificación de hongos y bacterias asociados a la especie *B. karatas* L. piñuela, colectadas en los municipios de Mercaderes y el Patía Cauca, a través de un enfoque polifásico, integrando caracteres morfológicos, bioquímicos y filogenéticos basados en análisis de secuenciamiento multi-locus. Como resultado se obtuvieron 40 aislamientos fúngicos, los cuales fueron caracterizados morfológicamente e identificados a través de un análisis de Inferencia Bayesiana y Neighbor-Joining en: *Colletotrichum gloesporioides* f.sp. *fruticola.*, *Fusarium fujikuroi* f.sp. *phyllopiillum*, *Fusarium solani* f.sp. *xanthoxyli*, *Fusarium fujikuroi* f.sp., *Neopestalotiopsis* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium citrinum*, *Lasiodiplodia* spp., *Diaphorte acaciarum*, De igual forma, se obtuvieron 14 aislamientos bacterianos los cuales fueron caracterizados morfológica, bioquímica e identificados molecularmente mediante un análisis Neighbor-Joining como; *Burkholderia* sp., *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus megaterium*. De esta forma, se genera el primer reporte de microorganismos asociados al cultivo de piñuela y con esto información básica para posteriores estudios epidemiológicos y control biológico que faciliten el aprovechamiento agronómico de este cultivo.

Palabras clave: Caracterizar, identificar, filogenia, (AIB) Análisis de inferencia bayesiana.

ABSTRAC

The piñuela (*Bromelia karatas* L.), is one of the species, producers of edible fruits, belonging to the Bromelioidae sub family. Its fruits, in addition to its magnificent organoleptic properties, have phytochemical characteristics of great interest in areas such as Agronomy and Agro-industry. The objective of this study was to identify the fungi and bacteria associated with the species *B. karatas* L. piñuela, collected in the municipalities of Mercaderes and Patía Cauca, through a political approach, integrating morphological, biochemical and phylogenetic characters. multi-locus sequencing analysis. As a result, they obtained 40 fungal isolations, which were morphologically characterized and identified through an analysis of Bayesian Inference and Neighbor-Join in: *Colletotrichum gloesporioides* f.sp. *fruticola.*, *Fusarium fujikuroi* f.sp. *phyllopillum*, *Fusarium solani* f.sp. *Xanthoxyli*, *Fusarium fujikuroi* f.sp., *Neopestalotiopsis* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium citrinum*, *Lasiodiplodia* spp., *Diaphorte acaciarum*, Likewise, 14 bacterial isolates were obtained, which were characterized morphologically, biochemically and molecularly identified by a Neighbor analysis. -Together with how; *Burkholderia* sp., *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus megaterium*. In this way, the first report of microorganisms associated with the cultivation of piñuela is generated and with this basic information for epidemiological studies and biological control that facilitate the agronomic use of this crop.

Keywords: Characterize, identify, phylogeny, (AIB) Analysis of Bayesian inference.

Contenido

Tabla de contenido

Listas de figuras

Lista de tablas

Lista de anexos

1. INTRODUCCIÓN	19
2. REVISIÓN	21
2.1. LA PIÑUELA <i>Bromelia karatas</i> L.	25
2.2. TAXONOMÍA DE LA ESPECIE (<i>Bromelia karatas</i> L.)	26
2.3. ESTUDIOS DIRIGIDOS A <i>Bromelia karatas</i> L.	27
2.4. ENFERMEDADES EN BROMELIAS DE INPORTANCIA ECONÓMICA <i>Ananas comosus</i> L. Y <i>Aechmea fasciata</i> B.	28
3. OBJETIVOS	30
3.1. OBJETIVO GENERAL	30
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4. MATERIALES Y METODOS	31
4.1. TOMA DE MUESTRAS	31
4.2. AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN DE COLONIAS Y CONSERVACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS.	32
4.3. IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS FUNGICOS	33
4.3.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS	33
4.3.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE HONGOS: EXTRACCIÓN DE DNA DE HONGOS	34
4.3.3. AMPLIFICACIÓN DE DNA DE HONGOS POR PCR (Reacting chain polymerase).	35
4.4. IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS	36
4.4.1. CARACTERIZACION MORFOLÓGICA, CULTURAL Y BIOQUÍMICA DE BACTERIAS.	36
4.4.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS: EXTRACCIÓN DE DNA DE BACTERIAS.	37
4.4.3. AMPLIFICACION DEL DNA DE BACTERIAS.	37
4.5. EDICIÓN DE SECUENCIAS DE DNA.	38
4.6. ANÁLISIS FILOGENÉTICO	39

Contenido

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
5.1. TOMA DE MUESTRAS	40
5.2. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS FÚNGICOS	43
5.3. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS	43
5.4. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, CULTURAL Y BIOQUÍMICA DE BACTERIAS	53
5.5. ANÁLISIS FILOGENÉTICO	59
6. CONCLUSIONES	82
7. RECOMENDACIONES	83
8. BIBLIOGRAFÍA	84

Lista de figuras

Figura 1. Síntoma 1, (A) Síntoma sobre el as, (B) síntoma sobre el envés de la hoja.

Figura 2. Síntoma 2, (A) Síntoma sobre el as, (B) síntoma sobre el envés de la hoja.

Figura 3. Síntomas 3, (A) Síntoma sobre el as, (B) síntoma sobre el envés de la hoja.

Figura 4. Síntoma 4, **(A)** Síntoma externo sobre fruto, **(B)** Síntomas interno sobre el fruto.

Figura 5. Síntoma 5, **(A)** Síntoma externo sobre el fruto, **(B)** Síntoma interno sobre fruto.

Figura 6. Caracterización morfológica aislamiento T, (A) Macroconidios, (B) Microconidios, (C) Monofialides y Macro-conidio, (D) Cultivo em PDA. Escala bar (A, B) 10 μm ., (C) 50 μm .

Figura 7. Caracterización morfológica aislamiento 4P y 2P, (A) Macroconidios, (B) Microconidios, (C) Monofialides y Micro-conidios en falsas cabezas, (D) Clamidosporas, (E) Esporodoquio, (F) Cultivo en medio PDA. Escala bar (A, B, E)10 μm ., (C, D) 50 μm .

Figura 8. Caracterización morfológica aislamiento PP1 y X2, (A) Macroconidios, (B) Microconidios, (C) Esporodoquio, (D) Cultivo en medio PDA. Escala bar 10 μm .

Figura 9. Caracterización morfológica aislamiento U, (A, B) Conidios, (C) Cultivo en medio PDA. Escala bar 10 μm .

Figura 10. Caracterización morfológica aislamiento J2 y X1, (A) Conidios, Cultivo en medio PDA. Escala bar 10 μm .

Figura 11. Caracterización morfológica aislamiento F, (A) Conidióforos, (B) Cinemas, (C) Conídios, (D) Cultivo em médio PDA. Escala bar 10 μm .

Figura 12. Caracterización morfológica aislamiento M, N y O, (A) Conidióforos, (B) Vesículas, (C) Conidios, (D) Cultivo en medio PDA. Escala bar 10 μm .

Contenido

Figura 13. Caracterización morfológica aislamiento R, H1, PP y P, (A, C) Conidióforo, (B) Conidios, (D) Cultivo en medio PDA. Escala bar 10 μm .

Figura 14. Caracterización morfológica aislamientos 2, 4, 5, 7 y 8, (A) Células Bacterianas, (B) Colonia en medio AN. Escala bar 10 μm .

Figura 15. Caracterización morfológica aislamiento 3, (A) Células bacterianas, (B) Colonia en medio AN. Escala bar 10 μm .

Figura 16. Caracterización morfológica aislamiento 9, (A) Células bacterianas, (B) Colonia en medio AN. Escala bar 10 μm .

Figura 17. Caracterización morfológica aislamiento 10 y 11, (A) Células bacterianas, (B) Colonia en medio AN. Escala bar 10 μm .

Figura 18. Caracterización morfológica aislamiento 12, (A) Células bacterianas, (B) Colonia en medio AN. Escala bar 10 μm .

Figura 19. Caracterización morfológica aislamiento 14, (A) Células bacterianas, (B) Colonia en medio AN. Escala bar 10 μm .

Figura 20. Caracterización morfológica aislamiento 15, (A) Células bacterianas, (B) Colonia en medio AN. Escala bar 10 μm .

Figura 21: Análisis de Inferencia Bayesiana (AIB) de las secuencias BT2 y TEF de 48 aislamientos del Complejo *F. fujikuroi*. Los valores de (PP) son mostrados encima de cada uno de los nudos del filo-grama, así como también, los códigos de las accesiones de cada aislamiento

Contenido

Figura 22: Análisis de Inferencia Bayesiana (AIB) de las secuencias ITS y TEF de 13 aislamientos del Complejo *F. solani*. Los valores de (PP) son mostrados encima de cada uno de los nudos del filo-grama, así como también, los códigos de las accesiones de cada aislamiento.

Figura 23: Análisis de Inferencia Bayesiana (AIB) de las secuencias BT2 y ITS de 24 aislamientos del Complejo *C. gloesporioides*. Los valores de (PP) son mostrados encima de cada uno de los nudos del árbol, así como también, los códigos de las accesiones de cada aislamiento.

Figura 24: Análisis de Inferencia Bayesiana (AIB) de las secuencias BT2 y ITS de 13 aislamientos del Complejo género *Penicillium*. Los valores de (PP) son mostrados encima de cada uno de los nudos del árbol, así como también, los códigos de las accesiones de cada aislamiento.

Figura 25: Análisis de Inferencia Bayesiana (AIB) de las secuencias BT2 y ITS de 17 aislamientos de los géneros *Pestalotiopsis* y *Neopestalotiopsis*. Los valores de (PP) son mostrados encima de cada uno de los nudos del árbol, así como también, los códigos de las accesiones de cada aislamiento.

Figura 26: Análisis de Inferencia Bayesiana (AIB) de las secuencias BT2 y ITS de 13 aislamientos del género *Diaphorte*. Los valores de (PP) son mostrados encima de cada uno de los nudos del árbol, así como también, los códigos de las accesiones de cada aislamiento.

Contenido

Figura 27: Análisis Neighbor-joining (NJ) de la secuencia BT2 de 35 aislamientos de la sección Fumigati del género *Aspergillus*. Los valores de similitud son mostrados encima de cada uno de los nudos del árbol, así como también, los códigos de las accesiones de cada aislamiento.

Figura 28: Análisis Neighbor-joining (NJ) de la secuencia ITS de 31 aislamientos del género *Lasiodiplodia*. Los valores de similitud son mostrados encima de cada uno de los nudos del árbol, así como también, los códigos de las accesiones de cada aislamiento.

Figura 29: Análisis Neighbor-joining (NJ) de la secuencia FD1 y RD1 de 10 aislamientos del género *Burkholderia*. Los valores de similitud son mostrados encima de cada uno de los nudos del árbol, así como también, los códigos de las accesiones de cada aislamiento.

Figura 30. Ampliación de la ramificación del filo-grama Análisis Neighbor-joining (NJ) de la secuencia FD1 y RD1 de las especies de *Burkholderia* sp.

Figura 31. Análisis Neighbor-joining (NJ) de la secuencia FD1 y RD1 de 20 especies del género *Bacillus* sp. Los valores de similitud son mostrados encima de cada uno de los nudos del árbol, así como también, los códigos de las accesiones de cada aislamiento.

Contenido

Lista de tablas.

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para la amplificación de la región Internal transcript spacer ITS, el gen para β -tubulina y el Factor de elongación TEF1 en la reacción PCR.

Tabla 2. Condiciones de (PCR) para los oligonucleótidos ITS, BT2 y TEF1

Tabla 3. Oligonucleótidos para amplificación del gen 16S rDNA de los aislamientos bacterianos.

Tabla 4. Condiciones de (PCR) para oligonucleótidos FD1 y RD1.

Tabla 5. Código de los aislamientos, área de muestreo y área afectada de la planta.

Tabla 6. Resultados pruebas bioquímicas tiras API 20E.

Contenido

Listas de cuadros.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de la especie *B. karatas* L.

Cuadro 2. Medios utilizados en la caracterización de microorganismos fúngicos y bacterianos (Leslie y Summerell, 2006).

Lista de Anexos

Anexo 1. FRAGMENTO DE CLAVE DICOTÓMICA PARA *Bromelia karatas* L. (Orellana et al.,2004)

“Según la clave de la flora Mesoamericana Bromelia L. son plantas terrestres, acaules a breviacaules, rizomatosas o estoloníferas, hojas arrosietadas, fuertemente armadas. Escapo casi ausente hasta alargado y conspicuo, terminal. Inflorescencia pinnado o fasciculado compuesta, raramente simple, ligeramente laxo alargada a sub-capitada. Flores bisexuales, sésiles a pediceladas; sépalos libres o raramente connatos; pétalos libres, carnosos, sin apéndices, adnatos al tubo en el medio, libres marginalmente; estambres con los filamentos connatos, las anteras sin apéndices; ovario ínfero. Fruto una baya; semillas sin apéndices (Davidse, Sousa y Chater; 1994).

- 1. Inflorescencia corta, cilíndrica a capitada; ramas laterales cortas a obsoletas, a menudo casi completamente cubiertas por las vainas de las brácteas primarias en la antesis; flores a menudo fasciculadas.***
- 2. Escapo ausente o muy corto, completamente cubierto por las vainas foliares; pelosidad de la inflorescencia ferrugínea; brácteas florales 8-9 cm oblanceoladas.”***

1. INTRODUCCIÓN

Bromelia karatas L. también llamada piñuela, es una de las especies de Bromelias productoras de frutos comestibles pertenecientes a la sub-familia Bromelioidae. Es considerada una planta promisoría, poseedora de cualidades de gran interés en áreas como: Agroecología, Agroindustria y Agronomía, resaltando en esta última, la producción de gran cantidad de frutos con magnas características organolépticas y fito-químicas (Orellana *et al.*, 2004; Acebey *et al* 2006; Miranda M. *et al* 2007; Zanella *et al.*, 2012). Actualmente, son pocos los estudios o información científica registrada para esta especie y entre esta, ninguna dirigida al desarrollo agronómico del cultivo o manejo e identificación de enfermedades limitantes de la producción y calidad de sus frutos.

En piñuela al igual que en otros cultivos, las enfermedades generadas por microorganismos son consideradas las principales limitantes de la calidad y producción. En efecto, a través del tiempo su interacción con cultivos agrícolas en diferentes partes del mundo ha tenido tal impacto que ha marcado la historia de la humanidad; Algunos de estos eventos son: la muerte y migración por hambruna en Irlanda entre el año 1845 y 1846., como consecuencia de la destrucción de los campos de papa generada por el Oomiceto *Phytophthora infestans*. En la actualidad este patógeno es de difícil manejo y continúa generando graves daños y pérdidas económicas en diferentes cultivos (Bergamín *et al.*, 2011). De igual forma, alrededor del año 1869 fue identificado el hongo *Hemileia vastatrix* agente causal de la roya del café, el cual 20 años más tarde reduciría las producciones de café de 50 mil t., a cero en las islas de Sri Lanka, Java y Sumatra (Bergamín *et al.*, 2011; Schumann, 2017).

Por otra parte, la enfermedad generada por la bacteria *Candidatus Liberibacter* llamada Huanglongbing o “HLB” es actualmente la más importante en cultivos de cítricos a nivel mundial, debido a su rápida dispersión y las grandes pérdidas que ha ocasionado en el continente Asiático (Gottwald *et al.*, 2007). En el caso de Colombia, uno de los eventos

Resultados

importantes en la producción agrícola del país ocurrió en el sector bananero, cuando la raza 1 del Hongo *Fusarium oxysporum* fsp. *Cubense* destruyó casi en su totalidad la variedad Gross Michel en la década de los 50s, obligando a reemplazar estos por la variedad Cavendish, variedad que no es afectada por la raza 1 (ICA, 2017).

Como respuesta a estas eventualidades, desde el inicio de la fitopatología el objetivo principal de los investigadores ha sido encontrar una solución que ayude a controlar este tipo de enfermedades, haciendo uso de diferentes técnicas de manejo basadas en la identificación y caracterización de estos agentes.

A través del tiempo tipologías patogénicas y caracteres morfológicos como, la forma y tamaño de las estructuras de reproducción, temperaturas óptimas, condiciones de almacenamiento, tasas de crecimiento, características culturales y químicas han sido tomados como referencia para la caracterización e identificación taxonómica de las diferentes especies de microorganismos causantes de enfermedades en cultivos. Sin embargo, se ha demostrado que estas características en la mayoría de los casos son fácilmente influenciadas por el tipo de hospedero, ambiente o condiciones de almacenamiento, y que además, puede encontrarse una alta sobre-posición de estas características entre especies del mismo género, evidenciando su poca confiabilidad en procesos de identificación de especies (Black y Dehgan, 1993; Freeman 1998; Hunter *et al.*, 2006; White *et al.*, 2006; Vandamme *et al.*, 2010; Cai *et al.*, 2009; Crous *et al.*, 2015).

Conforme a esto, diferentes técnicas moleculares tales como: RAPDs (Amplificación Aleatoria de ADN polimórfico), RFLPs (Polimorfismo de Longitud en fragmentos de Restricción), AFLPs (Polimorfismo de Longitud en Fragmentos Amplificados), “rep-PCR, CHEF electroforesis, SDS-PAGE y F-AFLP análisis (Vandamme *et al.*, 2010; Kaluzna *et al.*, 2014; Crous *et al.*, 2015), fueron desarrolladas y usadas con el objetivo de generar información objetiva y que pudiese determinar las diferencias genéticas intra-específicas dentro de grupos de especies. Como resultado se logró evidenciar que no todas las técnicas tenían el mismo alcance al momento de identificar organismos dentro de

Resultados

complejos de especies y que su capacidad para generar información varía entre géneros. Finalmente, y a través de diferentes estudios se llegó a la conclusión que el reconocimiento filogenético de especies a través de la técnica MLST (Tipificación Multilocus de Secuencias) era la que mejor determina las relaciones y límites entre especies (Vandamme *et al.*, 2010; Kaluzna *et al.*, 2014; Crous *et al.*, 2015).

Con base en lo anterior y buscando obtener resultados taxonómicos detallados, este estudio se realizó con el objetivo de generar un primer reporte de los microorganismos asociados a hojas y frutos de piñuela, a través de un abordaje polifásico, integrando caracteres morfológicos en el caso de hongos y bioquímicos en el caso de las bacterias, con estudios filogenéticos basados en secuenciamiento multi-locus (Freeman *et al.*, 1988; Leslie y Summerell, 2006; Vandamme *et al.*, 2010; Kaluzna *et al.*, 2014; Crous *et al.*, 2015).

2. REVISIÓN

Conformada por 58 géneros y 3172 especies aproximadamente (Luther 2008), la familia Bromeliaceae es una de las más diversas en especies dentro de la clase Liliopsida. Sus diferentes adaptaciones biológicas como: plantas perennes, monocárpicas, de metabolismo CAM, C3/CAM o C3, algunas xerofíticas de hábito terrestre, Saxícolas(desarrollándose sobre piedras) o epífitas (aferrándose a forófitos por medio de raíces poco desarrolladas que funcionan como anclas), y características morfológicas como sus espinas marginales y tricomas (Black y Dehgan, 1993; Herb Plever 2013; Orellana *et al.*, 2004; MSBG, 2015), han jugado un papel importante en la radiación adaptativa de ésta familia, favoreciendo su dispersión en ambientes con amplios rangos de altitudes, temperaturas y humedades, además de la ocupación de diferentes nichos dentro de las zonas neo-tropicales de América encontradas desde el norte de Argentina hasta el sur

Resultados

de los EUA entre los 0 y 4200 m.s.n.m. Contrario a esto, la única especie no endémica del continente Americano y registrada en el continente Africano es *Pitcairnia Felicianae* (Romero *et al.*, 2001; Acebey *et al.*, 2006; Miranda *et al.*, 2007; Santoro y Betancur, 2008; Zanella *et al.*, 2012; Alvarado *et al.*, 2013; González *et al.*, 2013; Louzada *et al.*, 2014).

Su amplia diversidad en especies, morfología, y hábitos de crecimiento le han permitido a este grupo de especies desarrollar diversos roles ecológicos en la preservación y diversificación de especies. Gran parte de las especies pertenecientes a esta familia desarrollan hojas en forma de roseta o espiral que forman depósitos basales en los que se almacena agua y desechos orgánicos, propiciando así, la ocurrencia de microambientes en los que sobreviven organismos como: arácnidos, crustáceos y pequeños anfibios, además, algunos polinizadores desarrollan parte de su ciclo de vida. sus vistosas inflorescencias bracteales generalmente son polinizadas y dispersadas por el viento, aves, mamíferos, insectos y murciélagos en su intención de alimentarse, otras como: *Tillandsia bulbosa* son denominadas mirmecofilas, debido a las relaciones simbióticas que desarrollan con algunas especies de hormigas (Black y Dehgan, 1993; Orellana *et al.*, 2004; Miranda *et al.*, 2007; Ramírez, 2010; Salvatierra *et al.*, 2012; Zanella *et al.*, 2012; Alvarado *et al.*, 2013; Silvestro *et al.*, 2013; MSBG, 2015).

Por otra parte, desempeñan un papel importante dentro de la cultura de algunas comunidades indígenas y campesinas en diferentes regiones de Latino-américa. (Hornung, 2012) resalta la importancia del uso de las Bromelias como fuente de alimento, un conocimiento ancestral, para diferentes comunidades en 10 países de Latinoamérica. En su trabajo describe el uso de 24 especies de Bromelias, de las cuales el 68.4% se usan con un solo fin, el 23% tiene doble propósito y *Bromelia pinguin* es usada de tres formas diferentes, predominando entre estos, su uso como verduras seguido por el consumo como fruto fresco y en bebidas. Adicional a esto, otras especies como *Aechmea magdalenae* A., son usadas como fuente de fibra o como plantas medicinales en el caso de *Tillandsia usneoides* L., pero es la ornamentación, debido a la diversidad de colores

Resultados

y tamaños que presentan sus inflorescencias, el uso predominante para esta familia de plantas (Miranda *et al.*, 2007; Silvestro *et al.*, 2013).

En Colombia se encuentran registrados 25 géneros y 543 especies, pertenecientes a la familia *Bromeliaceae* (Betancur, 2015); de estas, la mayoría son cultivadas con fines ornamentales, debido a los diferentes colores y formas que presentan sus brácteas e inflorescencias (Black y Dehgan, 1993; Orellana *et al.*, 2004; Miranda *et al.*, 2007), y en menor proporción como fuente de fibra, medicina o como alimento, siendo consumidas en estado de plántula o sus frutos.

Inicialmente y a través de un abordaje morfológico en el que fueron caracterizadas estructuras como: hojas, frutos y semillas, la familia *Bromeliaceae* había sido dividida en tres (3) sub-familias: *Pitcairnioideae*, *Tillandsioideae* y *Bromelioideae* (Black y Dehgan, 1993; Orellana *et al.*, 2004; Miranda *et al.*, 2007; Proença y Sajo 2007; Santoro y Betancur, 2008; Herb Plever, 2013; MSBG, 2015); Más adelante, mediante sistemática y estudios basados en secuenciación de DNA del gen del cloroplasto *ndhf* revelaron que la sub-familia *Pitcairnioideae* era un grupo polifilético, conformado por 6 sub-familias, y se confirmó que las sub-familias *Tillandsioideae* y *Bromelioideae* son grupos monofiléticos, de este modo, se validó la existencia de ocho sub-familias dentro de la familia *Bromeliaceae*: *Brochinioideae*, *Lindmanioideae*, *Hechtioideae*, *Navioideae*, *Pitcairnioideae*, *Puyoideae*, *Tillandsioideae* y *Bromelioideae* (Terry y Brown, 1996; Givinish *et al.*, 2007; Herb Plever, 2013; González *et al.*, 2013; Silvestro *et al.*, 2013; Louzada *et al.*, 2014; BSI, 2015).

Descripción de las sub-familias *Brochinioideae*, *Lindmanioideae*, *Navioideae*, *Pitcairnioideae*, *Puyoideae* según (Givinish *et al.*, 2007), y *Tillandsioideae* y *Bromelioideae* según (Black y Dehgan, 1993).

Brochinioideae: Frutos capsulares, semillas bicaudales apenduladas; pétalos en espiral, regulares, libres; sépalos cocleares; ovario en parte a la totalidad ínfero;

Resultados

inflorescencia paniculada o capitada; hojas enteras, casi siempre con clorénquima estrellada.

Lindmanioideae: Frutos capsulares; semillas bicaudales apenduladas; anteras sub-basifijas a equitantes, rectas, corpulentas; sépalos convolutos; pétalos desnudos; estigmas erectos, rectos; flores pediceladas; hojas enteras o dentadas; ausencia de clorénquima estrellada.

Hechtioideae: Frutos capsulares; semillas aladas o casi desnudas; flores dioicas; hojas suculentas, espinosas o raramente enteras; ausencia de clorénquima estrellada.

Navioideae: Frutos capsulares; semillas aladas o desnudas; pétalos en espiral y sépalos cocleares; clorénquima estrellada ausente; tejido de almacenamiento de agua solamente periférico, tricomas irregularmente dispuestos con poca superposición, epidermis lisa, esclerénquima hipodérmico ausente; hojas enteras, espinosas, pero no suculentas; inflorescencia paniculada a capitada.

Pitcairnioideae: Frutos capsulares; semillas aladas; pétalos en forma de lanza libres después de la antesis o ligeramente enrollados; pétalos grandes, conspicuos o en espiral, sépalos imbricados y anteras basifijas, dentro de esta subfamilia podemos encontrar géneros como: *Abromeitiella*, *Deuterocohnia*, *Dyckia*, *encholirium*, *fosterella*, *Pitcairnia*.

Puyoideae: Frutos capsulares; semillas circunferencialmente aladas; pétalos en forma de lanza apretadamente en espiral después de la antesis, sépalos convolutos (Givinish *et al.*, 2007).

Tillandsioideae: Dentro de esta familia podemos encontrar los géneros: *Catopsis*, *Glomeropitcairnia*, *Guzmania*, *Mezobromelia*, *Tillandsia*, *Vriesea*. Plantas epífitas, desprovistas de espinas en sus márgenes foliares, desarrollan flores con ovarios

Resultados

súperos en su gran mayoría y frutos en forma de cápsula que contienen semillas plumosas.

Bromelioideae: Plantas con desarrollo terrestre, sus márgenes foliares están provistos de espinas en su gran mayoría, a diferencia de los otros géneros, éstas, desarrollan flores con ovario ínfero y frutos en forma de baya. Dentro de esta subfamilia encontramos géneros como: *Acanthostachys*, *Aechmea*, *Ananas*, *Andreana*, *Androlepis*, *Araecoccus*, *Billbergia*, *Bromelia*, *Canistrum*, *Cryptanthus*, *Fascicularia*, *Fernsua*, *Gravisia*, *Greigia*, *Hohenbergia*, *Hohenbergiopsis*, *Neoglaziovia*, *Neoregelia*, *Nidularium*, *Ochagavia*, *Orthophytum*, *Porlea*, *Pseudoananas*, *Quesnelia*, *Ronnbergia*, *Streptocalyx*, *Wittrockia* (Black y Dehgan, 1993).

2.1. LA PIÑUELA *Bromelia karatas* L.

De acuerdo con lo anterior, *Bromelia karatas* L. también llamada, *B. karatas plumieri* D.J. Morren es una de las especies pertenecientes a la sub-familia Bromelioideae, nativa del bosque seco-tropical, perenne, monocárpica, de hábito terrestre y metabolismo CAM; entre sus características morfológicas resaltan la ausencia de escapo y sus hojas espinosas de aproximadamente 2 m de longitud dispuestas de manera arrosetada. A través del tiempo, esta especie ha sido usada principalmente por comunidades campesinas e indígenas en la construcción de cercos vivos, como planta medicinal, en la recuperación de suelos erosionados, la corrección de cárcavas y la formación de barreras vivas contra incendios en ambientes enjutos (Orellana *et al.*, 2004; Acebey *et al* 2006; Miranda *et al* 2007; Zanella *et al.*, 2012).

Resultados

Entre sus inherentes características, sobresale la alta producción de frutos comestibles, que se destacan por su alta acumulación de elementos proteínicos y antioxidantes, además de sus magnas características organolépticas que lo catalogan como un producto con gran potencial agronómico, agroindustrial y de exportación (Orellana *et al.*, 2004; Acebey *et al* 2006; Miranda *et al* 2007; Zanella *et al.*, 2012).Paradójicamente, en Colombia la piñuela es una especie poco conocida, amenazada y sub-utilizada; la constante expansión de la frontera agrícola y el aumento en la introducción y utilización de materiales modernos en su reemplazo, como el alambre de púa, han propiciado el detrimento de su población y de conocimientos heredados. Por otra parte, la falta de estudios relevantes encaminados hacia la preservación y áreas de desarrollo agronómico, como la etiología de sus enfermedades, limitan el pleno aprovechamiento de este cultivo (Orellana *et al.*, 2004; Alvarado *et al.*, 2013).

2.2. TAXONOMÍA DE LA ESPECIE (*Bromelia karatas* L.)

Teniendo en cuenta los siguientes autores (Orellana *et al.*, 2004; Acevedo y Strong, 2012; Butcher y Gouda, 2016; Naturalista, 2017; NCBI, 2017), la clasificación taxonómica de *B. karatas* se presenta en el (Cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de la especie.

Dominio:	Eucariota
Reino:	Plantas
Super-división	Spermatophyta.
División:	Magnoliophyta.
Clase:	Liliopsida - Monocotiledoneas
Orden:	Poales
Familia:	<i>Bromeliaceae</i>
Género:	<i>Bromelia</i>
Especie:	<i>karatas</i>

2.3. ESTUDIOS DIRIGIDOS A *Bromelia karatas* L.

Teniendo en cuenta que *B. karatas* es una especie promisoría son pocos los estudios dirigidos a esta especie. Autores como: (Orellana *et al.*, 2004), destacan el uso de *B. karatas* L., en el oriente de Guatemala, como una herramienta agroecológica, implementada en terrenos con pendiente para el control de la erosión y corrección de cárcavas, así como también, el uso de sus frutos e hijuelos tiernos como parte de su cultura gastronómica.

(Parada *et al.*, 1996), presentan por primera vez el aislamiento de Antranilato 1- θ - β -D-glucopyranosyl, elemento precursor del ácido Antranílico un componente clave en la producción de alcaloides y antibióticos, a través de diferentes técnicas de cromatografía

Resultados

e ionización por electro-pulverización de extractos glicosídicos obtenidos de frutos de piñuela.

(Moyano *et al.*, 2014), reportan a través de estudios bromatológicos, fitoquímicos y funcionalidad antioxidante frente al anión superóxido, altos porcentajes de elementos proteínicos en frutos fisiológicamente inmaduros, así como también, la abundante presencia de elementos fenólicos en los frutos maduros, tales como: flavonoides, fenilpropanoides, terpenos y cumarinas; cuya característica principal es su actividad antioxidante.

Consecuente con lo anterior, al presente, no se encuentran reportes de enfermedades o microorganismos asociados al cultivo de la piñuela. *Ananas comosus* L. también conocida como piña, es quizá una de las especies de la sub-familia Bromeliodes, usadas como fuente de alimento, más estudiadas y cultivadas hasta el momento. Según (FAOSTAT, 2014), a nivel mundial la producción en 2014 fue de 25'439.366 ton., siendo Asia el principal productor con un aporte del 43,9%, América 37,5%, África 18,1 y Oceanía 0,5%, entre los cuales, los 5 países más productores son: Costa Rica 2'915.628 ton, Brasil 2'646.243 ton, Philipinas 2'507.098 ton, Tailandia 1'914.830 ton e Indonesia 1'641.530 ton., en Colombia la producción de piña reportada para el año 2014 fue de 652.759 ton.

2.4. ENFERMEDADES EN BROMELIAS DE INPORTANCIA ECONÓMICA

Ananas comosus L. Y *Aechmea fasciata* B.

En general, las especies de Bromelias se caracterizan por su baja incidencia de plagas y enfermedades. Como se mencionó anteriormente *Ananas comosus* L., es quizá una de las especies de Bromelias más estudiadas y comercializadas hasta momento, y debido a su importancia económica se ha logrado encaminar estudios en la identificación de microorganismos que limitan su producción; Algunas de estas investigaciones reportan

Resultados

los siguientes microorganismos como los principales limitantes del cultivo: “Heart and root rot (*Phytophthora cinnamomi*), Heart rot (*P. parasitica*), Root rot (*Pythium spp.*), Black rot (*Ceratocystis paradoxa*), Butt rot (*Thielaviopsis paradoxa*), Fruitlet core rot (*Penicillium funiculosum*, *Fusarium moniforme* var. *subglutinans*), Pink disease of fruit (*Acetomonas spp.*), Pineapple wilt (probable virus), Yellow spot virus (tomato spotted wilt virus), Bacterial diseases (*Erwinia carotovora*, *E. chrysanthemi*)” (Bartholomew *et al.*, 2012), y los Oomycetos *Phytophthora cinnamomi*, *P. parasítica* y *Phytium spp.*, catalogados como los de mayor importancia, debido a su facilidad de dispersión y severidad de las lesiones (Green and Nelson, 2015; Segura, 2015).

Por otra parte, el género *Aechmea sp.*, es también uno de los grupos de Bromelias ornamentales más populares y comercialmente importantes entre la familia Bromeliaceae. Algunos estudios dirigidos a la identificación de sus principales limitantes reportan: Damping off ocasionado por *Fusarium moniliforme*, *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora spp.*, Antracnosis por *Colletotrichum spp.*, Mancha de la hoja por *Erwinia carotovora subsp. Carotovora*. Mancha de la hoja por *Bipolaris oryzae* y Mancha de la hoja por *Pythium aphanidermatum* o por *Helminthosporium rostratum* (Marlatt, 1980; APS 1988; Jones and Murashige 1997; Kerruish, 1997; Rongyi *et al.*, 2003; Sanahuja y Palmateer 2016); Adicional a esto, existen otros tipos de enfermedades de importancia económica entre las Bromelias. Según (Stoner, 1973) en su publicación “*The Variegation Problem*” la presencia de coloraciones anormales en hojas de Bromelias pueden ser por causa de virus, algunos de estos son el virus del borde amarillo de las fresas, el virus TMD en orquídeas, el virus del mosaico en tomate y de la vid.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar morfológica, molecular y bioquímicamente de los diferentes aislamientos fúngicos y bacterianos asociados al tejido de hojas y frutos de piñuela *Bromelia karatas* L., colectados en la zona de El Patía y Mercaderes, Municipios pertenecientes al departamento del Cauca.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar morfológicamente los aislamientos fúngicos obtenidos a partir de tejido foliar y frutos de piñuelas *B. karatas* L. colectados en la zona de El Patía y Mercaderes, Municipios pertenecientes al departamento del Cauca.
- Caracterizar morfológica, cultural y bioquímicamente los aislamientos bacterianos obtenidos a partir de tejido foliar y frutos de piñuelas *B. karatas* L. colectados en la zona de El Patía y Mercaderes, Municipios pertenecientes al departamento del Cauca.
- Identificar molecularmente los aislamientos fúngicos y bacterianos obtenidos a partir de foliar y frutos de piñuelas *B. karatas* L. . colectados en la zona de El Patía y Mercaderes, Municipios pertenecientes al departamento del Cauca.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. TOMA DE MUESTRAS

Para este proceso se realizaron 3 muestreos de manera completamente al azar, en los que se tomaron hojas y frutos que presentaban algún tipo de afectación relacionada a agentes bióticos; una vez colectadas las muestras, fueron rotuladas con el nombre del sitio donde se colectó, luego fueron envueltas en papel periódico y empacadas en bolsas plásticas. Ya en el laboratorio las muestras (hojas y frutos) fueron agrupadas por localidad y tipo de síntoma como forma, color y ubicación sobre el tejido.

las localidades en las que se realizaron los muestreos fueron: Pioresnada, El Limón, Tío Marcos, La Vega y Salado Pinguin, veredas pertenecientes al municipio de Mercaderes y (Muestra1 y Galindes) veredas ubicadas en el municipio de El Patía Cauca. Estos ecosistemas son caracterizados como bosque-seco tropical de Temperatura promedio anual de 26 C° y un promedio anual de lluvias entre 500 y 1000 mm.

El Patía (Latitud Norte de 02° 06' 56" y Longitud Oeste: 76° 59' 21"), con una extensión de 784 K², se localiza en el suroccidente del departamento del Cauca; entre los 550 y 3000 m.s.n.m, presenta una T° media de: 30 – 32 °C. Corregimientos: Patia, La Florida, Méndez, El Estrecho, Galindez, El Puro, Angulo, Las Tallas. (PDMP 2012)

El municipio de Mercaderes está situado al sur-occidente del departamento del Cauca a una altitud de 1167 m.s.n.m. y Temperatura promedio de 20 C°. Con una extensión de 641.09 K², está conformado por los corregimientos: Arboleda, El Carbonero, San Juanito, Mojarras, San Joaquín, Esmeraldas, Cajamarca y un Corregimiento Especial: localizado en el centro del Municipio y está conformado por las veredas, Marquillos, Quindiqui, Los Guácimos, Canto Llano, Pacho Arbolito, Casa Fría, Adorotes, Llano San Antonio, Carbonero, Turquía, La playa, Arrayanales, Potrerito, Cañaveral (PDMM, ca 2012).

4.2. AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN DE COLONIAS Y CONSERVACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS.

Una vez seleccionadas y agrupadas las diferentes muestras fueron procesadas de la siguiente manera; con ayuda de tijeras y bisturí fueron cortados pequeños cuadros de material (hojas y frutos) con 50% de área afectada aproximadamente, seguido a esto, los trozos fueron sumergidos en soluciones de alcohol al 70%, hipoclorito de sodio 1% y agua destilada esterilizada, durante 1 min en las tres soluciones respectivamente, repitiendo tres veces el lavado final. La siembra de los trozos des-infestados se efectuó sobre medio PDA (Papa-dextrosa-Agar) y AN (Agar-Nutriente) (Cuadro 2). contenido en cajas Petri, 8 días después de incubación a temperatura ambiente, los microorganismos obtenidos se repicaron a nuevas cajas Petri con PDA y AN, con el fin de obtener CP (cultivos puros); una vez obtenido el cultivo puro se procedió a realizar el cultivo monospórico.

Para la obtención de CM (cultivos monospóricos) se preparó una dilución de esporas o micelio para las colonias con micelio Sterilia de cada CP, a partir de este se tomó 100 µl de dilución y se esparcieron sobre AA (Agar-Agua) (Cuadro 2) contenido en cajas Petri. 24 h. después y con la ayuda de un microscopio, se localizaron los conidios germinados, se retiraron del medio y se trasladaron a nuevas cajas Petri con medio PDA. Para la purificación de colonias bacterianas, se realizaron siembras por agotamiento sobre medio AN, contenido en cajas Petri, con el fin de garantizar la pureza de las colonias.

Los métodos utilizados para el almacenamiento y conservación de los microorganismos purificados fueron: el método Castellani a 4 °C, papel filtro colonizado y almacenado a -80, Crio-preservación en glicerol al 25% para hongos y crio-preservación en glicerol al 25% para bacterias a -80.

Resultados

Cuadro 2. Medios utilizados en la caracterización de aislamientos fúngicos y bacterianos (Leslie y Summerell, 2006).

Spezieller Nährstoffarmer Agar		Carnation Leaf-Piece Agar (CLA).	
KH ₂ PO ₄ 1 g	1 g.	Cortes de hojas 5 mm ² de	6/caja
KNO ₃	1 g.	Water Agar	20 g.
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.5	H ₂ OD	1 L.
KCl	0.5		
Glucose	0.2	Difco-Nutrient Agar	3 g.
Sucrose	0.2	Extracto de carne	5 g.
Agar	20 g.	Peptona	15 g.
H ₂ OD	1 L.	Agar	1 L.
		H ₂ OD	
Water Agar (WA).			
Agar	20	Malt Extract Agar (Scharlau)	13 g.
H ₂ OD	1 L.	Extracto de malta	2.5 g.
		Dextrina	5 g.
Difco-Potato Dextrose Agar	20 g.	Gelatin peptone	15 g.
Dextrosa	15 g.	Agar	1 L.
Agar	4 g.	H ₂ OD	
Almidón de papa	1 L.		
H ₂ OD			
Mezclar bien y Autoclavar los medios a 121°C por 15 min.			

4.3. IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS FUNGICOS

4.3.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS

La identificación morfológica de los diferentes aislamientos fúngicos se realizó en los laboratorios de Diagnóstico Vegetal y Microscopia de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira; para este objetivo, los diferentes microorganismos obtenidos

Resultados

fueron crecidos en medios de cultivo específicos como: (MEA, CLA y SNA+ papel filtro) (cuadro 2), para inducir el desarrollo de estructuras fundamentales en la caracterización morfológica, posteriormente estas estructuras fueron montadas sobre placas de vidrio con ácido láctico al 80% y observadas bajo un microscopio de contraste de fases. Una vez montadas las placas se procedió a identificar y caracterizar los diferentes microorganismos con la ayuda de claves taxonómicas y diferentes artículos de estudio taxonómico de hongos.

4.3.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE HONGOS: EXTRACCIÓN DE DNA DE HONGOS.

La extracción de DNA genómico total se realizó en el laboratorio de Diagnóstico Vegetal de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. Para este procedimiento los diferentes microorganismos fueron crecidos durante 7 días sobre medio PDA con fotoperiodo de 12 h. y en medio extracto de malta (MEA) con oscuridad total con el fin de promover la producción de micelio y limitar la esporulación. Posteriormente, se extrajo el micelio de cada colonia, se introdujo en tubos Eppendorf de 1,5 ml. y se realizó la extracción de DNA a través del método CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) implementado por (Rogeiro, 2015).

El DNA total producto de la extracción fue visualizado y estimado mediante la comparación de bandas con el marcador Lambda (λ) de 1000 bp., a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1% ha 50w/50min.

Resultados

4.3.3. AMPLIFICACIÓN DE DNA DE HONGOS POR PCR (Reacting chain polymerase).

La amplificación y multiplicación de secuencias de DNA se llevó a cabo en los laboratorios de Diagnóstico Vegetal y Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira; La reacción fue desarrollada en un termociclador MultiGene OptiMix (Labnet) en el que fueron amplificadas las región Espaciadora del transcrito interno (ITS) del gen 5.8S rDNA, la proteína estructural β -tubulina y el Factor de Elongación (tef) a través de los pares de oligonucleótidos presentados en la (Tabla 1), el kit Master Mix (PROMEGA) y las condiciones de temperatura presentadas en la (Tabla 2); finalmente los productos PCR fueron observados mediante electroforesis a 50w/70min., sobre un gel de agarosa al 1.6% y su peso molecular fue calculado mediante la comparación de bandas con el marcador Hyper Lader (HL) de 100bp.

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para la amplificación de la región Internal transcript spacer ITS, el gen para β -tubulina y el Factor de elongación TEF1 en la reacción PCR.

Locus	Condiciones	Dirección	Secuencia (5'-3')	Referencia
Espaciador transcrito interno	ITS1	Forward	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	(White et al. 1990)
	ITS4	Reverse	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	(White et al. 1990)
Beta-tubulin	Bt2a	Forward	GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC	Glass and Donaldson 1995
	Bt2b	Reverse	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC	Glass and Donaldson 1995
Factor de Elongación	Ef1	Forward	ATG GGT AAG GAG GAC AAG AC	O'Donnell et al., 1998.
	Ef2	Reverse	GGA AGT ACC AGT GAT CAT GTT	O'Donnell et al., 1998.

Resultados

Tabla 2. Condiciones de (PCR) para los oligonucleótidos ITS, BT2 y TEF1.

Genes	Denaturación Inicial	Ciclo	Denaturación	Hibridación	Elongación	Elongación final
ITS	94°C, 5min.	40c	94 °C, 30 s.	57 °C, 60 s.	72 °C, 30 s.	72 °C, 5 min.
Bt2	94°C, 5min.	40c	94 °C, 30 s.	59 °C, 60 s.	72 °C, 30 s.	72 °C, 5 min.
TEF1	94°C, 5min	40c	94 °C, 30 s.	47 °C, 60 s.	72 °C, 30 s.	72 °C, 5 min

4.4. IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS.

4.4.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, CULTURAL Y BIOQUÍMICA DE BACTERIAS.

Para la caracterización morfológica de las colonias bacterianas se recurrió al método de tinción de Gram, crecimiento sobre el medio AN contenido en cajas Petri e inclinado en tubos de ensayo, siguiendo las metodologías descritas en el Manual de Microbiología Conceptos y Práctica de Microbiología General (De Prager *et al.*, 2001; Triviño, 2011) Adicional a esto, se realizó una tinción de endosporas y pruebas bioquímicas como: Prueba de catalasa, y Oxidasa.

Para complementar las pruebas bioquímicas y con el fin de caracterizar la actividad enzimática de los diferentes aislamientos se utilizó el sistema de identificación de tiras API 20E, usado principalmente para la identificación de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y bacilos gram negativos no fastidiosos. Este sistema está compuesto por 20 pruebas bioquímicas distribuidas en pequeños tubos que contiene medios deshidratados, una vez son inoculados con la suspensión bacteriana reaccionan

Resultados

y cambian su coloración. Adicional a esto, el sistema también presenta una base de datos en la que se pueden comparar e identificar las especies en estudio (BioMérieux 2002).

4.4.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS: EXTRACCIÓN DE DNA DE BACTERIAS.

La extracción de DNA genómico total se llevó a cabo en el laboratorio de Diagnóstico Vegetal de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. Para el desarrollo de este objetivo los aislamientos bacterianos fueron crecidos en 10 ml de caldo nutritivo contenido en tubos de ensayo durante 72 h. y agitación constante 100 rpm. Seguido a esto, se procedió a la obtención del pellet, a través de la centrifugación las suspensiones bacterianas y así iniciar la extracción de DNA total. Para la extracción se usó el protocolo desarrollado por (Rosa, 2008).

El DNA total producto de la extracción fue visualizado y estimado mediante la comparación de bandas con el marcador Lambda (λ) de 1000 bp., a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1% a 50w/50min.

4.4.3. AMPLIFICACION DEL DNA DE BACTERIAS.

La amplificación y multiplicación de secuencias de DNA extraído se llevó a cabo en los laboratorios de Diagnóstico Vegetal y Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. La reacción se desarrolló en un Termociclador MultiGene OptiMix (Labnet) en el que fueron amplificados los oligonucleótidos FD1 y RD1 del gen

Resultados

16S rDNA a través de los pares de nucleótidos descritos en la (Tabla 3), el kit Green Master mix (PROMEGA) y las condiciones de temperatura descritas en la (Tabla 4). Posteriormente, los productos PCR fueron observados mediante electroforesis a 50w/70min. sobre un gel de agarosa al 1.6% y su peso molecular fue calculado mediante la comparación de bandas con el marcador Hyper Lader (HL) 200bp.

Finalmente, los productos PCR o “amplicons” obtenidos de los aislamientos fúngicos y bacterianos fueron enviados y secuenciados por la compañía Macrogen, Corea.

Tabla 3. Oligonucleótidos para amplificación del gen 16S rDNA de los aislamientos bacterianos.

Locus	Condiciones	Dirección	Secuencia (5'-3')	Referencia
rDNA 16S	FD 1	Forward	CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGA TCCTGGCTCAG	(Weisburg <i>et al.</i> , 1991)
	RD 1	Reverse	CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTG ATCCAGCC	(Weisburg <i>et al.</i> , 1991)

Tabla 4. Condiciones de (PCR) para oligonucleótidos FD1 y RD1.

Gene	Denaturación Inicial	Ciclo	Denaturación	Hibridación	Elongación	Elongación final
16S rDNA	95°C, 5min.	30c	95 °C, 30 s.	57 °C, 30 s.	72 °C, 30 s.	72 °C, 5min

4.5. EDICIÓN DE SECUENCIAS DE DNA.

Una vez obtenidas las secuencias de los diferentes aislamientos se procedió a verificar su calidad a través del análisis de electroferogramas. Aquellas que presentaban baja

Resultados

calidad fueron nuevamente amplificadas y enviadas a Macrogen para ser secuenciadas. Posteriormente, los electroferogramas de las secuencias *forward* y *Reverse* se editaron en el programa Geneious R10 (Versión 10.0.9) (<http://www.geneious.com>, Kearse *et al.*, 2012) para aumentar su calidad.

Seguido a esto, se realizó la comparación de las secuencias con las depositadas en el banco de genes (Gen Bank) mediante el programa BLAST (Básic Local Aligment Sequence Tool) (Altschul *et al.*, 1990) verificando su porcentaje de similitud con las especies más cercanas arrojadas por el programa.

4.6. ANÁLISIS FILOGENÉTICO.

Las secuencias editadas fueron alineadas y agrupadas junto con las secuencias tipo de cada género y especie en el programa MEGA (Tamura *et al.*, 2013. seguido a esto, se realizaron los árboles filogenéticos con cada uno de las secuencias por separado a través el método Neighbor-joinin (NJ) en el programa MEGA (Tamura *et al.*, 2013. (datos mostrados solo para análisis de una sola secuencia).

Como complemento a estos resultados, se realizó un Análisis de inferencia Bayesiana en el programa Mr. Bayes v3.2.6 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003). Inicialmente, se seleccionó el modelo de sustitución de nucleótidos más apropiado para cada una de las secuencias, a través del modelo de selección Akaike Information Criterion (AIC) en el programa jModelTest 2.1.10 (Posada *et al.*, 2011). posteriormente, las secuencias editadas y alineadas en el programa MEGA fueron concatenadas mediante el programa FASconCAT V 1.0 (P. Kuck, 2009), para así, obtener un solo archivo con las secuencias unidas o concatenadas.

Resultados

Finalmente, se realizó la construcción del árbol filogenético a través de un Análisis de inferencia Bayesiana basado en el alineamiento multilocus en el programa Mr. Bayes v3.2.6 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003) usando el algoritmo MCMC (Markov Chain Monte Claro). El análisis que se realizó por duplicado estuvo conformado por (2) cadenas corridas en simultaneo con 1×10^7 generaciones, de las cuales, se eliminó el 25% y se tomaron muestras cada 1000 generaciones.

Los árboles filogenéticos resultado del (AIB) fueron editados en el programa Treegraph2 2.14.0-771 beta (Stöver y Müller, 2010).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. TOMA DE MUESTRAS.

Como resultado del procesamiento de las muestras se identificaron 5 síntomas, entre estos 3 en tejido foliar y dos en frutos. Los síntomas identificados son presentados y descritos a continuación:

Síntoma 1: Lesiones foliares alargadas coalescentes y paralelas a las venas foliares; Ubicados predominantemente hacia el centro de la hoja, los síntomas inicialmente aparecen como puntos color marrón oscuro rodeados por un halo clorótico, posteriormente pasando a castaño claro sobre el tejido muerto. Localidades donde se encontró el síntoma: Muestra1, Pioresnada, Limón, Salado pinguin.

Resultados

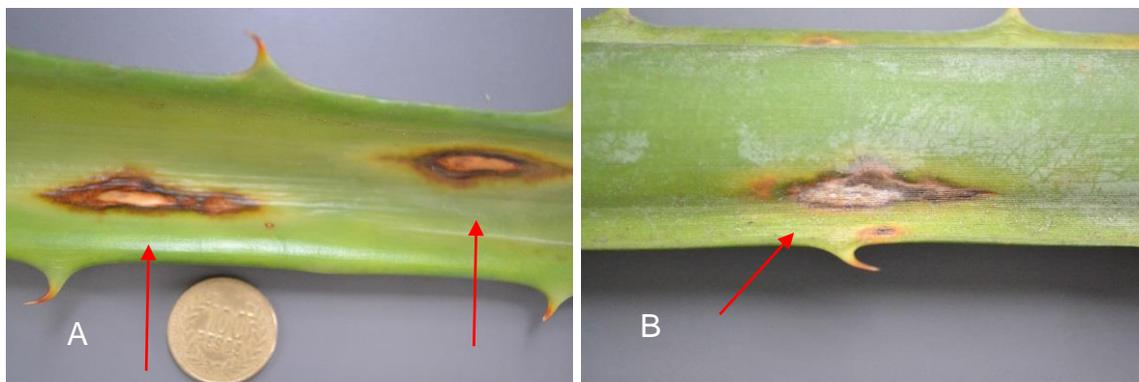


Figura 1. Síntoma 1, (A) Síntoma sobre el as, (B) síntoma sobre el envés de la hoja.

Síntoma 2: Lesiones foliares alargadas coalescentes y paralelas a las venas foliares; ubicados predominantemente hacia el borde y espinas de la hoja, los síntomas inicialmente aparecen como puntos color marrón oscuro rodeados por un halo clorótico, pasando más tarde a castaño claro sobre el tejido muerto. Localidades donde se encontró el síntoma: Pioresnada, Limón, Galindes, Salado pinguin, Tío Marcos, Vega, Broche.



Figura 2. Síntoma 2, (A) Síntoma sobre el as, (B) síntoma sobre el envés de la hoja.

Síntoma 3: Halos cloróticos de formas irregulares, distribuidos predominantemente hacia el centro de la hoja. Los síntomas inician con pequeños puntos cloróticos que coalescen formando halos de mayor tamaño. Localidades donde se encontró el síntoma: La Vega, Pioresnada, Salado pinguin.

Resultados

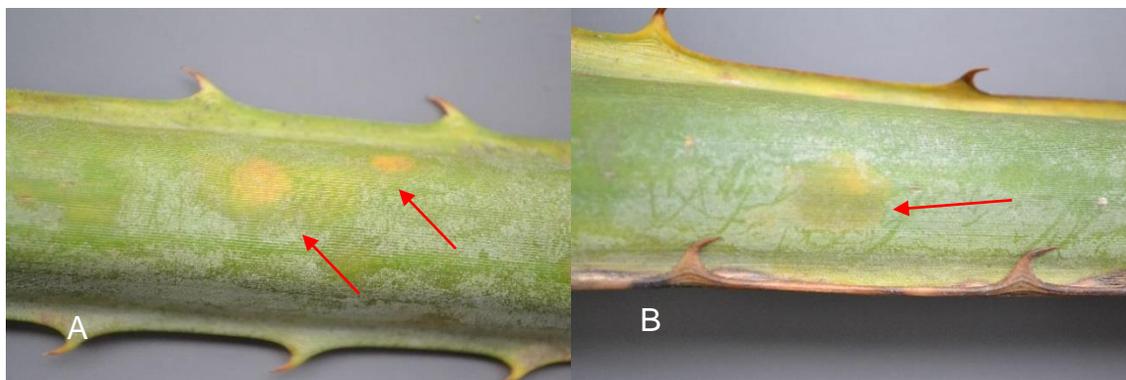


Figura 3. Síntomas 3, (A) Síntoma sobre el as, (B) síntoma sobre el envés de la hoja.

Síntoma 4: Lesiones necróticas semi-circulares y coalescentes, distribuidas en todo el fruto. Los síntomas inicialmente aparecen como pequeños puntos de color marrón oscuro posteriormente pasan a formar huecos de color castaño claro, por muerte y pérdida del tejido.



Figura 4. Síntoma 4, (A) Síntoma externo sobre fruto, (B) Síntomas interno sobre el fruto.

Síntoma 5: lesiones con forma de halos irregulares y coalescentes. Ubicadas predominantemente hacia los extremos longitudinales del fruto. Los síntomas inicialmente aparecen como pequeños puntos con apariencia de mancha de agua, posteriormente aumentan su tamaño, coalescen y forman halos de mayor tamaño.



Figura 5. Síntoma 5, **(A)** Síntoma externo sobre el fruto, **(B)** Síntoma interno sobre fruto.

5.2. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS FÚNGICOS.

Como resultado del aislamiento y purificación de microorganismos se obtuvo un total de 40 aislamientos fúngicos y 14 bacterianos (Tabla 5).

5.3. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS.

A partir de la caracterización morfológica de los 40 aislamientos fúngicos y siguiendo las metodologías de (Leslie and Summerell. 2006; Gaws *et al.*, 2007; Geiser *et al.*, 2007; Samson *et al.*, 2007, 2011, 2014; Dam *et al.*, 2012; Maharachchikumbura *et al.*, 2014; Visagie *et al.*, 2014), se identificaron (3) especies pertenecientes al género *Fusarium*, (2) al género *Aspergillus*, (1) a *Penicillium*, (1) a *Colletotrichum*, (1) a la familia *Amphisphaeriaceae* y (2) como micelio esterilia (W1 y Y).

Resultados

Tabla 5. Código de los aislamientos, área de muestreo y área afectada de la planta.

Área de Muestreo	Área afectada	Síntoma	Código fúngico	Código bacteriano	Área afectada	Síntoma	Código fúngico	Código bacteriano
Muestra (1)		S1	H	7	Fruto cascara	1	4P	10
		S1	H1			2		
		S2	Q			3		
Pioresnada (1)		A	C	6		4	5P	11
		A	AA			5		
Pioresnada (3)		S1	S	8	Fruto pulpa	1	2C	13
		S2	L			2		
		S3	K			3		
Limón (2)		S3	R	9		4	4C	14
		S3	R			5		
		S3	R			5		
Tío Marcos	Follaje	S1	A	3				
		S1	A1					
		S1	B					
		S2	G					
		S2	W					
		S2	W1					
Vega	Follaje	TMS1	E	2				
		TMS1	M					
		TMS1	N					
		TMS1	Y					
		TMS2	F					
		TMS2	O					
Muestra (3)		S1	V	4				
		S2	V					
Salado pinguin		P	PP					
		P	PP1					
		P	PP3					
		P	PP4					
Salado pinguin		S1	I					
		S1	T					
		S1	U					
		S2	J					
		S2	J1					
		S2	J2					
		S2	P					
		S3	X					
		S3	X1					

Correlacionando los síntomas y los aislamientos se encontró que para el síntoma 1 los aislamientos presentes eran R, F y W1; para el síntoma 2: U, T, PP1, F y M, para el síntoma 3: J2, R y f, para el síntoma 4 y 5 el aislamiento 4P.

Resultados

5.3.1. Caracterización morfológica del aislamiento T:

Fusarium spp., Caracterización en medio CLA, células conidiogénicas monofialídicas y polifialídicas, macroconidio de 4 septos con el lado dorsal más curvado que el ventral, ápice en forma de gancho, Pie o base del conidio con muescas, $\pm 3 24,2 \mu\text{m}$ de longitud; poca producción de micro-conidios con forma ovalada, con ausencia de Clamidosporas. Coloración de la colonia blanca en medio PDA (figura 6) (Leslie and Summerell. 2006).

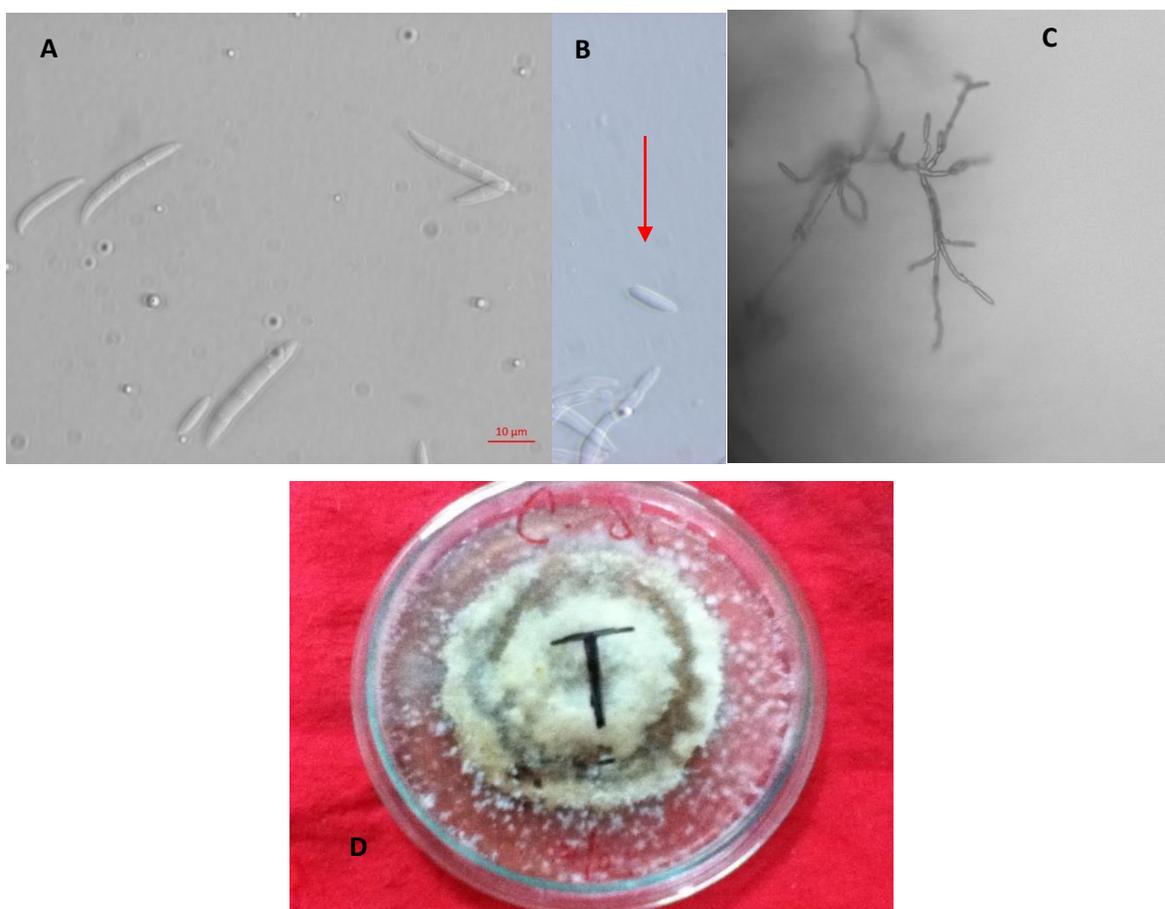


Figura 6. Caracterización morfológica aislamiento T, (A) Macroconidios, (B) Microconidios, (C) Monofialides y Macro-conidio, (D) Cultivo em PDA. Escala bar (A, B) 10 μm ., (C) 50 μm .

Resultados

5.3.2. Caracterización morfológica del aislamiento (4P, 2P):

Fusarium spp., caracterización en medio CLA., esporodoquios hialinos, células conidiogénicas monofialídicas, macroconidio de 4 septos, con el lado dorsal más curvado que el ventral, ápice embotado, Pie o base del conidio apenas con muescas, $\pm 325,7 \mu\text{m}$ de longitud; microconidio ovalado, reniformes, $\pm 1,6 \text{ } 11,7 \mu\text{m}$ de longitud, presenta clamidosporas. Coloración de la colonia en medio PDA blanca con parches anaranjados (figura 7) (Leslie and Summerell. 2006).

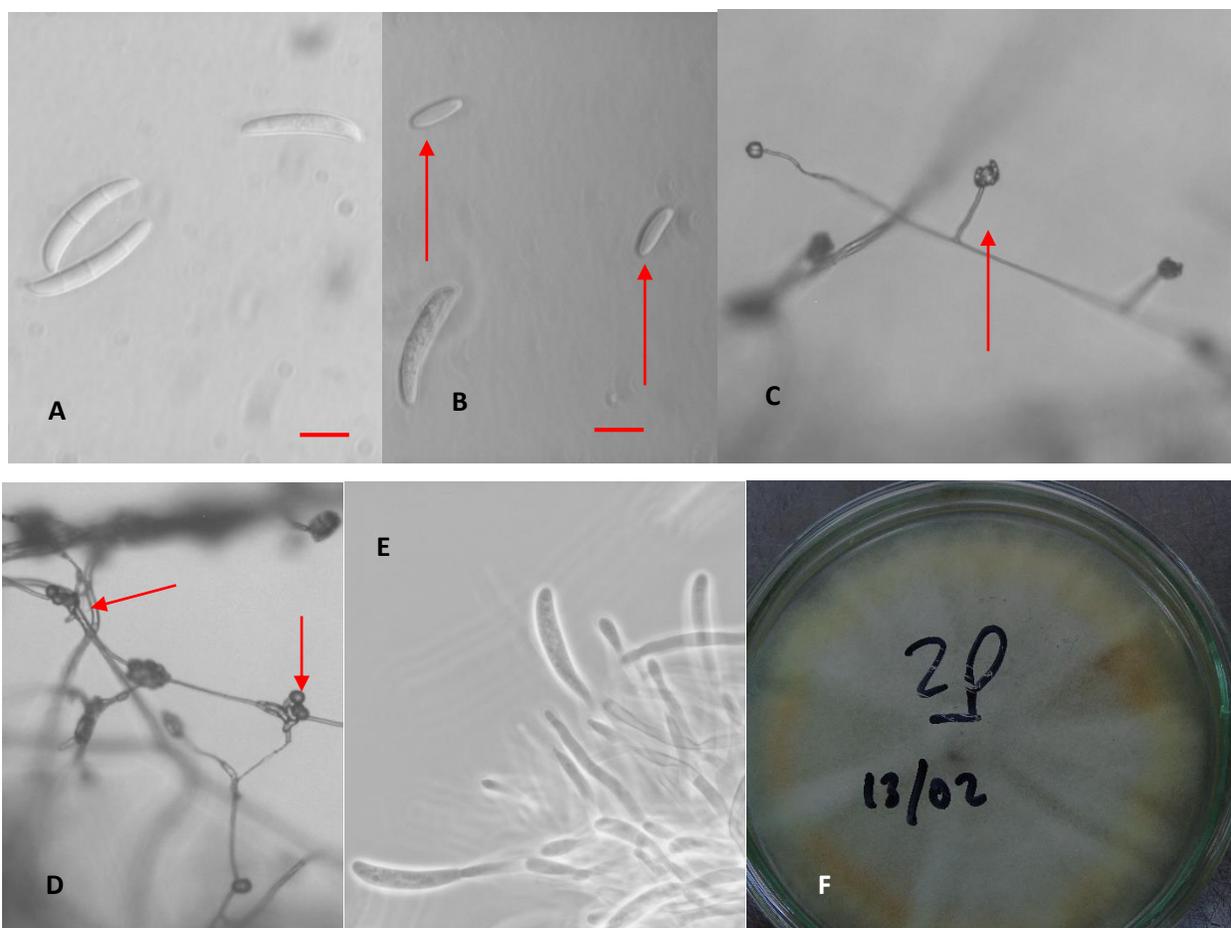


Figura 7. Caracterización morfológica aislamiento 4P y 2P, (A) Macroconidios, (B) Microconidios, (C) Monofialides y Micro-conidios en falsas cabezas, (D) Clamidosporas, (E) Esporodoquio, (F) Cultivo en medio PDA. Escala bar (A, B, E) $10 \mu\text{m}$., (C, D) $50 \mu\text{m}$.

Resultados

5.3.3. Caracterización morfológica del aislamiento PP1, X2

Fusarium spp., caracterización en medio CLA., esporodoquios hialinos, células conidiogénicas polifialídicas, macroconidio de 4 a 5 septos, alargado en forma de aguja, ápice en forma de gancho, Pie o base del conidio en forma de pie, $\pm 53 \mu\text{m}$ de longitud; micro-conidio ovalados, $\pm 2, 10 \mu\text{m}$ de longitud, presencia de clamidosporas, coloración de la colonia blanca en medio PDA (figura 8) (Leslie and Summerell. 2006).

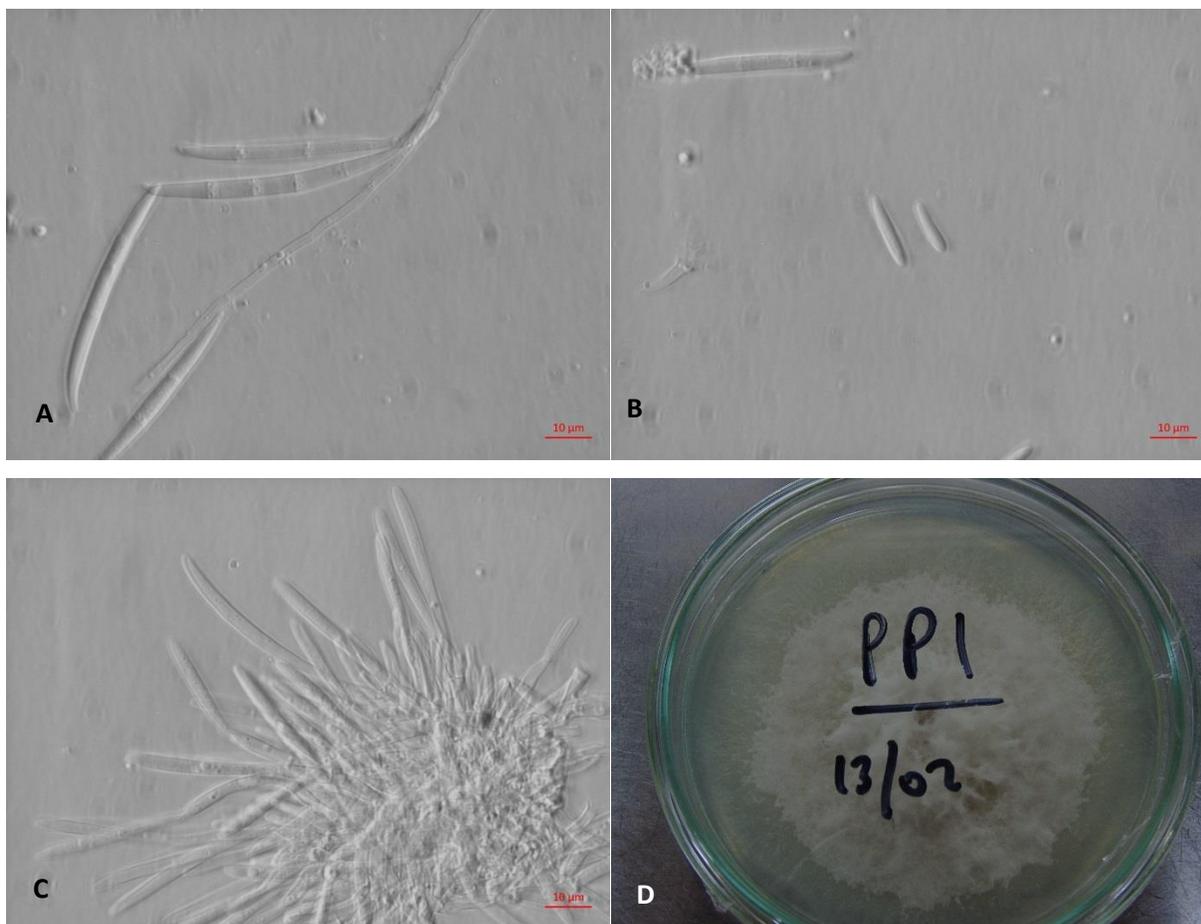


Figura 8. Caracterización morfológica aislamiento PP1 y X2, (A) Macroconidios, (B) Microconidios, (C) Esporodoquio, (D) Cultivo en medio PDA. Escala bar 10 μm .

Resultados

5.3.4. Caracterización morfológica del aislamiento U:

Neopestalotiopsis spp.. Características en medio SNA, conidiomatas en acérvulos, conidios fusiformes de 4 septos, ligeramente curvados, ± 4 24,6 μm de largo y $\pm 2,6$ 5,5 μm de Ancho, concolourous o marrón claro, apéndices (3) "Tricetulatae", filiformes, flexuosos, sin ramificaciones y no espatulados, originados en la cresta de la célula apical, apéndices basales (1), coloración de la colonia blanca en medio PDA (figura 9) (Maharachchikumbura *et al.*, 2014).

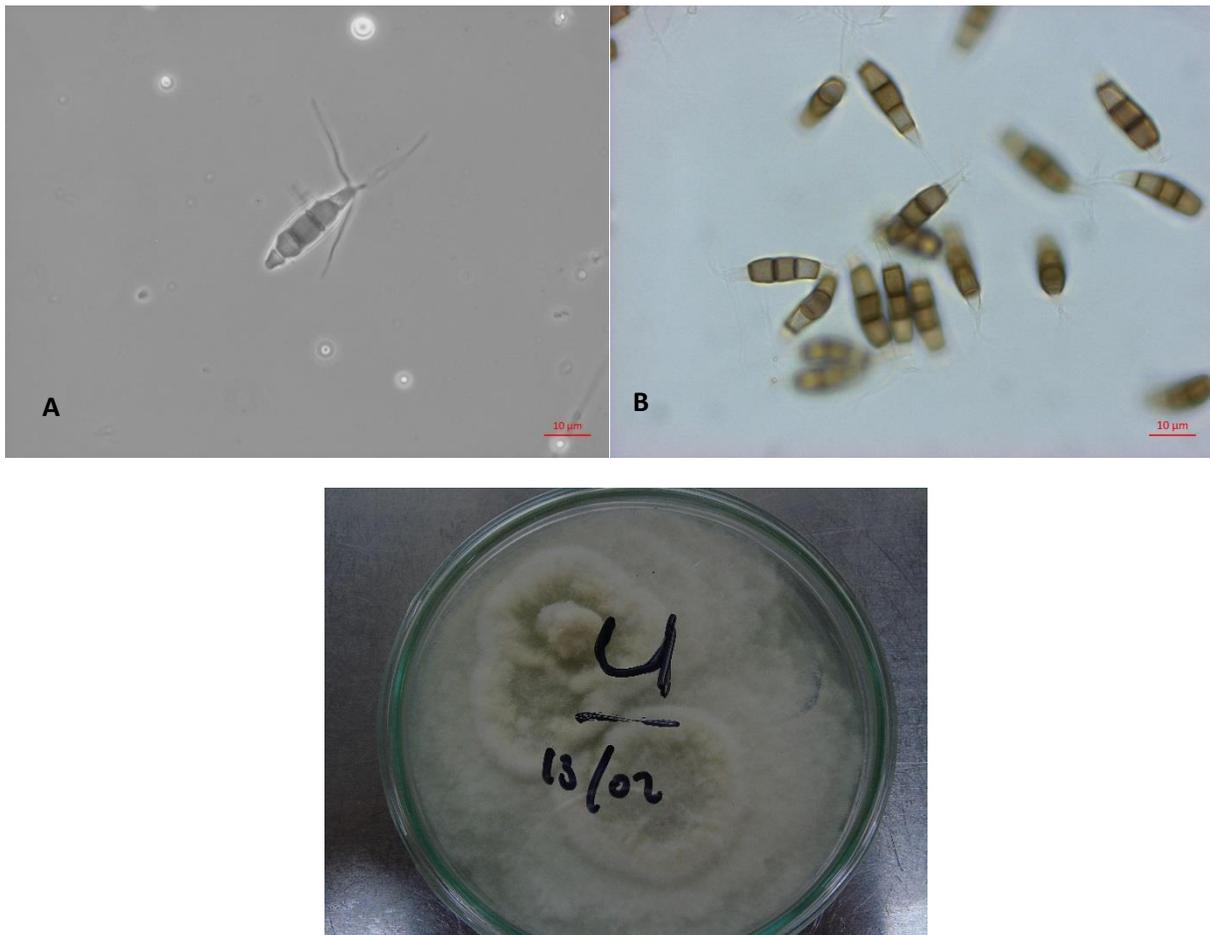


Figura 9. Caracterización morfológica aislamiento U, (A, B) Conidios, (C) Cultivo en medio PDA. Escala bar 10 μm .

Resultados

5.3.5. Caracterización morfológica del aislamiento J2, X1:

Colletotrichum spp., Características tomadas en medio SNA. Conidios elipsoidales de $\pm 1,6$ $12 \mu\text{m}$ de largo y $\pm 0,5$ $4,5 \mu\text{m}$ de ancho, células conidiogénicas monofialídicas; ausencia de estructuras de reproducción sexual como: peritecios y ascosporos; color de la colonia en medio PDA, blanca (figura 10) (Gaws *et al.*, 2007; Dam *et al.*, 2012).

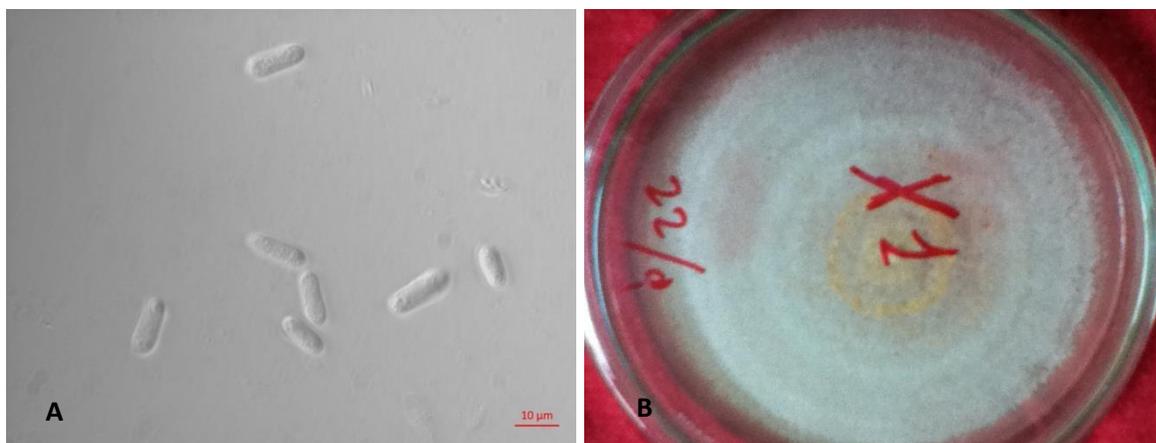


Figura 10. Caracterización morfológica aislamiento J2 y X1, (A) Conidios, Cultivo en medio PDA. Escala bar $10 \mu\text{m}$.

5.3.6. Caracterización morfológica del aislamiento F:

Aspergillus spp., Características en medio MEA. Cabeza conidial biseriada, tallo hialino, septado, corrugado y equinado, de pared gruesa, variables en tamaño, $\pm \mu\text{m}$ de largo, célula basal en forma de (T); vesículas elipsoidales, células conidiogénicas polifialídicas, conidios globosos, hialinos, lisos, $\pm 0,4$ $3 \mu\text{m}$ de diámetro; Cinema uniseriado, tallo hialino, liso, variable en tamaño entre $211,1$ – $1032,3 \mu\text{m}$, células conidiogénicas monofialídicas, conidios globosos, corrugados o equinados de color verde-amarilla, $\pm 0,3$ $4,5 \mu\text{m}$ de

Resultados

diámetro. Color de la colonia en medio MEA verde-amarilla (figura 11) (Geiser *et al.*, 2007; Samson *et al.*, 2007, 2011, 2014).

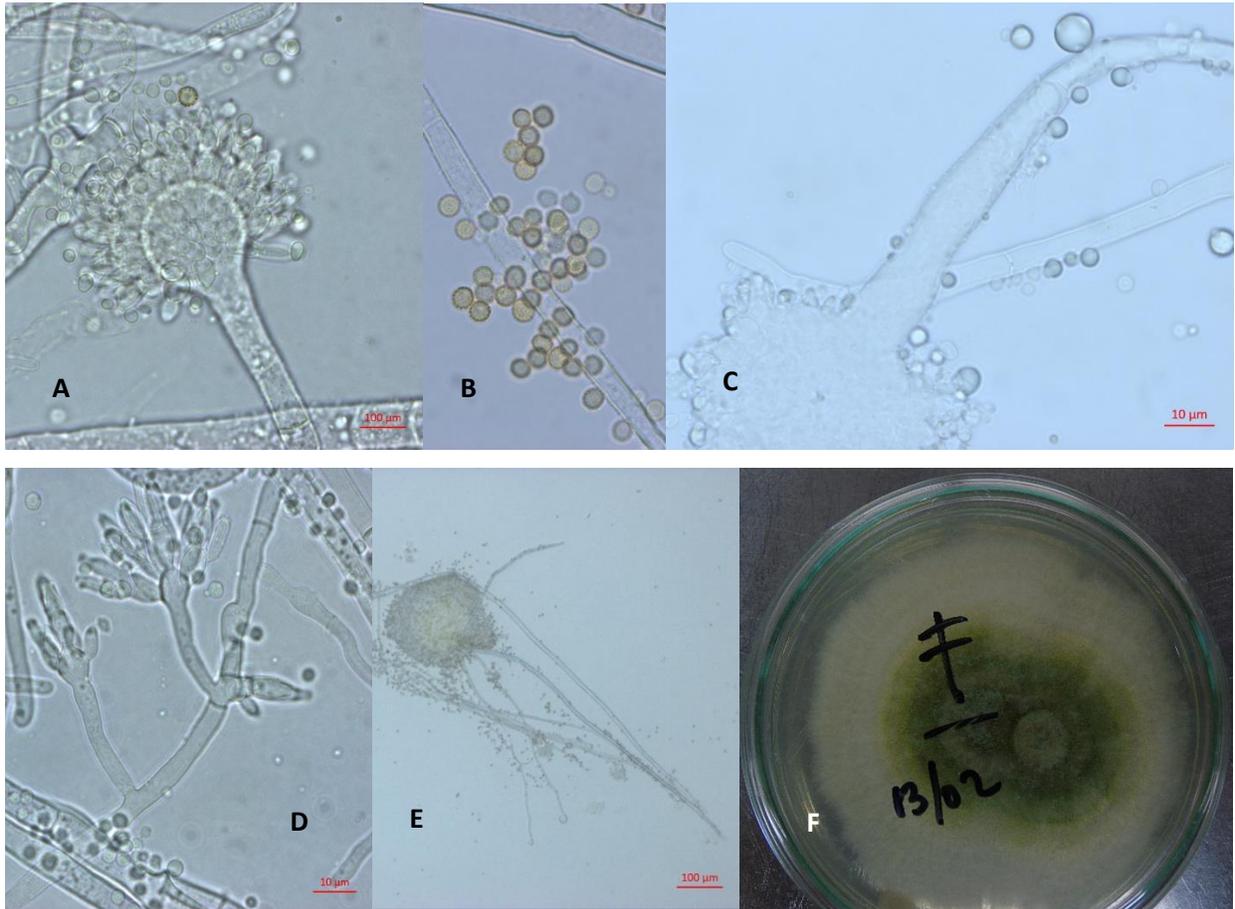


Figura 11. Caracterización morfológica aislamiento F, (A) Cabeza conidial, (B) Conidios (C) Conidióforo, (D) Células conidiogénicas, (E) Cinemas, (F) Cultivo en medio PDA. Escala bar 10 µm.

Resultados

5.3.7. Caracterización morfológica del aislamiento M, N, O:

Aspergillus spp., Características en medio MEA. Cabeza conidial uniseriada, tallo hialino, liso, variables en tamaño, $\pm 34\ 204\ \mu\text{m}$ de largo, vesículas globosas, células conidiogénicas monofialídicas, conidios en cadena, globosos de color marrón, rugosos o equinado, $\pm 0,3\ 2,3\ \mu\text{m}$ de diámetro; Color de la colonia en medio PDA verde-oliva. (figura 12) (Geiser *et al.*, 2007; SAMSON *et al.*, 2007, 2011, 2014).

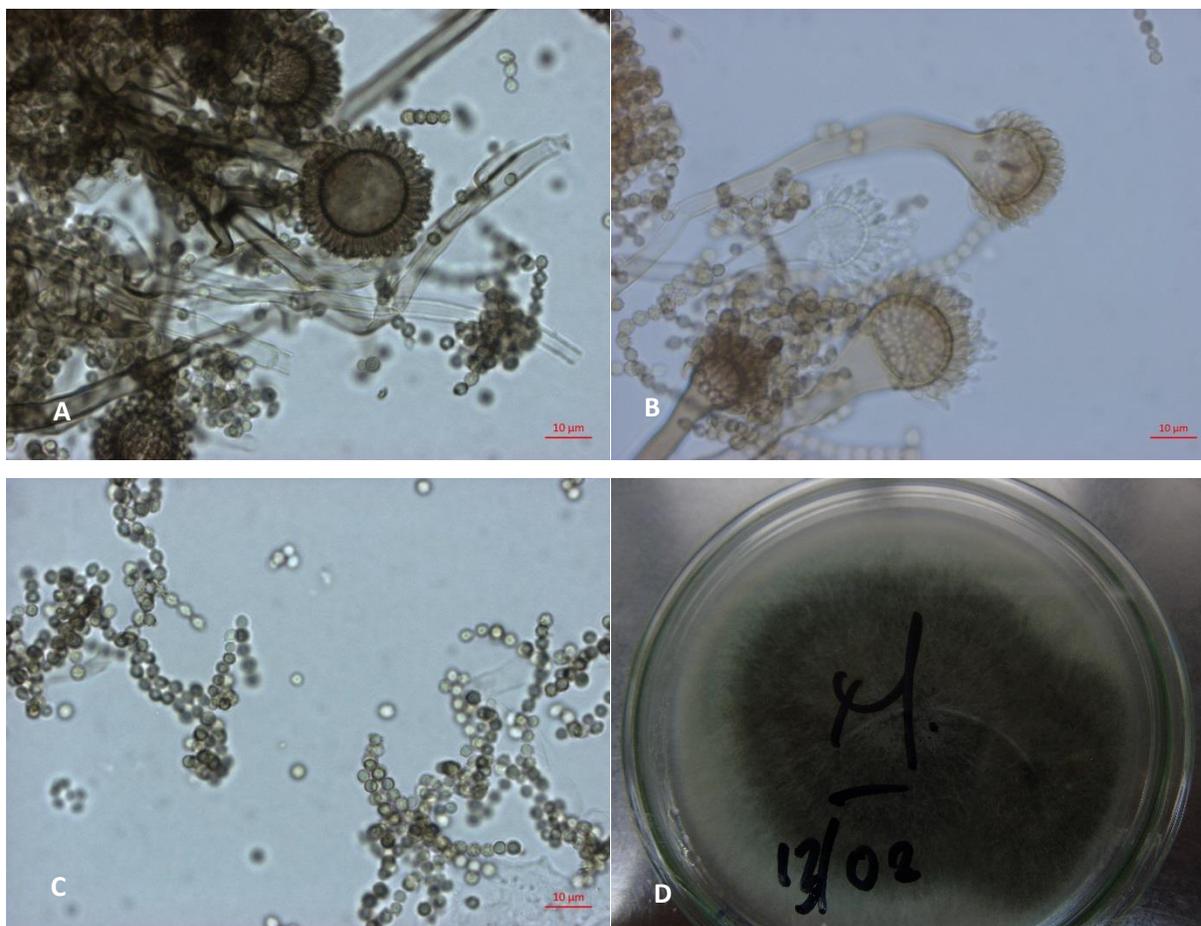


Figura 12. Caracterización morfológica aislamiento M, N y O, (A) Conidióforos, (B) Vesículas, (C) Conidios, (D) Cultivo en medio PDA. Escala bar 10 μm .

Resultados

5.3.8. Caracterización morfológica del aislamiento R, H1, PP, P:

Penicillium spp., Características en medio MEA. Conidióforo terverticilar, hialino, septado y liso, de ± 4 2,6 μm de largo; metulas en grupos de 3-5, células conidiogénicas polifialídicas ampuliformes, conidios globosos de color marrón, ± 3 2,4 μm de diámetro; color de la colonia en medio PDA verde-oliva (figura 13) (Visagie *et al.*, 2014).

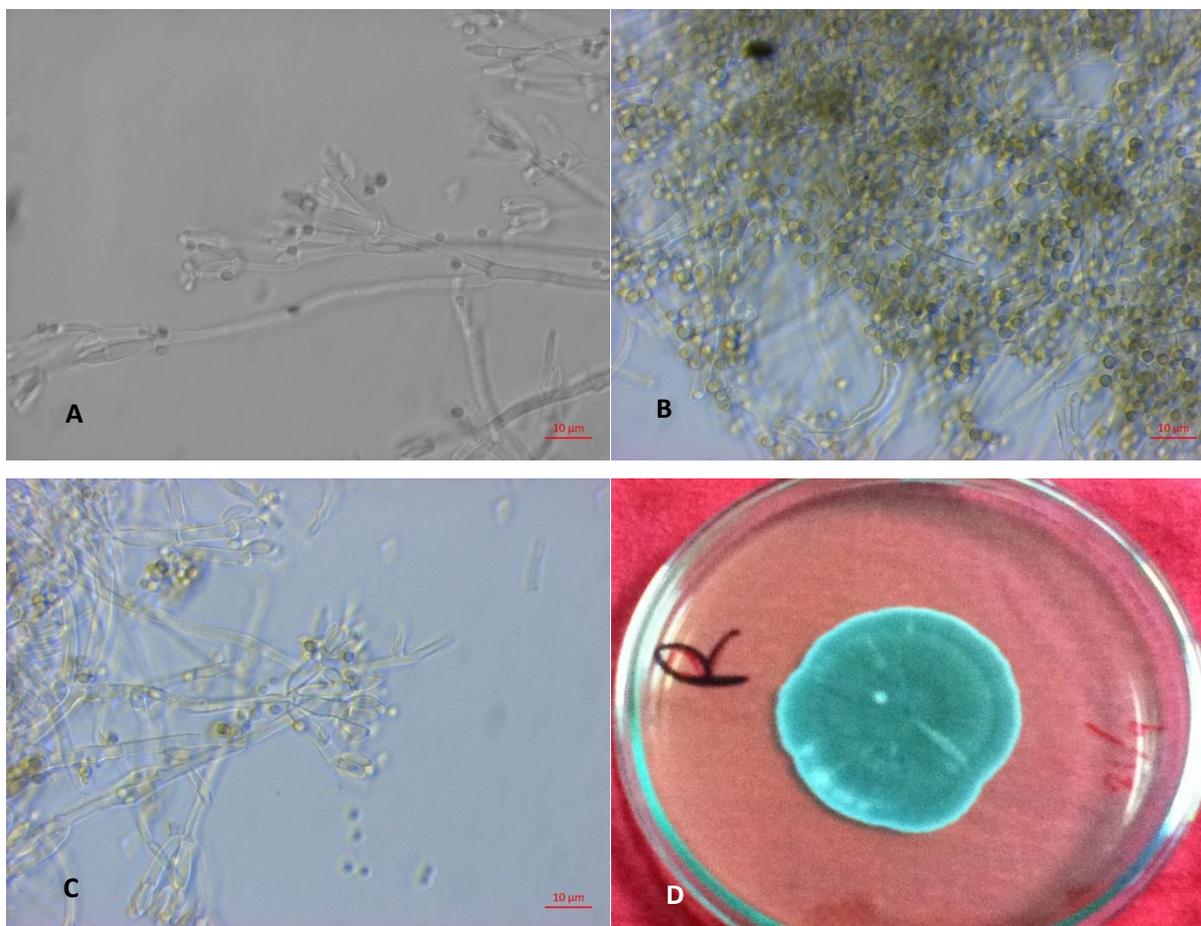


Figura 13. Caracterización morfológica aislamiento R, H1, PP y P, (A, C) Conidióforo, (B) Conidios, (D) Cultivo en medio PDA. Escala bar 10 μm .

Resultados

5.4. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, CULTURAL Y BIOQUÍMICA DE BACTERIAS.

Como resultado de la caracterización morfológica, cultural y bioquímica, siguiendo las metodologías descritas en los Manuales de Microbiología: Aspectos Fundamentales, Microbiología Conceptos y Práctica de microbiología General (De Prager *et al.*, 2001; Triviño, 2011) y el manual de identificación de organismos de (Biomérieux 2002); se presenta la siguiente descripción.

5.4.1. Caracterización morfológica y cultural de los aislamientos (2,4,5,7 y 8):

Bacillus sp. bacilos gram positivos de $\pm 0,2$ 1,5 μm de largo, colonias sobre AN en cajas Petri de color amarillo, circulares, de elevación mamelonada y bordes continuos; crecimiento en AN inclinado filiforme, apariencia en caldo nutritivo, turbidez fina y uniforme (figura 14).

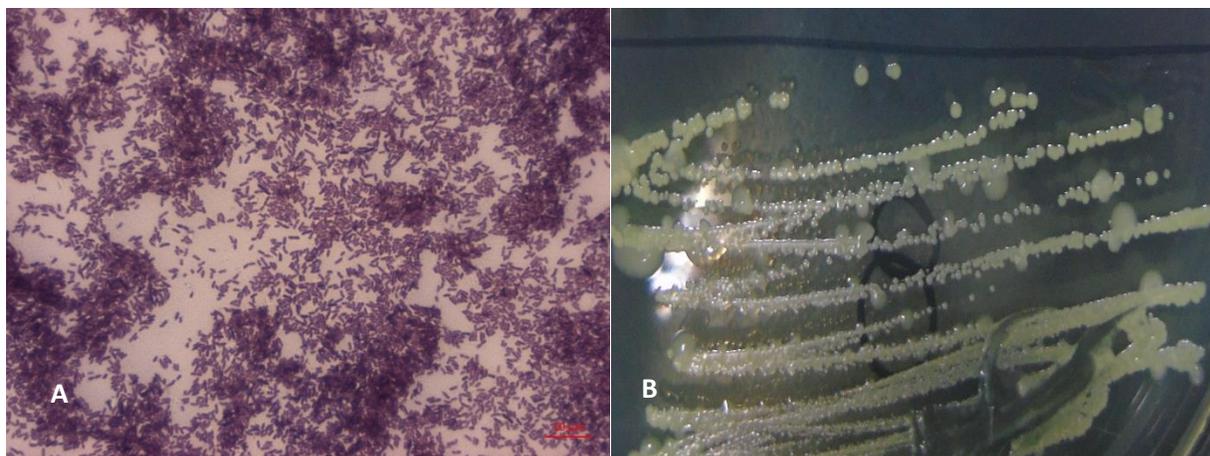


Figura 14. Caracterización morfológica aislamientos 2, 4, 5, 7 y 8, (A) Células Bacterianas, (B) Colonia en medio AN. Escala bar 10 μm .

Resultados

5.4.2. Caracterización morfológica y cultural del aislamiento 3:

Bacillus sp., Bacilos gram positivos de $\pm 0,2$ $2,7 \mu\text{m}$ de largo, colonias sobre AN en cajas Petri de color blanco, circulares, de elevación convexa y bordes continuos; crecimiento en AN inclinado barbado, apariencia en caldo nutritivo, película (figura 15).

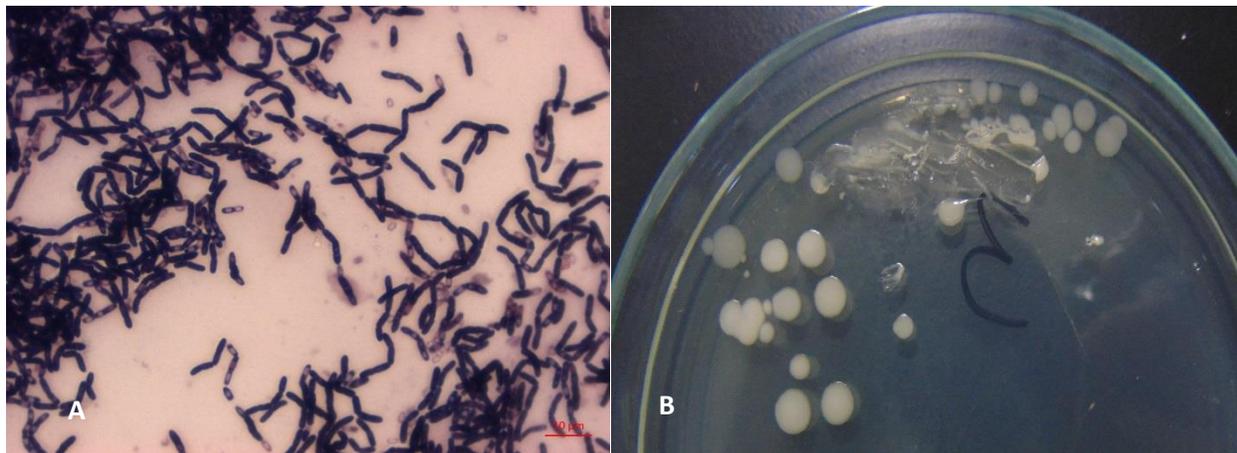


Figura 15. Caracterización morfológica aislamiento 3, (A) Células bacterianas, (B) Colonia en medio AN. Escala bar $10 \mu\text{m}$.

5.4.3. Caracterización morfológica y cultural del aislamiento 9:

Bacillus sp., Bacilos gram negativos de $\pm 0,2$ $1,2 \mu\text{m}$ de largo, colonias sobre AN en cajas Petri de color blanco; crecimiento en AN inclinado barbado, apariencia en caldo nutritivo, película (figura 16).

Resultados

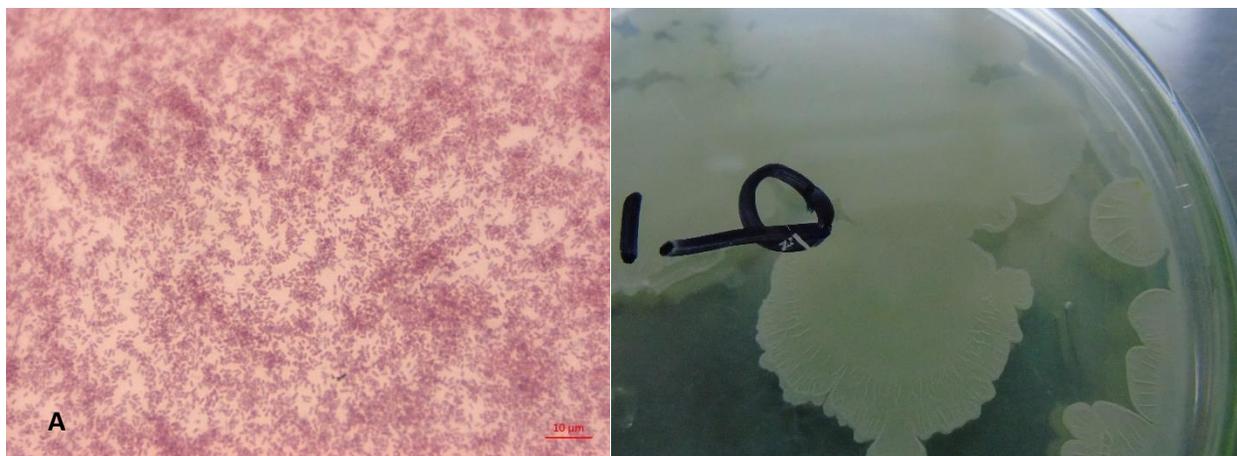


Figura 16. Caracterización morfológica aislamiento 9, (A) Células bacterianas, (B) Colonia en medio AN. Escala bar 10 μm .

5.4.4. Caracterización morfológica y cultural del aislamiento 10 y 11:

Bacillus sp., Bacilos gram positivos de $\pm 0,4 \times 2,7 \mu\text{m}$ de largo, colonias sobre AN en cajas Petri de color blanco, irregulares, elevada y de bordes lobulados; crecimiento en AN inclinado filiforme, apariencia en caldo nutritivo, película (figura 17).

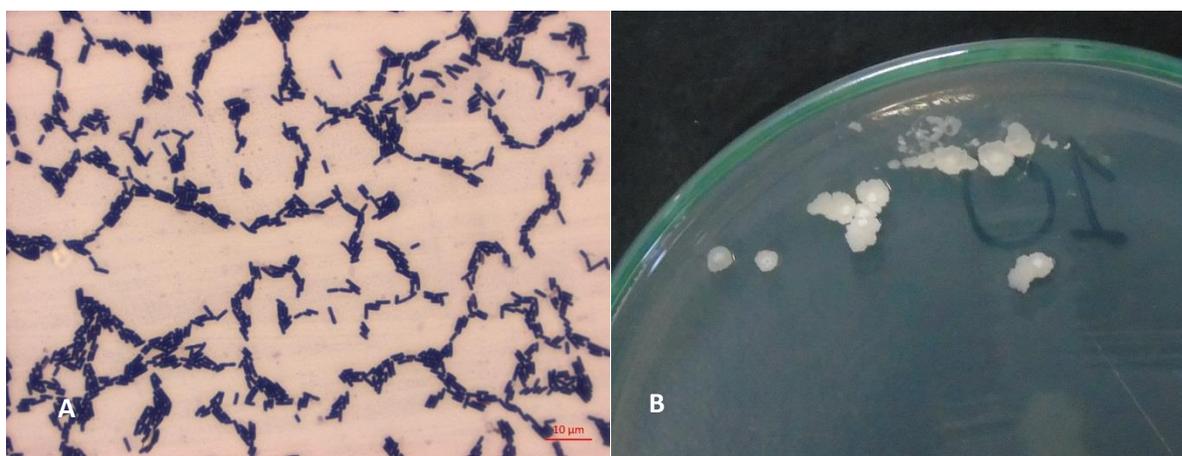


Figura 17. Caracterización morfológica aislamiento 10 y 11, (A) Células bacterianas, (B) Colonia en medio AN. Escala bar 10 μm .

Resultados

5.4.5. Caracterización morfológica y cultural del aislamiento 12:

Bacillus sp., Bacilos Gram positivos de $\pm 1,4$ $2,7 \mu\text{m}$ de largo, colonias sobre AN en cajas Petri de color blanco, irregulares, elevada y de bordes lobulados; crecimiento en AN inclinado barvado, apariencia en caldo nutritivo, película, turbio y floculante (figura 18).

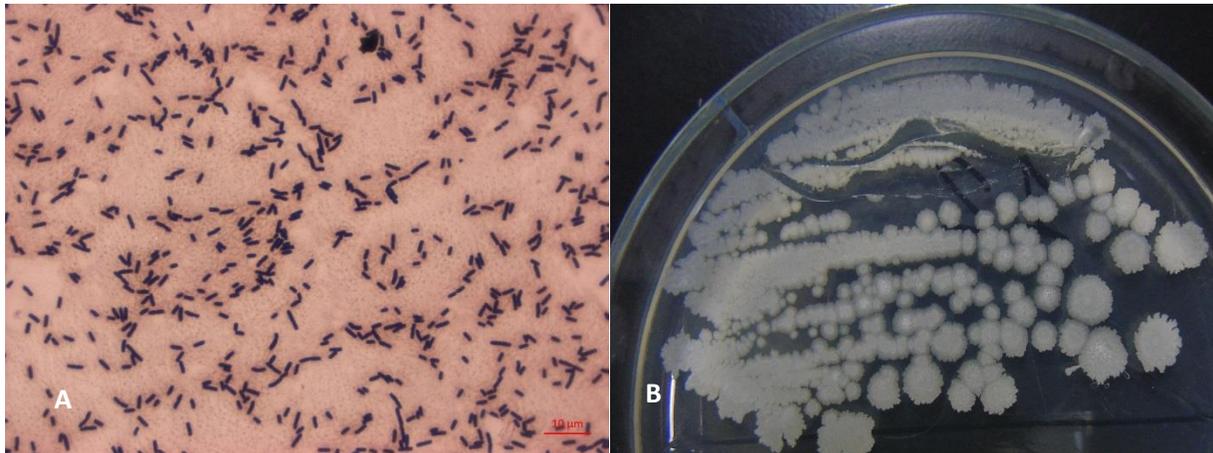


Figura 18. Caracterización morfológica aislamiento 12, (A) Células bacterianas, (B) Colonia en medio AN. Escala bar 10 μm .

5.4.6. Caracterización morfológica y cultural del aislamiento 14:

Cocos, Gram negativos de $\pm 0,1$ $0,7 \mu\text{m}$ de diámetro, colonias sobre AN en cajas Petri de color blanco, circulares, de elevación convexa y bordes continuos; crecimiento en AN inclinado difuso, apariencia en caldo nutritivo, turbidez fina y uniforme (figura 19).

Resultados

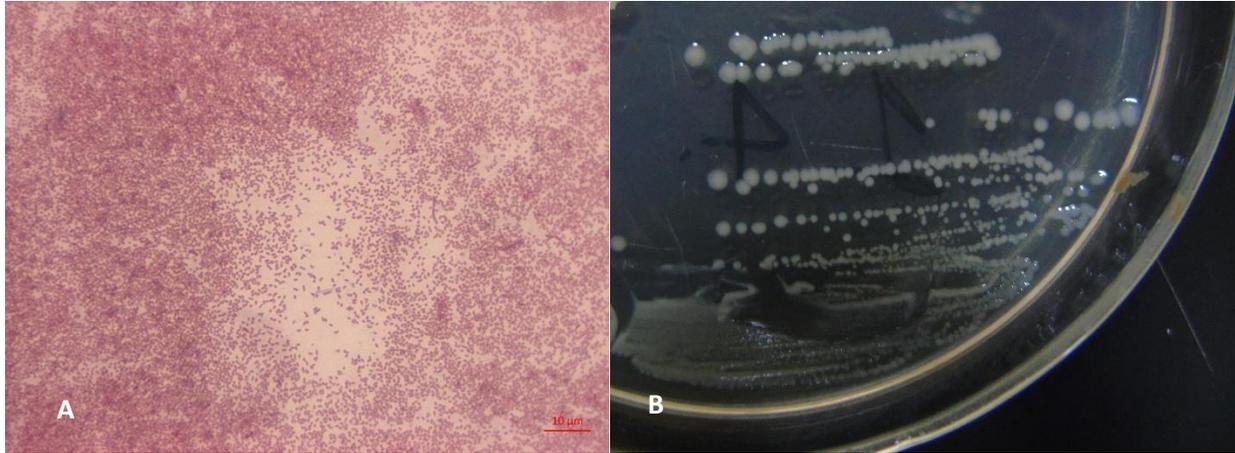


Figura 19. Caracterización morfológica aislamiento 14, (A) Células bacterianas, (B) Colonia en medio AN. Escala bar 10 µm.

5.4.7. Caracterización morfológica y cultural del aislamiento 15:

Bacillus sp., Bacilos Gram positivos de $\pm 0,32$ µm de largo, colonias sobre AN en cajas Petri de color blanco, irregulares, elevada y de bordes lobulados; crecimiento en AN inclinado, equinulado; apariencia en caldo nutritivo, película (figura 20).

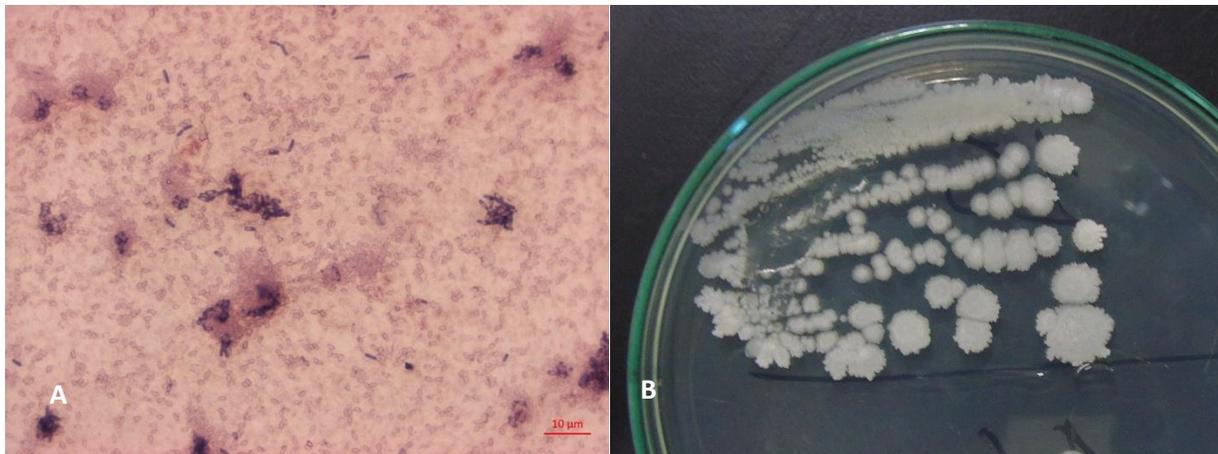


Figura 20. Caracterización morfológica aislamiento 15, (A) Células bacterianas, (B) Colonia en medio AN. Escala bar 10 µm.

Resultados

Tabla 6. Resultados pruebas bioquímicas tiras API 20E.

Aislamiento	Tinción de Gram	Bacilo	Coco	Catalasa	Oxidasa	Beta-galactosidasa ONPG	Arginina deshidrolasa ADH	Lisina descarboxilasa LDC	Ornitina descarboxilasa ODC	Utilización de citrate CIT	Producción de H2S	Ureasa URE	Triptófano desaminasa TDA	Producción de indol IND	Producción de acetone (Voges-Proskauer)	Gelatinasa GEL	Fermentación/ oxidación de Glucosa GLU	Fermentación/ oxidación de manitol MAN	Fermentación/ oxidación de inositol INO	Fermentación/ oxidación de sorbitol SOR	Fermentación/ oxidación de ramnosa RHA	Fermentación/ oxidación de sacarosa SAC	Fermentación/ oxidación de melabiosa MEL	Fermentación/ oxidación de amigdalina AMY	Fermentación/ oxidación de arabinosa ARA	Reducción de nitratos a NO2	Reducción de nitratos a N2
2,3,5,7 y 8	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
3	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
10	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
12	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
14	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
15	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

5.5. ANÁLISIS FILOGENÉTICO.

5.5.1. Aislamiento PP1 y T.

Basados en los resultados obtenidos con el programa BLAST, para el Análisis de Inferencia Bayesiana (AIB) Figura (21), de los aislamientos PP1 y T, se tomaron como referencia las secuencias epítificadas del complejo *Fusarium fujikuroi* usadas por (Herron *et al.*, 2015). Como resultado de la edición, alineamiento y concatenación de las secuencias BT2 y TEF se obtuvo una matriz de datos de 48 organismos con secuencias de 1272 pb., de longitud total y límites entre 1-575 para la secuencia BT2 y 576-1272 para TEF. El modelo de sustitución de nucleótidos más adecuado para ambas secuencias fue GTR+G, según el modelo (AIC) Akaike Information Criteria usado en el programa Jmodeltest.

De acuerdo con el filograma obtenido a partir del (AIB), se logra diferenciar la formación de 8 clados bien definidos, de los cuales 4 abarcan más del 90% del total de las especies dentro de este complejo. Adicional a esto, se logra apreciar que el aislamiento PP1 con código (ab1) se agrupa en uno de los clados con una Probabilidad Posterior (PP) del 100% con el microorganismo *F. phyllophilum*, especie registrada como patógeno de plantas pertenecientes a las familias Dracaenaceae y Asphodelaceae, en Europa y Japón, y que además se caracteriza por su limitada producción o ausencia de macroconidios y la producción de microconidios con forma clavada dispuestos en cadenas cortas o falsas cabezas originadas a partir de mono-fialíides (Leslie y Summerell, 2006).

Contrastando estas características morfológicas con las del aislamiento PP1 (figura 8), no es posible relacionarlo taxonómicamente con la especie *phyllophilum*, debido a que este, no comparte las características descritas por (Leslie y Summerell, 2006). Correlacionando este resultado con el obtenido en el (AIB), es posible afirmar que el

Resultados

aislamiento PP1 podría representar una nueva especie genéticamente cercana a la especie *phyllophilum* o una variación de esta dentro del complejo *fujikuroi*.

Con respecto a los resultados obtenidos para el aislamiento T con código (ab2) se observa que este, presenta un porcentaje de (PP) bajo 52%, evidenciando la alta diversidad genética de este con respecto a las otras especies dentro del complejo, formando un nuevo sub-clado y mostrándose como una nueva especie dentro del filigrana. Sin embargo, se recomienda realizar un nuevo análisis molecular adicionando nuevas regiones de genes que puedan brindar una mejor visualización de las diferencias genéticas intra-específicas en este complejo y así poder precisar estos resultados.

5.5.2. Aislamiento 4P.

Basados en los resultados obtenidos con el programa BLAST, para el Análisis de Inferencia Bayesiana (AIB) del aislamiento 4P Figura (22), se tomaron como referencia las secuencias epi-tipificadas del complejo *F. solani* usadas por (Weir *et al.*, 2003). Como resultado de la edición, alineamiento y concatenación de las secuencias ITS y TEF se obtuvo una matriz de datos de 13 organismos con secuencias de 1281 pb., de longitud total y límites entre 1-590 para la secuencia ITS y 591-1281 para TEF. El modelo de sustitución de nucleótidos más adecuado para ambas secuencias fue GTR+G, según el modelo (AIC) Akaike Information Criteria usado en el programa Jmodeltest.

A partir del filo-grama obtenido del (AIB) se logra evidenciar la formación de 5 clados bien definidos con una Probabilidad Posterior (PP) mayor al 90%, infiriendo la poca diversidad genética dentro del complejo. Del mismo modo, se observa el aislamiento 4P agrupado con una (PP) del 80% con la secuencia del microorganismo *F. solani* f.sp. *xanthoxyli*.

Resultados

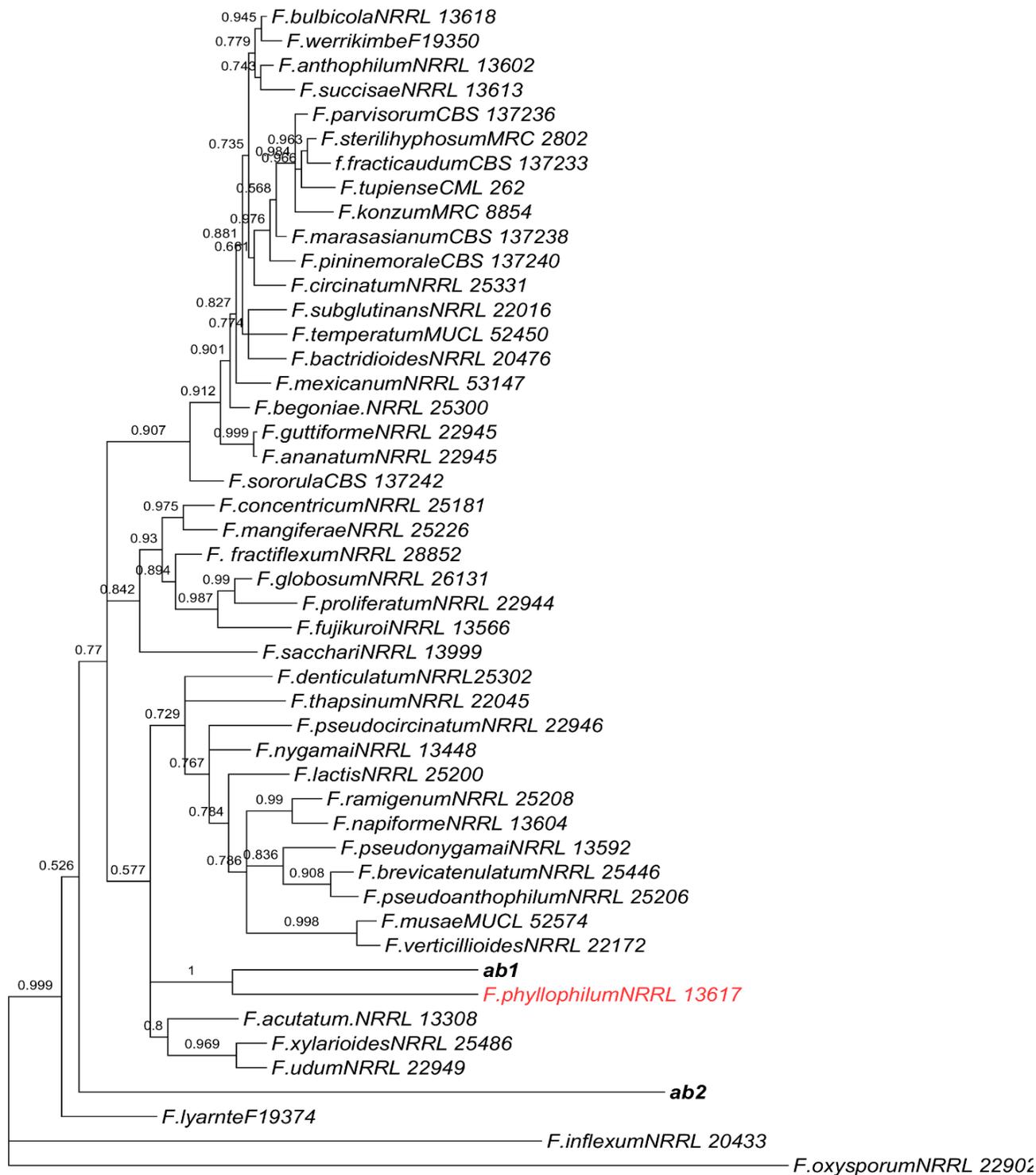


Figura 21: Análisis de Inferencia Bayesiana (AIB) de las secuencias BT2 y TEF de 48 aislamientos del Complejo *F. fujikuroi*. Los valores de (PP) son mostrados encima de cada uno de los nudos del filo-grama, así como también, los códigos de las accesiones de cada aislamiento.

Resultados

Según (Zhou *et al.*, 2016) la especie *F. solani* f.sp. *xanthoxyli* ha sido reportada únicamente en China afectando plantas de *Zanthoxylum bungeanum*. Sus colonias en PDA, presentan micelio abundante, a medida que pierden densidad suelen tornarse de color amarillento o anaranjado rojizo, conidióforos y esporodoquios aéreos que no están bien diferenciados, macroconidios falcados, ligeramente curvados o rectos, de 3- 5 y 7 septos y longitudes entre 25.3 y 62,3 $\mu\text{m.}$, célula apical aguda y basal con protuberancia visible. Ocasionalmente conidios pequeños con forma elipsoidal o clavada, de 1 y 3 septos entre 7,5 y 28 $\mu\text{m.}$, de longitud., así como también, clamidosporas.

Correlacionado las características morfológicas del aislamiento 4P (figura 7) con las descritas por (Zhou *et al.*, 2016), es posible identificar algunas características compartidas entre estos dos aislamientos, más, no es posible diferenciarlo taxonómicamente a nivel de sub-especie, debido a que esta comparte caracteres morfológicos con otras de las sub-especies dentro del complejo.

Consecuente con lo anterior y teniendo en cuenta la importancia de los primers usados en el análisis según (Leslie y Summerell, 2006), es posible asegurar que el aislamiento 4P pertenece al complejo *F. solani* y que estaría representando una nueva especie estrechamente relacionada con la sub-especie *xanthoxyli*. Sin embargo, se recomienda realizar un nuevo análisis molecular adicionando nuevas regiones de genes que puedan brindar una mejor visualización de las diferencias genéticas intra-específicas en este complejo y así poder precisar estos resultados.

Resultados

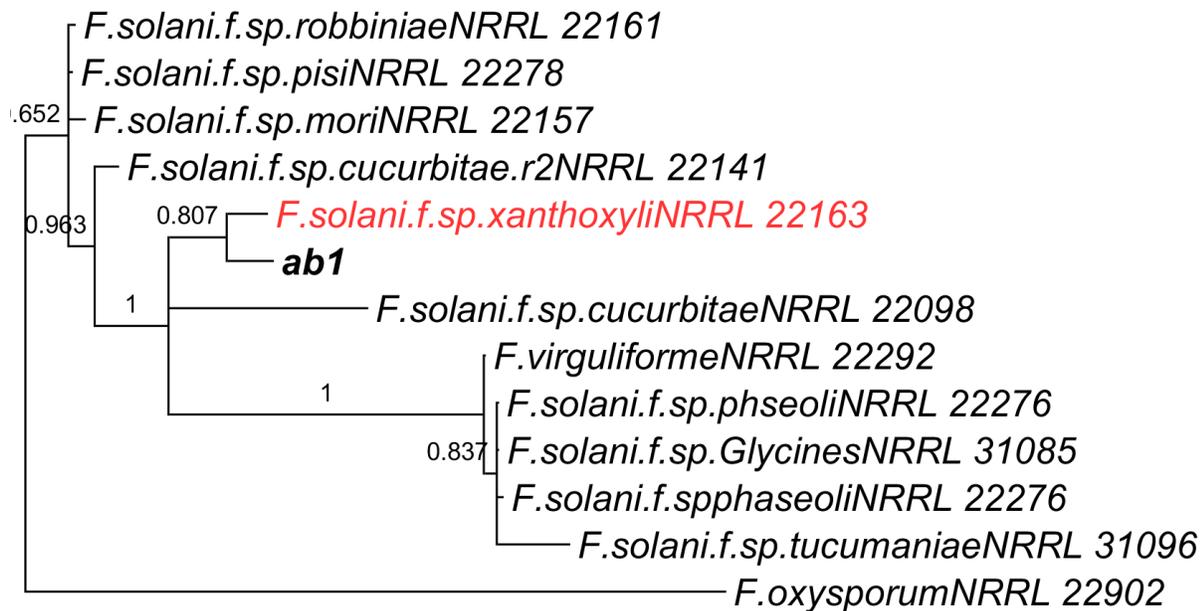


Figura 22: Análisis de Inferencia Bayesiana (AIB) de las secuencias ITS y TEF de 13 aislamientos del Complejo *F. solani*. Los valores de (PP) son mostrados encima de cada uno de los nudos del filo-grama, así como también, los códigos de las accesiones de cada aislamiento.

5.5.3. Aislamiento J2.

Basados en los resultados obtenidos con el programa BLAST, para el Análisis de Inferencia Bayesiana (AIB) Figura (23) del aislamiento J2, se tomaron como referencia las secuencias epi-tipificadas del complejo *Colletotrichum gloesporioides* usadas por (Aoki *et al.*, 2003; W. C. Chung *et al.*, 2010). Como resultado de la edición, alineamiento y concatenación de las secuencias BT2 e ITS se obtuvo una matriz datos de 24 organismos con secuencias de 1232 pb., de longitud total y límites entre 1-714 para la secuencia BT2 y 715-1232 para ITS. El modelo de sustitución de nucleótidos más adecuado para ambas secuencias fue GTR+I, según el modelo (AIC) Akaike Information Criteria usado en el programa Jmodeltest.

Resultados

De acuerdo con el filo-grama obtenido a partir del (AIB), se logra evidenciar la formación de 3 clados bien definidos, permitiendo inferir la existencia de poca diversidad genética dentro del complejo. Así mismo, se observa el aislamiento J2 agrupado con una probabilidad posterior (PP) de 98% con la secuencia del microorganismo *C. fructicola*, indicando una alta relación genética entre las dos especies.

La especie *C. fructicola* ha sido registrada como microorganismo endófito o patógeno de frutos de plantas de café en Tailandia, de *Pyrus pyrifolia* en Japón, *Limonium* en Israel, *Malus domestica* y *Fragaria ananassa* en EUA, *Persea americana* en Australia, *Ficus* en Alemania, *Malus domestica* en Brasil, *Dioscorea* en Nigeria, *Theobroma* y *Tetragastris* en Panamá y Aguacate cv. Hass y Mora de Castilla en centro América (Weir *et al.*, 2012; Kafuri, *et al.*, 2014; Álvarez *et al.*, 2015). Morfológicamente, no presenta características diferenciales de la especie, en medio de cultivo genera estructuras de reproducción sexual como peritecios, al igual que la mayoría de las especies pertenecientes a este complejo (Weir *et al.*, 2012).

En efecto, al contrastar las características morfológicas obtenidas del aislamiento J2 (figura 10) con las descritas por (Weir *et al.*, 2012) no es posible establecer relaciones taxonómicas a nivel de sub-especie, debido a que el complejo no presenta características intra-específicas diferenciales. Con base en estos resultados y bajo el concepto filogenético de especies, es posible afirmar que el aislamiento J2 pertenece al complejo *gloesporioides* y a la sub-especie *frutícola*. Sin embargo, se recomienda realizar un nuevo análisis molecular adicionando nuevas regiones de genes que puedan brindar una mejor visualización de las diferencias genéticas intra-específicas en este complejo y así poder precisar estos resultados.

Resultados

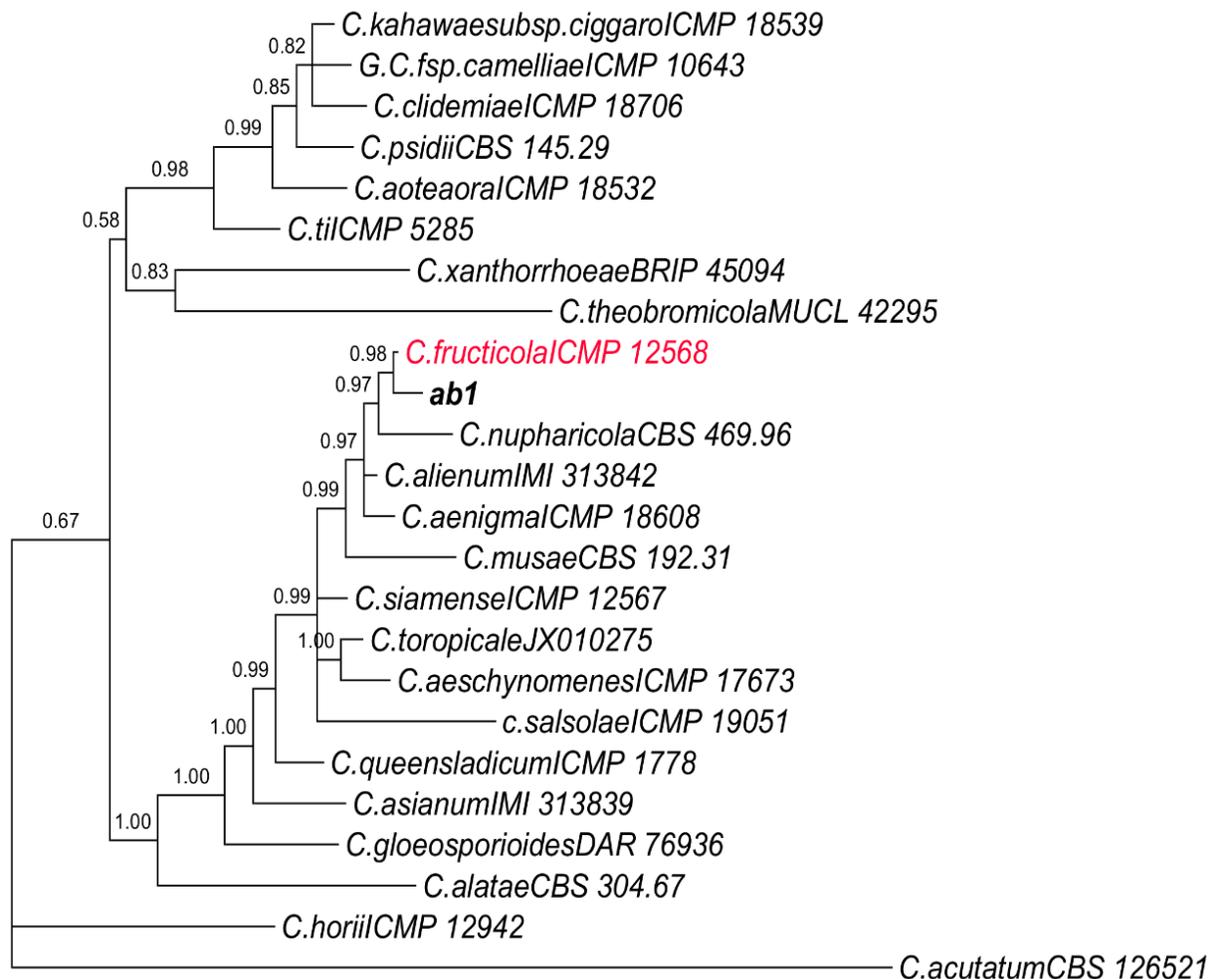


Figura 23: Análisis de Inferencia Bayesiana (AIB) de las secuencias BT2 y ITS de 24 aislamientos del Complejo *C. gloeosporioides*. Los valores de (PP) son mostrados encima de cada uno de los nudos del árbol, así como también, los códigos de las accesiones de cada aislamiento.

5.5.4. Aislamiento R.

Basados en los resultados obtenidos con el programa BLAST, para el Análisis de Inferencia Bayesiana (AIB) del aislamiento R Figura (24), se tomaron como referencia secuencias epi-tipificadas del género *Penicillium* depositadas en la base de datos del Gen Bank. Inicialmente se realizó un análisis filogenético de 80 secuencias a través del

Resultados

método Neighbor-Joining (NJ), a partir de estos resultados, fueron seleccionadas las secuencias más cercanas para así realizar un segundo análisis a través del método de Inferencia Bayesiana.

Como resultado de la edición, alineamiento y concatenación de las secuencias BT2 e ITS se obtuvo una matriz de datos de 13 organismos con secuencias de 1192 pb., de longitud total y límites entre 1-506 para la secuencia BT2 y 507-1192 para ITS. El modelo de sustitución de nucleótidos más adecuado para ambas secuencias fue GTR+I+G, según el modelo (AIC) Akaike Information Criteria usado en el programa Jmodeltest.

De acuerdo con el filo-grama obtenido a partir del (AIB), se logra evidenciar la formación de 3 clados bien definidos y una (PP) mayor al 91%, permitiendo inferir la poca variabilidad genética entre las especies que lo conforman. Así como también, el aislamiento R agrupado con una Probabilidad Posterior (PP) del 100% con la secuencia de la especie *P. citrinum*, permitiendo inferir su identidad.

“Esta es una especie ubiqa a nivel mundial, predominantemente en suelos sub-tropicales, en ambientes encerrados y comidas. también se ha reportado como endófito en raíces, tallos y hojas de plantas de café, así como en raíces de *Ixeris repens*” (Houbraken *et al.*, 2010). Morfológicamente se caracteriza por colonias color verde oscuro, conidióforos biverticilados o terverticilados, uniseriados, lisos de 2-3 μm ., metulas en grupos de 3-4, fiálides con forma ampuliforme y conidios lisos, globosos o sub-globosos (Houbraken *et al.*, 2010).

Al contrastar las características morfológicas del aislamiento R (figura 13), con las citadas por (Houbraken *et al.*, 2010), se es posible establecer una relación taxonómica, debido a que este, comparte estas características. Teniendo en cuenta estos resultados y basándonos en el concepto filogenético de especies es posible afirmar que el aislamiento R si pertenece al género *Penicillium* y a la especie *citrinum*.

Resultados

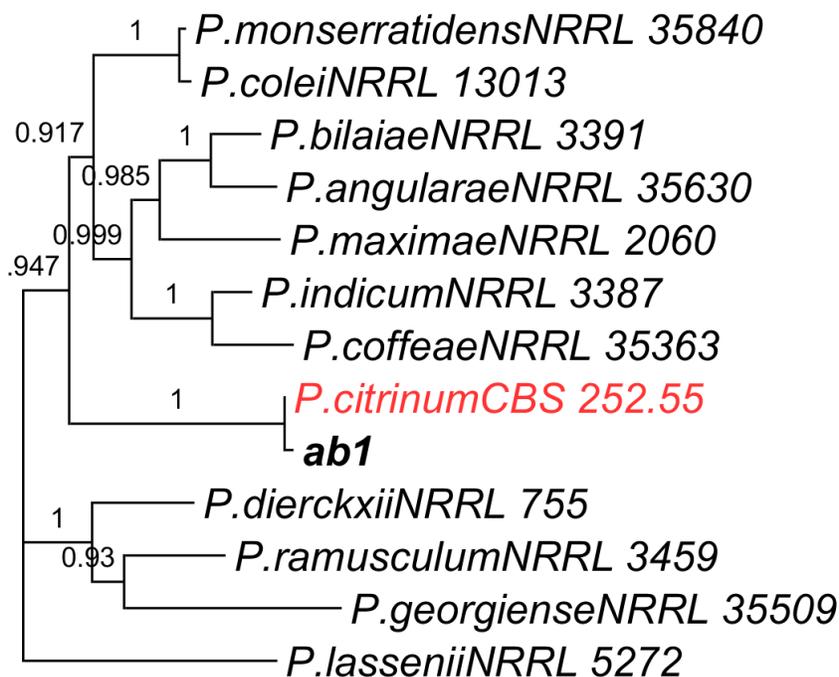


Figura 24: Análisis de Inferencia Bayesiana (AIB) de las secuencias BT2 y ITS de 13 aislamientos del Complejo género *Penicillium*. Los valores de (PP) son mostrados encima de cada uno de los nudos del árbol, así como también, los códigos de las accesiones de cada aislamiento.

5.5.5. Aislamiento U.

Basado en los resultados obtenidos con el programa BLAST, para el Análisis de Inferencia Bayesiana (AIB) del aislamiento U (Figura 9), se tomaron como referencia las secuencias epi-tipificadas de los géneros *Pestalotia*, *Pestalotiopsis* y *Neopestalotiopsis* usadas por (Maharachchikumbura *et al.*, 2014). Inicialmente se realizó un análisis filogenético de 76 secuencias a través del método Neighbor-Joining (NJ). A partir de este, fueron seleccionadas las secuencias más cercanas para así realizar un segundo análisis filogenético a través del método de Inferencia Bayesiana.

Resultados

Como resultado de la edición, alineamiento y concatenación de las secuencias BT2 e ITS se obtuvo una matriz de datos de 17 organismos con secuencias de 1389 pb., de longitud total y límites entre 1-813 para la secuencia BT2 y 814-1389 para ITS. El modelo de sustitución de nucleótidos más adecuado para BT2 fue K80+G y HKY+G para ITS, según el modelo (AIC) Akaike Information Criteria usado en el programa Jmodeltest.

De acuerdo con el filo-grama obtenido a partir del (AIB), se aprecia la formación de 6 clados bien definidos que evidencian la alta diversidad genética dentro del complejo. Por otra parte, se observa al aislamiento U con código (ab1) formando un nuevo sub-clado con un porcentaje de (PP) del 58% dentro del complejo. Es importante resaltar que este nuevo sub-clado se encuentra dentro de los clados formados por el género *Neopestalotiopsis*.

Correlacionando las características morfológicas del aislamiento U, con las descritas por (Maharachchikumbura *et al.*, 2014) para el género *Neo-pestalotiopsis*, es posible establecer una relación taxonómica, ya que el aislamiento U si comparte las características descritas para este género. fortaleciendo la hipótesis de que el aislamiento U pertenece a este grupo de microorganismos.

Con base en lo anterior y bajo el concepto filogenético de especies es posible concluir, que el aislamiento U (figura 9) pertenece a un nuevo sub-clado dentro del género *Neopestalotiopsis*. Sin embargo, para poder precisar estos resultados es necesario realizar un nuevo análisis molecular adicionando nuevas regiones de genes que puedan brindar una mejor visualización de las diferencias genéticas intra-específicas en este complejo.

Resultados

Como resultado de la edición, alineamiento y concatenación de las secuencias BT2 e ITS se obtuvo una matriz de 13 organismos con secuencias de 1529 pb., de longitud total y límites entre 1-558 para la secuencia BT2 y 559-1529 para ITS. El modelo de sustitución de nucleótidos más adecuado para las secuencias de BT2 fue HKY+G y SYM+I+G para las ITS, según el modelo (AIC) Akaike Information Criteria usado en el programa Jmodeltest.

A partir del filo-grama obtenido del (AIB) (figura 26) se logra visualizar la formación de 7 clados bien definidos, los cuales evidencian también la gran variabilidad genética del género. Adicionalmente, se observa al aislamiento W1 con código ab1 agrupado con una Probabilidad Posterior (PP) del 100% con la secuencia de la especie *acaciarum*.

Según (Dissanayake *et al.*, 2017), las especies registradas dentro del género *Diaphorte*, son reportadas como endófitas, saprofitas o patógenos de importancia económica en numerosos cultivos, especies ornamentales y forestales. Adicional a esto, su identificación está basada únicamente en análisis moleculares, debido a que su morfología es poco variable entre especies.

Entre las especies patógenas de forestales se encuentra *D. acaciarum*., reportada únicamente afectando árboles de *Acacia tortilis* en el Serengeti, Tanzania; se caracteriza por la producción de conidiomatas en forma de picnidios, conidios alfa fusoides-elipsoidales estrechos en ambos extremos, aceptados y hialinos, conidios beta en forma de huso, aceptados, hialinos, de ápice agudo y redondeado (Crous *et al.*, 2014).

Al correlacionar las características morfológicas del aislamiento W1 con las descritas por (Crous *et al.*, 2014), no es posible establecer una relación taxonómica entre estas, ya que el aislamiento fue caracterizado como micelio estéril al no observarse ningún tipo de estructuras reproductivas en sus colonias. De acuerdo con lo anterior y basados en el concepto filogenético de especies, es posible afirmar que el aislamiento W1 pertenece a la especie *Diaphorte acaciarum*.

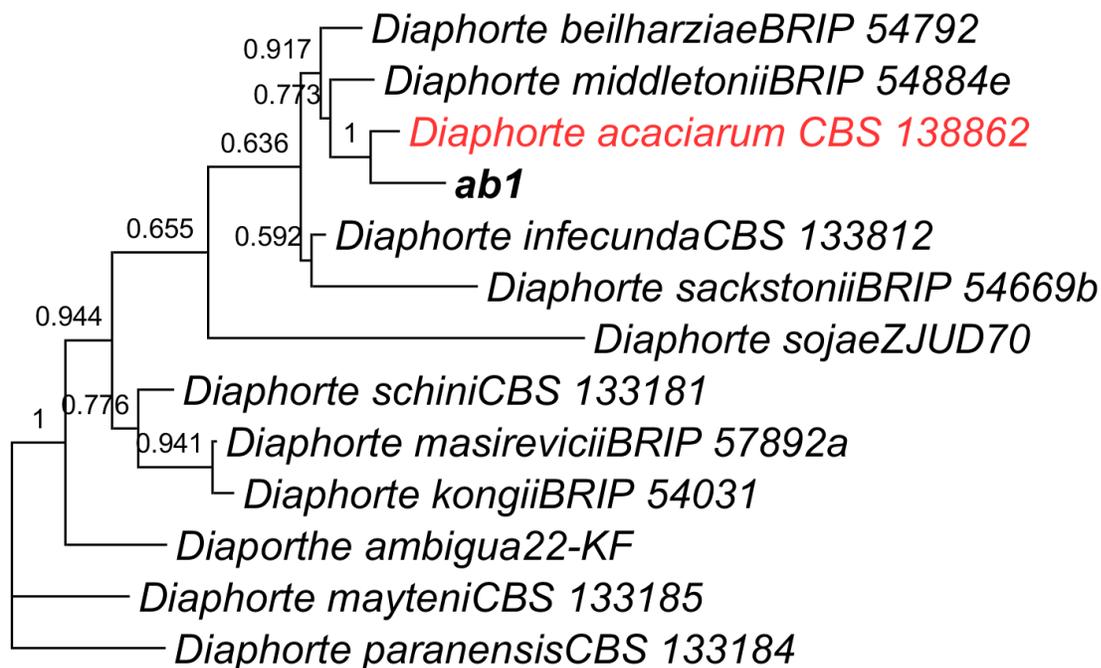


Figura 26: Análisis de Inferencia Bayesiana (AIB) de las secuencias BT2 y ITS de 13 aislamientos del género *Diaphorte*. Los valores de (PP) son mostrados encima de cada uno de los nudos del árbol, así como también, los códigos de las accesiones de cada aislamiento.

5.5.7. Aislamiento M.

Basado en los resultados obtenidos con el programa BLAST, para el análisis filogenético del aislamiento M, se tomaron como referencia las secuencias epi-tipificadas del género *Aspergillus* sección *fumigati*, utilizadas por (Balajee *et al.*, 2007); obteniéndose una matriz de datos 35 aislamientos. Teniendo en cuenta, que para el aislamiento M solo se logró obtener la secuencia del oligonucleótido BT2 con buena calidad, se decidió realizar el análisis filogenético a través del método Neighbor-joining (NJ) en el programa MEGA.

Resultados

Como resultado del análisis (NJ) (Figura 27) se puede observar una amplia variabilidad genética dentro del género. Así mismo se evidencia que el aislamiento M con código (ab1) presenta un porcentaje de similitud menor al 36% con respecto a la secuencia más cercana en el filo-grama, lo cual no permite agruparlo con alguna de las secuencias dentro del grupo; adicional a esto, muestra diferencias genéticas significativas al ubicarse como una especie “outgroup”.

De acuerdo con (Balajee *et al.*, 2007; Rokas *et al.*, 2007; Samson *et al.*, 2007) *A. fumigatus* es una especie ubicua a nivel mundial y el principal agente causal de enfermedades en animales y humanos como: aspergilosis, micotoxicosis, reacciones alérgicas, osteomielitis, endocarditis y queratitis micótica. Según (Samson *et al.*, 2007) *A. fumigatus* se caracteriza por producir colonias de color turquesa o verde oscuro, conidióforos uniseriados entre 50-350 μm ., vesículas piriformes, sub-globosas o globosas, conidios globosos o elipsoidales entre 2-3.5 μm , lisos o ligeramente rugosos.

Correlacionando las características morfológicas del aislamiento M (figura 12) con las descritas por (Samson *et al.*, 2007), es posible afirmar que el aislamiento M presenta una alta relación morfológica con la especie *fumigatus*. mas no es posible asegurar que lo sea, debido a que las características morfológicas entre algunas especies pertenecientes a esta sección son poco variables.

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente y basándonos en el concepto filogenético de especies, es posible afirmar que, contrario a los resultados obtenidos con el programa BLAST, el cual arrojó un porcentaje del 99% de similitud con la especie *A. fumigatus*, el aislamiento M no pertenece a la especie *fumigatus* ni a la sección *fumigati* dentro del género *Aspergillus*.

Resultados



Figura 27: Análisis Neighbor-joining (NJ) de la secuencia BT2 de 35 aislamientos de la sección Fumigati del género *Aspergillus*. Los valores de similitud son mostrados encima de cada uno de los nudos del árbol, así como también, los códigos de las accesiones de cada aislamiento.

Resultados

5.5.8. Aislamiento Y.

Basados en los resultados obtenidos con el programa BLAST, para el análisis filogenético del aislamiento Y, se tomaron como referencia las secuencias epi-tipificadas del género *Lasiodiplodia* depositadas en la base de datos del Gen Bank. Teniendo en cuenta, que para el aislamiento Y solo se logró obtener la secuencia del oligonucleótido ITS1 y 4 con buena calidad, se decidió realizar un análisis filogenético a través del método Neighbor-joining (NJ) en el programa MEGA.

Como resultado el filo-grama obtenido a través del análisis (NJ) (Figura 28) muestra 11 clados bien definidos, con porcentajes de similitud genética altamente significativos mostrando que la variabilidad genética intra-específica es baja pero significativa al momento de clasificar las especies. Del mismo modo, se observa que el aislamiento Y con código 58ITS1 presenta una similitud genética por encima de 95% con la especie más cercana, pero, aun así no logra agruparse con ninguna de las especies dentro del grupo; como resultado este se ubica como un nuevo clado dentro del grupo.

De acuerdo con (Burgues *et al.*, 2006; J. Abdollahzadeh *et al.*, 2010; Phillips *et al.*, 2013), las especies del género *Lasiodiplodia* son encontradas comúnmente en ambientes tropicales o sub-tropicales como endófitos o patógenos secundarios de numerosas especies frutales y árboles leñosos. Según (Phillips *et al.*, 2013) este género se caracteriza por la producción de picnidios con paráfisis, conidios hialinos en su estado inmaduro que, en su proceso de maduración pueden pasar de hialinos a color marrón, divididos por un septo y ornamentados con estrías longitudinales, estando aún dentro del picnidio o pueden completar su maduración fuera de este.

Correlacionando las características morfológicas del aislamiento Y con las descritas por (Phillips *et al.*, 2013), no es posible relacionar el aislamiento con este grupo de especies, debido a que no se observó formación de estructuras de reproducción y este, fue

Resultados

clasificado como micelio esterilia. Teniendo en cuenta lo anterior y basados en el concepto filogenético de especies, es posible inferir que el aislamiento Y pertenece a una especie nueva dentro del género *Lasiodiplodia*.

5.5.9. Aislamientos Bacterianos 2,4,5,7 y 8.

Basados en los resultados obtenidos con el programa BLAST, para el análisis filogenético de los aislamientos bacterianos se tomaron como referencia las secuencias epi-tipificadas del género *Burkholderia* depositadas en la base de datos del Gen Bank. Debido a que solo se trabajó con una sola región de genoma, se decidió abordar el análisis filogenético a través del método Neighbor-joining (NJ), el cual se desarrolló en el programa MEGA.

A partir del filo-grama resultado del análisis (NJ) (Figura 29, 30) se observa que los aislamientos presentan una similitud genética mayor a 95%, formando un clado principal en el que se agrupan todos los aislamientos pertenecientes al complejo *B. cepaceae* con los aislamientos 2, 5 y 8. Adicionalmente, se observa que los aislamientos 4 y 7 forman un nuevo sub-clado dentro del clado principal.

Resultados

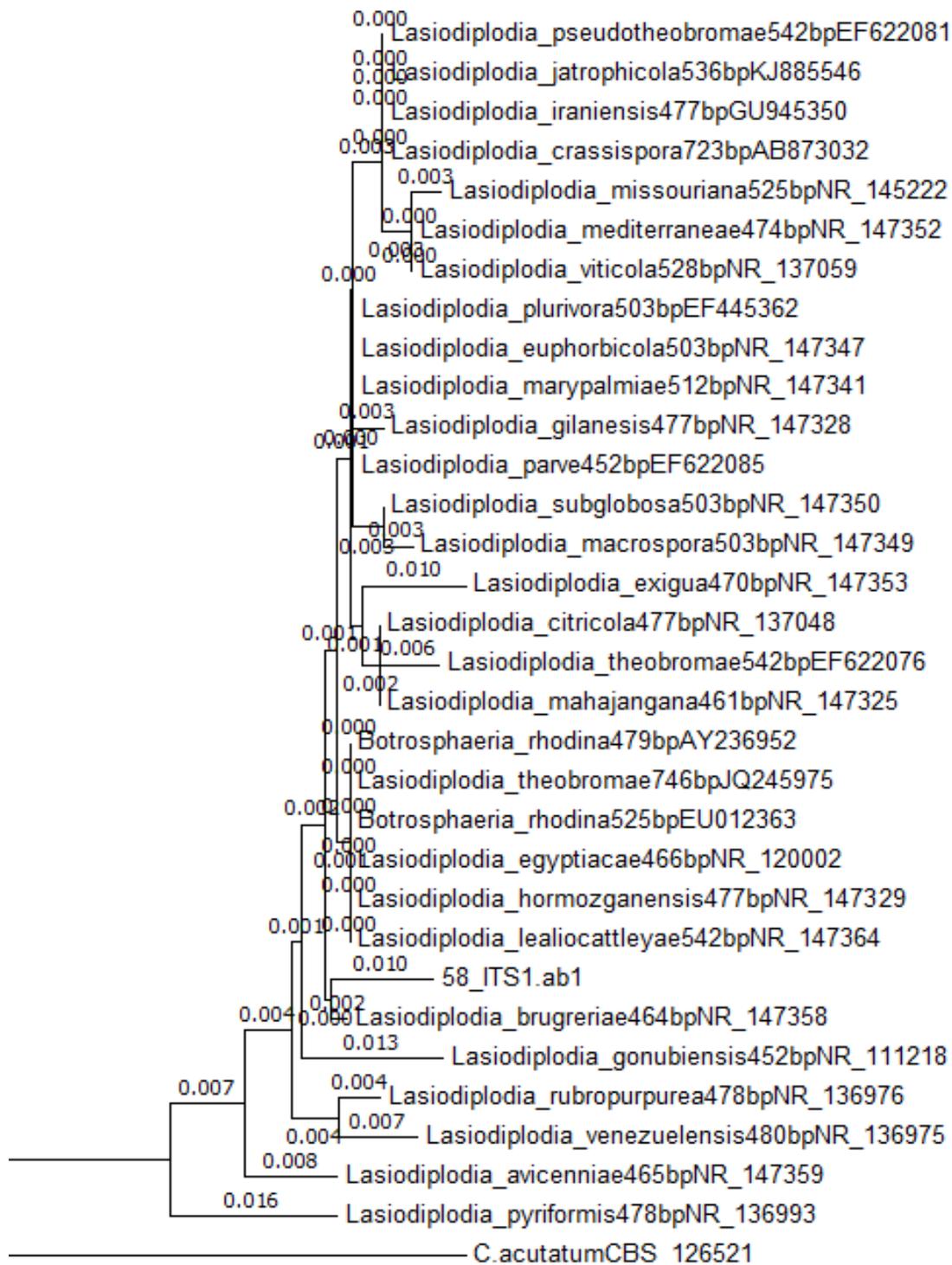


Figura 28: Análisis Neighbor-joining (NJ) de la secuencia ITS de 31 aislamientos del género *Lasiodiplodia*. Los valores de similitud son mostrados encima de cada uno de los nudos del árbol, así como también, los códigos de las accesiones de cada aislamiento.

Resultados

El género *Burkholderia*, se caracterizada por albergar especies ubiquas, presente en muestras de suelo, agua de río, desechos industriales, pacientes con fibrosis quística y pacientes sin esta enfermedad en países como EUA, Francia, Alemania, Bélgica, Portugal, Italia y Reino Unido (E. Vanlaere *et al.*, 2008). “Principalmente se caracterizan por presentar células bacilares gram-negativas sin esporulación, asimilación de glucosa, D-manosa, D-gluconato, adipato, L-malato y citrato. La asimilación de L-arabinosa, D-manitol, N-acetilglucosamina, maltosa, caprato, fenil-acetato, la reducción de nitrato es dependiente de la cepa. Presentan acidificación de glucosa, sacarosa, maltosa, lactosa y adonitol, pero no de xilosa. Las actividades oxidasa y Beta-galactosidasa están presentes, pero no el triptófano, la D-hidrolasa arginina o la actividad ureasa. La licuefacción de gelatina y las actividades de aesculina hidrolasa y lisina y ornitina descarboxilasas dependen de la cepa. 6 de las 13 cepas identificadas presentan Beta-hemolisis” (Vanlaere *et al.*, 2008).

Al correlacionar los caracteres morfológicos y bioquímicos obtenidos para los aislamientos bacterianos 2, 4, 5, 7 y 8 (figura 14), es posible relacionarlas con algunas de las especies pertenecientes al complejo *cepaciae*. Entre estas características se encuentran: la morfología bacilar, tinción gram negativa, asimilación de glucosa y citrato, reducción de nitrato, la actividad oxidasa, Beta-galactosidasa, y licuefacción de gelatina.

De acuerdo con lo anterior y basados en los datos moleculares, es posible afirmar que los aislamientos 2, 4, 5, 7 y 8 pertenecen al género *Burkholderia*, más no es posible identificarlos intra-específicamente. debido a que la región del gen usada en la identificación no brinda la información genética suficiente para poder ser diferenciados en el filograma.

Resultados

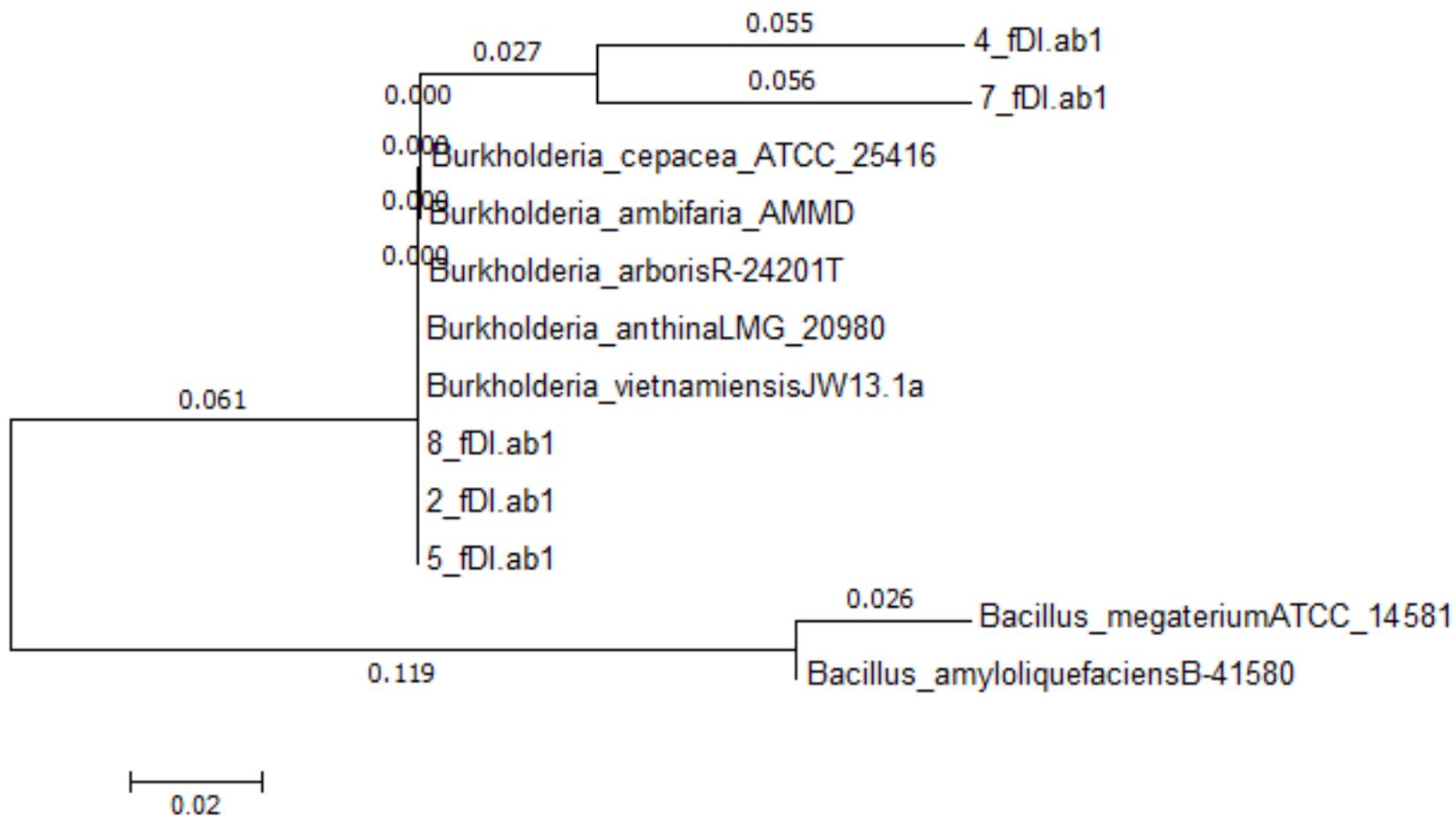


Figura 29: Análisis Neighbor-joining (NJ) de la secuencia FD1 y RD1 de 10 aislamientos del género *Burkholderia*. Los valores de similitud son mostrados encima de cada uno de los nudos del árbol, así como también, los códigos de las accesiones de cada aislamiento.

Resultados

5.5.10. Aislamientos bacterianos 3, 9, 10, 11 y 12.

Basados en los resultados obtenidos con el programa BLAST, para el análisis filogenético de los aislamientos bacterianos se tomaron como referencia la secuencia tipo del género *Bacillus Megaterium* depositada en la base de datos del Gen Bank y las secuencias epi-tipificadas de las especies de *Bacillus sp.* usadas por (Rooney *et al.*, 2009). Debido a que solo se trabajó con una sola región de genoma, se decidió abordar el análisis filogenético a través del método Neighbor-joining (NJ), el cual se desarrolló en el programa MEGA.

A partir del filo-grama obtenido a través del análisis (NJ) (Figura 31) se observa que los diferentes clados formados presentan una similitud genética mayor a 95%, lo cual evidencia la poca divergencia genética intra-específica y su significancia al momento de clasificar los aislamientos dentro del filo-grama. Por otra parte, muestra a los aislamientos 3 y 12 agrupados con una similitud del 100% con la especie *B. Megaterium* y *B. amyloliquefaciens* respectivamente, así como también, a los aislamientos 9, 10 y 11 formando un nuevo sub-clado cercano a la especie amyloliquefacien.

B. amyloliquefaciens y *B. megaterium* son especies pertenecientes al género *Bacillus*, caracterizadas por tener una amplia distribución en ambientes como: suelos, ecosistemas de agua dulce, ecosistemas marinos, tejidos vegetales y ambientes extremos. Algunas de sus características de importancia agronómica son: la solubilización de fósforo, fijación de nitrógeno, producción de auxinas, promoción del crecimiento vegetal y sustancias antagónicas contra diferentes especies de hongos fitopatógenos (Acenet *et al.*, 2011; Badia *et al.*, 2011; 2011). Además, son conocidas por su gran similitud con las especies *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *B. pumilis*. Morfológicamente presentan cadenas de células con forma bacilar, gram-positivas (Priest *et al.*, 1987; Rooney *et al.*, 2009; Fan *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2017). Bioquímicamente se caracterizan por su actividad catalasa positiva, hidrolisis de gelatina,

Resultados

almidón, utilización de citrato de sodio, crecimiento en NaCl (7%), reducción de nitratos y crecimiento a 45°C para la especie *amyloliquefaciens* y 45 y 55°C para la especie *megaterium* (Acenet *et al.*, 2011; Badia *et al.*, 2011; 2011).

Correlacionando estas características morfológicas, bioquímicas y genéticas, es posible afirmar que los aislamientos 3 y 12 si pertenecen a la especie *B. Megaterium* y *B. amyloliquefaciens* respectivamente. con respecto a los aislamientos 9, 10 y 11 presentan características comunes con las especies del caldo más cercano, sin embargo, presentan una divergencia genética que no permite agruparlos, por tanto, es posible inferir, que este grupo podría estar representando una especie nueva dentro del género *Bacillus*; adicionalmente, es posible inferir que se pudo haber presentado una contaminación entre estos últimos ya que morfológica y bioquímicamente el aislamiento 9 es significativamente diferente al 10 y 11.

Resultados

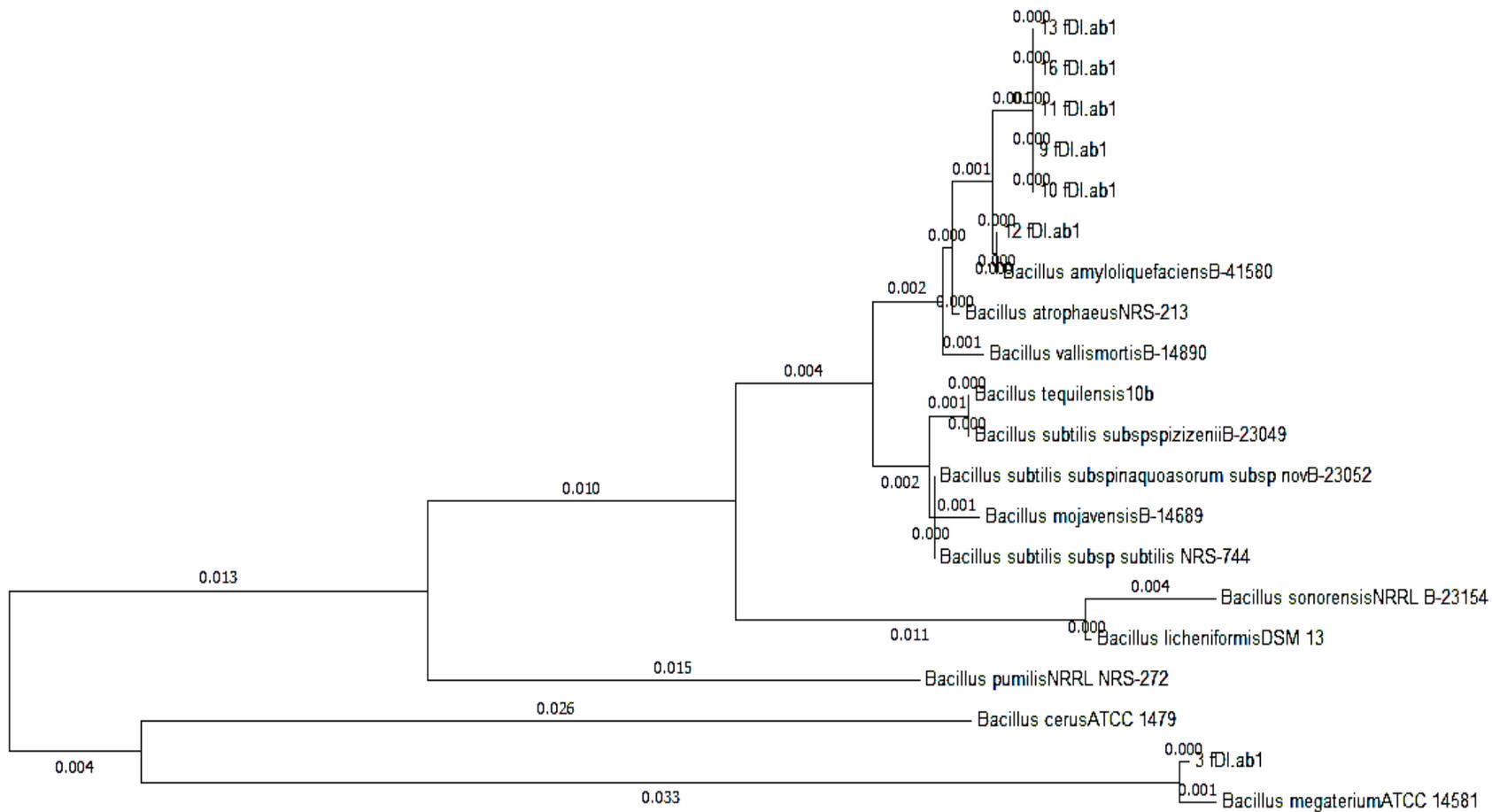


Figura 31. Análisis Neighbor-joining (NJ) de la secuencia FD1 y RD1 de 20 especies del género *Bacillus* sp. Los valores de similitud son mostrados encima de cada uno de los nudos del árbol, así como también, los códigos de las accesiones de cada aislamiento.

6. CONCLUSIONES

Morfológicamente se identificó a nivel de género los siguientes aislamientos fúngicos: (3) especies pertenecientes al género *Fusarium* (T, PP1 y 4P) (2) al género *Aspergillus* (F y M), (1) a *Penicillium* (R), (1) de *Colletotrichum* (J2), y (1) de *Neopestalotiopsis* (U).

Molecularmente se caracterizaron 9 especies fúngicas, de los cuales, 5 se clasificaron a nivel de especie como: *Fusarium fujikuroi* f. sp. *phyllophilum*, *F. solani* f. sp. *xanthoxyli*. *Colletotrichum gloesporioides* f. sp. *fructicola*, *Penicillium. Citrinum* y *Diaphorte. Acaciarum*, Así como también, 4 especies a nivel de género como: *Neopestalotiopsis spp.*, *Aspergillus spp.*, *Lasiodiplodia spp.*, *Fusarium Fujikuroi*.

A través de este estudio se reporta por primera vez las *Fusarium fujikuroi* f. sp. *phyllophilum*, *F. solani* f.sp. *xanthoxyli* y *Diaphorte. Acaciarum*, en Colombia.

Morfológica, cultural y bioquímicamente fueron caracterizados 7 aislamientos bacterianos.

Molecularmente se caracterizaron 4 especies bacterianas, entre estas, 2 a nivel de especie como: *Bacillus amyloliquefaciens* y *B. megaterium*, 2 a nivel del género, como: *Burkholderia* sp., y *Bacillus* sp.

Las especies fúngicas y bacterianas anteriormente mencionadas son reportadas por primera vez como especies asociadas a *B. karatas* en Colombia, y los aislamientos fúngicos como: (T) *Fusarium fujikuroi*, (U) *Neopestalotiopsis spp.*, (Y) *Lasiodiplodia spp.*, como posibles nuevas especies dentro de los géneros o complejos.

7. RECOMENDACIONES

Para corroborar si las especies *Neopestalotiopsis spp.*, *Aspergillus spp.*, *Lasiodiplodia spp.*, *Fusarium Fujikuroi.*, son realmente especies nuevas dentro de estos grupos analizados se recomienda realizar un nuevo análisis molecular adicionando nuevas regiones de genes que puedan brindar mayor información y una mejor visualización de las diferencias genéticas intra-específicas entre las especies analizadas.

Del mismo modo, se recomienda usar nuevas regiones de genes para poder diferenciar y clasificar adecuadamente las especies asociadas al género *Burkholderia sp.*

Con respecto a la caracterización de la actividad de cada uno de los aislamientos sobre la especie *B. karatas* L., se recomienda realizar ensayos de pruebas de patogenicidad, antagonismo y promoción del crecimiento.

8. BIBLIOGRAFÍA.

- Abdollahzadeh J., Javadi A., Mohammadi Goltapeh E., Zare R., Phillips A. J. L. (2010). Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia*. V25: 1–10.
- Adrian-Romero, M. & Blunden, G. (2001). Betaine Distribution In The Bromeliaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*. Elsevier. V9: 305-311.
- Afanador-Kafuri, L., González, A., Gañán, L., Mejía, J.F., Cardona, N., Álvarez, E. (2014). Characterization of the *Colletotrichum* species causing anthracnose in Andean blackberry in Colombia. *Plant Disease*. 98. V11: 1503-1513.
- Aguirre-Santoro, Julian, & Betancur, Julio. (2008). Sinopsis Del Género *Aechmea* (Bromeliaceae) Para Colombia. *Caldasia*. V30 (2): 265-288.
- Alvaro Fajardo, V. M., Morales Puentes, M. E., Larrota- Estupiñan E. F. (2013). Bromeliaceae En Algunos Municipios De Boyacá Y Casanare, Colombia *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* V37(142): 5-18.
- Amorim L., Rezende J, A, M., Bergamin Filho A. (2011). Manual De Fitopatologia. Importância Das Doenças De Plantas. V1(2): 19- 36
- Arctos. Collaborative Collection Management Solution. Taxonomy Details For *Bromelia Karatas*. Ncbi Classification. Revisado El 30 De Abril De 2017. [Http://Arctos.Database.Museum/Name/Bromelia%20karatas](http://Arctos.Database.Museum/Name/Bromelia%20karatas)
- Badía M. M. R., Hernández B. T., Murrel J. A. L., Mahillon J., Pérez M. H. 2011. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* asociadas al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista Brasileira de Agroecologia* V6(1): 90-99.
- Balajee S. A., Houbraken J. Verweij P. E., Hong S. B., Yaghuchi T., Varga J. and Samson R. A. (2007). *Aspergillus* species identification in the clinical setting. *Studies in Mycology* V59: 39–46.
- Bernard Stoner. 1973. The Variegation Problem. *Journal Of The Bromeliad Society*. V23(6): 234.

Bibliografía

- Biomériux. (2002). Api 20e, Identification System For *Enterobacteriaceae* And Other Non-Fastidious Gram Negative Rods. Revisado El 30 De Agosto De 2017 [Http://Faculty.Fiu.Edu/~Makemson/Mcb3020lab/Api20einstructions.Pdf](http://Faculty.Fiu.Edu/~Makemson/Mcb3020lab/Api20einstructions.Pdf)
- Burgess T. I., Barber P. A., Mohali S., Pegg G., de Beer W., Michael J. Wingfield M. J. (2006). Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycologia*, V98(3): 423–435.
- Butcher, D., Gouda, E.J. Cont. Updated. The New Bromeliad Taxon List. Revisado El 22 De Mayo De 2017. [Http://Botu07.Bio.Uu.Nl/Bcg/Taxonlist.Php?Bgcolor=E5e5e5](http://Botu07.Bio.Uu.Nl/Bcg/Taxonlist.Php?Bgcolor=E5e5e5)
- Crous PW, Wingfield MJ, Schumacher RK, Summerell BA et al. (2014). Fungal Planet description sheets, 281–319. *Persoonia* V33: 212–292.
- Dissanayake AJ, Phillips AJL, Hyde KD, Yan JY, Li XH. (2017). The current status of species in *Diaporthe*. *Mycosphere* V8(5): 1106–1156.
- De Prager, S. M., Fernando M. T. y Nelson B. O. (2001). *Microbiología: Aspectos Fundamentales*. Universidad Nacional De Colombia, Palmira. Isbn 9588095069.
- Espejo-Serna, A., López-Ferrari, A. R. And Ramírez-Morillo, I. (2005) *Flora De Veracruz. Bromeliaceae*. Instituto De Ecología, A.C., Xalapa, Veracruz. Universidad De California, Riverside.
- Fan B., Blom J., KlenkH. P. and Borriss R. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* Form an “Operational Group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* Species Complex. *Frontiers in Microbiology*. V8 (22).
- Gañán L, Álvarez E, Castaño-Zapata J. (2015). Identificación genética de aislamientos de *Colletotrichum* spp. causantes de antracnosis en frutos de aguacate, banano, mango y tomate de árbol. *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat.* 39. V152:339-347.
- Geiser D.M., Klich M.A., Frisvad J.C., Peterson S.W., Vargas And Samson. The Current Status Of Species Recognition And Identification In *Aspergillus*. *Studies In Mycology*. V59: 1–10.

Bibliografía

- González D. A. C, Schulte K, Schmidt M, Zizka G (2013) Diversity And Levels Of Endemism Of The Bromeliaceae Of Costa Rica An Updated Checklist. *Phytokeys* V29: 17–61.
- Gottwald, T. R., Da Graça, J. V., And Bassanezi, R. B. 2007. Citrus Huanglongbing: The Pathogen And Its Impact. Revisado El 01 De Agosto De 2017. [Http://Www.Apsnet.Org/Publications/Apsnetfeatures/Pages/Huanglongbingimpact.aspx](http://www.apsnet.org/Publications/Apsnetfeatures/Pages/Huanglongbingimpact.aspx)
- Hall, T.A. (1999). Bioedit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor And Analysis Program For Windows 95/98/Nt. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* N°41:95-98.
- Hammel, B. E., M.H. Grayum, C. Herrera Y N. Zamora (Editores). (2003). Manual De Plantas De Costa Rica. Vol. I: Introducción. *Monographs In Systematic Botany From The Missouri Botanical Garden* V97: 1.-299. (Publicado El 2 De Agosto, 2004).
- Herb Plover. (2013). Our Plant Family *Bromeliaceae*. The New York Bromeliad Society. *Bromeliana*. V50(5).
- Hornung-Leoni, C.T. (2011). Bromeliads: Traditional Plant Food In Latin America Since Pre-Hispanic Times. *Polibotánica*. N°32: 219-229.
- Houbraken J. A. M., Frisvad J. C. y Samson R. A. (2010). Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species. *Fungal Diversity*. V44:117–133
- Ica. Marchitamiento Por Fusarium Rt4 “ *Fusarium Oxysporum* F Sp. *Cubense* Raza 4. Revisado El 31 De Julio De 2017. [Http://Www.Ica.Gov.Co/Areas/Agricola/Mal-De-Panama-4.aspx](http://www.ica.gov.co/areas/agricola/mal-de-panama-4.aspx)
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: An Integrated And Extendable Desktop Software Platform For The Organization And Analysis Of Sequence Data. *Bioinformatics*. V28(12): 1647-1649.
- Kerruish R., M. (1997). Plant Protection 3 Selected Ornamentals, Fruit And Vegetables. *Bromeliads*. B1:B4

Bibliografía

- Kuck P. (2009). Fasconcat, Version 1.0, Zool. Forschungsmuseum A. Koenig, Germany.
- Lee A., Cheng K. C., Liu J. R. (2017). Isolation and characterization of a *Bacillus amyloliquefaciens* strain with zearalenone removal ability and its probiotic potential. Plos one. 1-21.
- López A. I. S., Rivera V. P. Á., Campos D. T. y Romero L. C., 2011. Identificación y caracterización de seis aislados pertenecientes al género *Bacillus* promisorios para el control de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc. Fitosanidad V15: N1.
- Marlatt R., B. 1980. A Severe Disease Of *Aechmea Fasciata*. Journal Of The Bromelias Society. V30(1): 26.
- Miranda, M., Arellano, J., Salazar, B., Hernández, F., Quero, R. & Pérez, L. (2007). Bases Para El Manejo Comunitario De Bromelias Ornamentales. México D.F. Grupo Autónomo Para La Investigación Ambiental A.C, 18-29.
- Montiel Segura, M. A. (2015). Uso De Agroquímicos En La Producción Intensiva De Piña En Costa Rica. Universidad De Costa Rica Sede De Occidente. Pensamiento Actual. V15(25): 183-195.
- Moyano D., Diego; Osorio R., María; Murillo P., Elizabeth; Murillo A., Walter; Solanilla D., José; Méndez A., Jonh; Aristizabal S., Juan; (2012). Evaluación De Parámetros Bromatológicos, Fitoquímicos Y Funcionalidad Antioxidante De Frutos De *Bromelia Karatas*. Bromeliaceae. S439-S441.
- Naturalista. (2017). Revisado El 30 De Abril De 2017. [Http://Www.Naturalista.Mx/Taxa/277363-Bromelia-Karatas](http://www.naturalista.mx/taxa/277363-Bromelia-Karatas)
- Orellana A., Guerra R. y Dávila J. (2004). Sondeo Agro-Socioeconómico Y Recolección De Cultivares De Muta (*Bromelia Sp.*) En El Oriente De Guatemala. Bogotá (Colombia): Icta, 323n Muta 040105, 23 P.
- Ospina-Bautista F., Varón E. J. V., Realpe E. y Gast F. (2008). Diversidad De Invertebrados Acuáticos Asociados A Bromeliaceae En Un Bosque De Montaña. 2r2ev4ista Colombiana De Entomología. V34(2): 224-229

Bibliografía

- Parada, F., Krajewski D., Duque, C., Jager, E., Herderich, M. And Schreie, P. (1996). 1-O-FI-Dglucopyranosyl Anthranilate From Piñuela (*Bromelia Plumieri*) Fruit. *Phytochemistry*, V42(3): 871-873.
- Phillips A. J. L., Alves A., Abdollahzadeh J., Slippers B., Wingfield M. J., Groenewald J. Z., and Crous P. W. (2013). The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*. V76: 51–167.
- Posada *et al.*, 2007. Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). Citado por. Houbraken J. A. M. P., Frisvad J. C., and Samson R. A. (2010). Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species. *Fungal Diversity*. V44: 117-133.
- Priest F. G., Goodfellow M., Shute L.A. And Berkeley R. C: W. (1987). *International Journal of Systematic Bacteriology*. V37: 69-71.
- Rodriguez P., A. And Strong M., T. (2012). *Catalogue Of The Seed Plants Of The West Indies*. Smithsonian Contributions To Botany. Number 98.
- Rongyi Z., Zhiqiong T. And Shanying C. (2003). First Report Of Leaf Rot Caused By *Fusarium Oxysporum* And *Pythium Aphanidermatum* On *Aechmea Fasciata* In Hainan Province, China. College Of Plant Protection, South China University Of Tropical Agriculture, Danzhou, Hainan, China. V87(5): 599. Revisado El 28 De Julio De 2017.
[Http://Apsjournals.Apsnet.Org/Doi/Abs/10.1094/Pdis.2003.87.5.599a](http://Apsjournals.Apsnet.Org/Doi/Abs/10.1094/Pdis.2003.87.5.599a)
- Rojas Triviño, Alberto. (2011). *Conceptos Y Práctica De Microbiología General*. Manual. Universidad Nacional De Colombia Sede Palmira.
- Rooney A. P., Price N. P. J., Ehrhardt C., Swezey J. L. and Bannan J. D. (2009). Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. V59: 2429–2436.
- Rokas A., Payne G., Fedorova N. D., Baker S. R., Machida M., Yu J., Georgianna D. R., Dean R. A., Bhatnagar D., Cleveland T. E., Wortman J. R., Maiti R, Joardar V., Amedeo P., Denning D. W. and Nierman W. C. (2007). What can comparative

Bibliografía

- genomics tell us about species concepts in the genus *Aspergillus*?. *Studies in Mycology*. V59: 11–17.
- Samson R. A., Hong S., Peterson S. W., Frisvad J. C. and Varga J. (2007). Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. *Studies in Mycology*. V59: 147–203.
- Samson R. A., Varga J., And Frisvad J. C., (2007). *Aspergillus* Systematics In The Genomic Era. *Studies In Mycology*. V59: (2011). Taxonomic Studies On The Genus *Aspergillus*. *Studies In Mycology*. V69: 1-17. (2014). Phylogeny, Identification And Nomenclature Of The Genus *Aspergillus*. *Studies In Mycology*. V78: 141-173.
- Sanahuja G. and Palmateer A. J. (2016). First Report Of *Bipolaris Oryzae* Causing Leaf Spot On *Aechmea Tayoensis* In Florida. *Tropical Research And Education Center, University Of Florida, Homestead*. V100(11): 2329. Revisado El 28 De Julio De 2017. [Http://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/pdis-05-16-0610-pdn](http://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/pdis-05-16-0610-pdn)
- Schumann G., L. Plant Diseases: Their Biology And Social Impact. Revisado El 01 De Agosto De 2017. [Http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/pages/lcpp98coffeerust.asp](http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/pages/lcpp98coffeerust.asp)
[x](#)
- Terry R. G And Brown G. K. (1996). A Study Of Evolutionary Relationships In Bromeliaceae Based On Comparison Of Dna Sequences From The Chloroplast Gene *Ndhf*. *Journal Of The Bromelia Society*. V46 (3).
- The American Phytopathology Society. (1988). Common Names For Plant Disease. *Plant Disease*. V69: 649-676.
- Vanlaere E., LiPuma J. J, Baldwin A., Henry D., Brandt E., Mahenthalingam E., Speert D., Dowson C. and Vandamme P. (2008). *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov. and *Burkholderia metallica* sp. nov., novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. V58: 1580–1590.

Bibliografía

Zanella, C. M., Janke, A., Palma-Silva, C., Kaltchuk-Santos, E., Pinheiro, F. G., Paggi, G. M., Soares, L. E.S., Goetze, M., Büttow M. V. And Bered, F. (2012). Genetics, Evolution And Conservation Of Bromeliaceae. *Genetics And Molecular Biology*. V35(4):1020-1026.

Zhou X., O'Donnell K., Aoki T., Smith J. S., Kasson M. T., Cao Z. (2016). Two novel *Fusarium* species that cause canker disease of prickly ash (*Zanthoxylum bungeanum*) in northern China form a novel clade with *Fusarium torreyae*. *Mycologia*. V108(4): 668–681.