



**BACTERIAS DEL SUELO COMO ANTAGONISTAS DE *Monilinia* spp.
Honey. EN CULTIVOS DE DURAZNO (*Prunus persica* L.) DEL NORTE DE
SANTANDER**

ASTRID YESENIA ARAQUE

Trabajo de grado presentado para optar al título de Magister en Biología
Molecular y Biotecnología

Universidad de Pamplona

Facultad de Ciencias Básicas

Maestría en Biología Molecular y Biotecnología Pamplona

2022



**BACTERIAS DEL SUELO COMO ANTAGONISTAS DE *Monilinia* spp.
Honey. EN CULTIVOS DE DURAZNO (*Prunus persica* L.) DEL NORTE DE
SANTANDER**

ASTRID YESENIA ARAQUE

Trabajo de grado presentado para optar al título de Magister en Biología
Molecular y Biotecnología

Directora del trabajo de Grado

Alba Lucia Roa Parra. Ph.D

Universidad de Pamplona Facultad de Ciencias Básicas
Maestría en Biología Molecular y Biotecnología Pamplona

2022

Investigador Principal: Astrid Yesenia Araque

Título académico	Identificación	Correo electrónico	Teléfono	Institución	Grupo de Investigación
Bióloga	1094248724	astrid.araque@unipamplona.edu.co	3167250980	Universidad de Pamplona	Grupo de Investigación en Recursos Naturales.

Coinvestigador: Alba Lucia Roa Parra

Título académico	Identificación	Correo electrónico	Teléfono	Institución	Grupo de Investigación
Ph.D	63440754	albalurp@unipamplona.edu.co	316649024	Universidad de Pamplona	Grupo de Investigación en Recursos Naturales.

INFORMACIÓN GENERAL DEL PROYECTO

Línea de Investigación: Biotecnología
Lugar de ejecución del proyecto: Provincia de Pamplona
Area: Ciencias biológicas
Línea estratégica: Control biológico
Grupo de investigación: Grupo de Investigación en Recursos Naturales. Universidad de Pamplona.
<i>“El presente estudio fue cofinanciado por Colciencias en la convocatoria 753 de 2016 modalidad Jóvenes Investigadores Departamento Norte de Santander a través del proyecto: “Evaluación de la actividad antagónica in vitro de microorganismos nativos contra el patógeno Monilinia sp de cultivos de durazno (Prunus persica) del Norte de Santander”</i>

*Al Dios de Spinoza.
A la vida misma como su manifestación irrefutable.
A todo aquello que me condujo hasta aquí.*

Deus sive natura

CONTENIDO

INFORMACIÓN GENERAL DEL PROYECTO	3
RESUMEN	10
JUSTIFICACIÓN	13
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	14
FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	15
OBJETIVO GENERAL.....	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
MARCO TEÓRICO	20
El Durazno	20
Control biológico	30
Bacillus spp.....	32
Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR):	37
Contextualización sobre Cécota.....	39
Contextualización sobre Chitagá	41
Estado del Arte.....	47
METODOLOGÍA.....	49
Área de estudio y toma de muestras	49
.....	51
Estandarización de metodología de aislamiento de bacterias	51
Preparación	53
Evaluación de antagonismo <i>in vitro</i> e identificación de antagonistas.....	59
Evaluación de antagonismo <i>in vivo</i> e identificación de patógenos	61
Extracción de ADN de <i>Monilinia</i> sp.....	62
Amplificación para determinación de especies de <i>Monilinia</i> spp.	62
Extracción de ADN de bacterias.....	62
Amplificación para determinación de especies de bacterias.....	63
Análisis de bacterias mediante espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier	64
.....	64
Análisis estadístico	64
Consideraciones Éticas del Proyecto	65
RESULTADOS	66
Objetivo Específico 1:.....	66
Aislamiento de cepas de suelos con potencial biocontrolador:	66
Aislamiento de cepas de <i>Monilinia spp</i> de frutos de duraznos contaminados:	70
Objetivo Específico 2:.....	75
Objetivo Específico 3:	89
DISCUSIÓN	105
CONCLUSIONES	113
RECOMENDACIONES.....	114
BIBLIOGRAFÍA	115

LISTA DE TABLAS

Tabla No. 1. Productores de durazno el municipio de Cácuta.....	41
Tabla No. 2. Productores de durazno del municipio de Chitagá.	45
Contextualización sobre Pamplonita.....	46
Tabla No. 3. Productores de durazno el municipio de Pamplonita.....	47
Tabla No. 4. Agar Nutritivo Modificado al 20%	54
Tabla No. 5. Agar Papa Dextrosa Modificado al 20%	55
Tabla No. 6. Agar Papa Dextrosa Modificado al 20%.....	55
Tabla No. 7. Descripción morfológica de las colonias bacterianas aisladas.....	67
Tabla No. 8. Resultados de pruebas bioquímicas de las cepas bacterianas aisladas.	70
Tabla No. 9. Aislamientos de <i>Monilinia</i> spp en cada uno de los 3 municipios con su respectiva codificación.....	71
Tabla No. 10. Resultados de enfrentamientos duales cepa de <i>Monilinia</i> sp. PCPr2 mediante la metodología de Igarashi et al., 1997 (Crecimiento del hongo mm).....	75
Tabla No. 11. Resultados de enfrentamientos duales cepa de <i>Monilinia</i> sp. PCPr2 mediante la metodología de Gómez y Ortega, 1993 (Crecimiento del hongo mm).....	75
Tabla No. 12. Resultados de enfrentamientos duales cepa de <i>Monilinia</i> sp. PCPr2 mediante la metodología de Villamil et al., 2012 (Crecimiento del hongo mm).	76
Tabla No. 13. Resultados de enfrentamientos duales cepa de <i>Monilinia</i> sp. PCPr2 mediante la metodología de Bashan et al., 1996 (Crecimiento del hongo mm).....	76
Tabla No. 14. A. Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas. B. Pruebas de normalidad del crecimiento de la cepa de <i>Monilinia</i> sp PCPr2 en cada protocolo de enfrentamiento. C. Pruebas de normalidad del crecimiento de la cepa de <i>Monilinia</i> sp PCPr2 con cada cepa de <i>Bacillus</i> spp.....	79
Tabla No. 15. Crecimiento (cm) del patógeno PCPr2 en frutos de durazno embebidos con las cepas de <i>Bacillus</i> sp. 6 y 9 en 4 diferentes tiempos.	84
Tabla No. 16. A. Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas. B. Pruebas de normalidad del crecimiento de la cepa de <i>Monilinia</i> sp. PCPr2 en frutos de durazno expuestos a las cepas 6 y 9. C. Pruebas de normalidad del crecimiento de la cepa de <i>Monilinia</i> sp. PCPr2 en frutos de durazno expuestos a las cepas 6 y 9 a las 0, 24, 48 y 72 horas.....	85

LISTA DE FIGURAS

Figura No. 1. Producción de duraznos en el mundo desde 1999 hasta 2020.....	23
Figura No. 2. Producción de duraznos en el mundo desde 1999 hasta 2020.....	23
Figura No. 3. Naciones con mayor producción de durazno desde 1994 hasta 2020	24
Figura No. 4. Árbol de <i>Prunus persica</i> (durazno variedad Gran Jarillo) <i>Monilinia</i> sp.	25
Figura No. 5. Esporulación de <i>Monilinia</i> sp. en frutos de <i>Prunus persica</i>	28
Figura No. 6. Estado teleomorfo de <i>Monilinia</i> sp. Con formación de apotecios.....	29
Figura No. 7. Ciclo biológico de <i>Monilinia</i> sp. en <i>Prunus persica</i>	29
Figura No. 8. Filogenia de máxima verosimilitud de <i>Bacillus</i> usando ARNr 16S.	33
Figura No. 9. Ciclo reproductivo de <i>Bacillus</i>	34
Figura No. 10. A. Metabolitos de <i>Bacillus</i> implicados en el control de fitopatógenos. B. Mecanismo de acción de lipopéptidos.	35
Figura No. 11. Degradación de pared celular de hongos fitopatógenos a través de enzimas líticas.	36
Figura No. 12 Principios de espectroscopia infrarroja.....	38
Figura No. 13. Mecanismo de reflectancia total atenuada.....	38
Figura No. 1. División política del municipio de Cécota. Fuente Ruta del Durazno y del Agua.....	44
Figura No. 15. Ubicación espacial de los predios productores de durazno del municipio de Cécota.	40
Figura No. 16. División política del municipio de Chitagá.	42
Figura No. 17. Ubicación espacial de los predios productores de durazno del municipio de Cécota.	43
Figura No. 18. Ubicación espacial de los predios productores de durazno del municipio de Cécota.	43
Figura No. 19. Ubicación espacial de los predios productores de durazno del municipio de Cécota.	44
Figura No. 20. Área de muestreo (Veredas Batagá de Pamplonita, Ícota de Cécota y Llano grande de Chitagá).....	50
Figura No. 21. Toma de muestras compuestas en fincas cultivadoras de durazno de Norte de Santander.....	51
Figura No. 22. A. Preparación de soluciones agua suelo. B. Autoclaves para esterilización fraccionada de la solución extracto de suelo	53
Figura No. 23. Diluciones seriadas de las muestras de suelo.	56
Figura No. 24. A. Aislamiento de bacterias a partir de soluciones de suelos en Agar Nutritivo Modificado al 20% B. Aislamiento de hongos a partir de soluciones de suelos en Agar Rosa de Bengala Modificado al 20%.....	57
Figura No. 25. Fruto de <i>Prunus persica</i> con lesión característica de <i>Monilinia</i> sp.	58
Figura No. 26. Diluciones seriadas de <i>Monilinia</i> spp.	59
Figura No. 27. A-B. Inoculación de <i>Monilinia</i> sp. en frutos de durazno. C. Inoculación de bacterias antagonistas (cepas 6 y 9) en frutos de durazno.	61
Figura No. 28. Aislamientos de bacterias de suelos correspondientes a Cécota, Pamplonita y Chitagá.	66
Figura No. 29. Bacilos Gram positivos endosporados.....	67
Figura No. 30. Pruebas bioquímicas de las cepas aisladas (A. Hemólisis de sangre. B.	

Hidrólisis de almidón. C. Prueba de reducción de Nitratos. D. Prueba de oxidación-fermentación Xilosa. E. Prueba de oxidación-fermentación Ribosa.....	68
Figura No. 31 . Pruebas API de las 9 cepas de bacterias pre seleccionadas en el estudio.	69
Figura No. 32 . Aislamientos de <i>Monilinia</i> spp. pertenecientes a Cécota, Chitagá y Pamplonita.	71
Figura No. 33 . A. Cultivo de <i>Monilinia</i> spp. en tubo “pico de flauta”. B. Cultivo de <i>Monilinia</i> spp. en papel filtro.....	72
Figura No. 34 . Infección de duraznos con <i>Monilinia</i> spp. previamente aislado y en cultivo monospórico.....	73
Figura No. 35 . Metodología de Igarashi et al., 1997 (1.Cepa 9. 2. Cepa 3.). B.....	78
Metodología de Gómez & Ortega, 1993 (1.Cepa 9. 2. Cepa 3.). C. Metodología de Villamil et al., 2012 (1.Cepa 9. 2. Cepa 3.). D. Metodología de Bashan et al., 1996.....	78
(1.Cepa 9. 2. Cepa 3.).....	78
Figura No. 36 Gráfico de distribución de los valores de crecimiento (medias) de la cepa de <i>Monilinia</i> sp. PCPr2 ante la exposición con cada una de las 9 cepas de <i>Bacillus</i> spp.....	80
Figura No. 37. Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes (medianas) para la distribución del crecimiento de la cepa en cada uno de los 4 protocolos evaluados.	81
Figura No. 38. Prueba Kruskal-Wallis (KW) de muestras independientes (medianas) para la distribución del crecimiento de la cepa de <i>Monilinia</i> sp. PCPr2 ante la exposición con cada una de las 9 cepas de <i>Bacillus</i> spp.	82
Figura No. 39. Comparación por parejas en la prueba Kruskal-Wallis (KW) de muestras independientes (medianas) para la distribución del crecimiento de la cepa de <i>Monilinia</i> sp. PCPr2 ante la exposición con cada una de las 9 cepas de <i>Bacillus</i> spp.	83
Figura No. 40. Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes (medianas) para el crecimiento de la cepa de <i>Monilinia</i> sp. PCPr2 en cada uno de los 4 tiempos evaluados.....	86
Figura No. 41 Prueba Kruskal-Wallis (KW) de muestras independientes (medianas) para la distribución del crecimiento de la cepa de <i>Monilinia</i> sp. PCPr2 ante la exposición a cada una de las 2 cepas de <i>Bacillus</i> spp.	87
Figura No. 42 Pruebas de antagonismo <i>in vivo</i> A-1-2-3. Frutos de durazno cubiertos de la cepa 6 de <i>Bacillus</i> sp. e inoculadas con el patógeno <i>Monilinia</i> sp. PCPr2 a las 72 horas de aplicado el biocontrolador. B-1-2-3. Frutos de durazno cubiertos de la cepa 9 de <i>Bacillus</i> sp. e inoculadas con el patógeno <i>Monilinia</i> sp. PCPr2 a las 48 horas de aplicado el biocontrolador.	88
Figura No. 43 Cepas 6 y 9 cultivadas en Agar Nutritivo.....	89
Figura No. 44 Prueba de catalasa cepas 6 y 9. <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> controles positivos.	91
Figura No. 45 Células vegetativas y esporas de la cepa 6 (A) y 9 (B) y tinción de esporas con Verde de Malaquita (C).	92
Figura No. 46 Cepas 6 y 9 liofilizadas.....	93
Figura No. 47. Espectro FTIR de las cepas 6 y 9 aisladas de suelos de cultivos de durazno.	94
Figura No. 48. Espectro FTIR del ácido dipicolínico encontrado en las cepas 6 y 9 y característico del género <i>Bacillus</i> spp.....	95
Figura No. 49. Espectro FTIR de la Iturina A en las cepas 6 y 9 aisladas de suelos de cultivos de durazno durazno.	96
Figura No. 50. Resultado de la comparación de la secuencia problema contra la base de datos RDP.....	97

Figura No. 51 Resultado de la comparación de la secuencia problema contra SeqMatch-RDP.	98
A.....	98
Figura No. 52 Árbol filogenético de la cepa 6.....	100
Figura No. 53 Árbol filogenético de la cepa 9.....	101
Figura No. 54 Morfología en caja de la cepa de <i>Monilinia</i> sp (PCPr2).....	102
Figura No. 55 A.B. Morfología microscópica de <i>Monilinia</i> sp. (PCPr2). A. Conidióforos 40X. B. Conidios 40X.	103
Figura No. 56. Resultado de la comparación de la secuencia problema contra la basede datos UNITE.	104
Figura No. 57. Resultado de la comparación de la secuencia problema contra la basede datos Warcup fungal RDP	104
Figura No. 58. Espectro de ácido dipicolínico en <i>Bacillus subtilis</i>	110
Figura No. 59. Espectro de la Iturina A en <i>Bacillus subtilis</i>	111

RESUMEN

Hoy lo agrícola se percibe de una manera diferente a través de estrategias que buscan fortalecer el agro mediante el uso sostenible de los recursos naturales al tiempo que se logre el dinamismo del crecimiento agrícola y el desarrollo social equitativo. Colombia posee gran potencial agrícola por sus suelos y climas variados que le otorgan ventajas competitivas para cultivos como frutales.

Lamentablemente, departamentos como el Norte de Santander no han gestionado correctamente sus fortalezas y por tanto poseen bajos índices de competitividad. Teniendo en cuenta que el durazno (*Prunus persica* L.) es un cultivo muy promisorio, pues cada vez es más apetecido por sus propiedades nutracéuticas y que Colombia aumenta años a año significativamente las exportaciones de esta fruta.

Además que dentro del país, el Departamento Norte de Santander (Provincia de Pamplona) es el segundo mayor productor después de Boyacá, se requieren alternativas que ofrezcan valores agregados a los cultivos debido a que los agricultores no cuentan con un apoyo técnico y científico importante para realizar sus labores, situación que pone en riesgo la estabilidad de la producción por la baja variabilidad, la pobreza de los suelos y la pérdida de servicios ecosistémicos como el control de plagas, la fertilidad de suelo, entre otros, situación que facilita la entrada de patógenos como *Monilinia* sp., hongo causante de la podredumbre morena, considerado como el microorganismo causante de pérdidas superiores al 70% en los cultivos de hueso.

Con el objetivo de incentivar mejores prácticas agrícolas como lo promueven los objetivos de desarrollo sostenible se realizó una búsqueda de bacterias aisladas de suelos de los cultivos de durazno del departamento con potencial antagonismo contra el patógeno en

mención. Para ello se realizaron visitas a los tres municipios más productores de la región (CÁCOTA, Chitagá y Pamplonita) y se colectaron frutos con los síntomas característicos de la podredumbre morena para aislar posteriormente el patógeno y realizar una identificación morfológica (macroscópica y microscópica) y molecular de las especies presentes en el departamento.

De igual forma se realizó aislamiento de bacterias provenientes de los suelos de las mismas fincas y aquellas que presentaron morfologías macroscópicas, microscópicas y perfiles bioquímicos referenciados en la literatura como pertenecientes a especies con potencial antagonico para control de fitopatógenos, se aislaron y se identificaron macroscópica, microscópica y bioquímicamente.

Los diferentes morfotipos se evaluaron mediante una metodología de enfrentamiento dual seleccionada por criterios de fácil reproducibilidad, bajo costo y menor índice de contaminación. Las 2 cepas que demostraron mayor porcentaje de antagonismo in vitro (C9 y C6) fueron sometidas a pruebas de patogenicidad en duraznos sanos (in vivo) encontrándose una inhibición del 100% y 88,2% respectivamente, éstas se identificaron molecularmente mediante RNAr 16s llegando a la conclusión de que hacen parte del grupo filogenético de los *Bacillus subtilis* pero no corresponden plenamente con alguna especie conocida por lo que deben cotejarse los resultados moleculares con los bioquímicos, morfológicos, microscópicos y de FTIR-ATR junto a otras pruebas moleculares como MLST (Multilocus Sequence Typing), AAI (Average Amino Acid Identity) o Superárboles.

Estas cepas también fueron caracterizadas químicamente mediante FTIR-IR para determinar las biomoléculas con potencial biocontrolador encontrándose la Iturina A como principal molécula biocontroladora de *Monilinia* sp. y el ácido dipicolínico como

biomarcador para diferenciación de especies del género *Bacillus*. De igual manera la cepa fúngica con mayor patogenicidad evidenciada (PCPr2) en las pruebas in vivo fue identificada morfológica y molecularmente mediante ITS llegando a la conclusión de que se trata de *Monilinia fruticola*.

Palabras clave: lepra, inmunidad innata, SNP, polimorfismos, casos, controles.

JUSTIFICACIÓN

El presente estudio se constituirá en un aporte a la optimización de la cadena productiva del durazno con el fin de apoyar los procesos de mejora de la competitividad de la región. Para tal fin se evaluarán microorganismos nativos con características antagónicas contra el patógeno *Monilinia* sp. De acuerdo al Plan de desarrollo para el Norte de Santander 2020 – 2023, esto debe ser prioridad debido al gran potencial del Norte de Santander en ejes de desarrollo estratégico como la agroindustria pues dicho potencial al ser priorizado contribuye enormemente en eliminar la brecha existente entre los indicadores nacionales y los departamentales que ubican al Norte de Santander por debajo del promedio nacional.

Este trabajo pretende enfocar las acciones al fortalecimiento del subsector hortofrutícola por comprender su importancia para la región en cuanto a que, como lo menciona el Plan de desarrollo para el Norte de Santander, las frutas y las verduras son reactivadoras del crecimiento del sector agrícola, dinamizadoras de la economía, además de que generan empleo y proveen seguridad alimentaria.

Adicionalmente y como objetivo primario se debe realizar investigación básica y aplicada en productos agrícolas como el durazno, desarrollando estudios sobre variedades de cultivos, manejo integrado de plagas y enfermedades y biotecnología, conducentes a elevar la productividad y competitividad del sector. En este sentido, el uso de organismos como controladores biológicos representa una alternativa al uso indiscriminado de productos químicos que ha desencadenado altos índices de contaminación de los ecosistemas al tiempo que ha favorecido la selección de organismos patógenos resistentes.

Los antagonistas biológicos de patógenos de plantas aumentan las ganancias económicas y las exportaciones por estar libres de contaminantes, protegen al medio

ambiente y a los agricultores, lo que consecuentemente aumenta la productividad local, regional y nacional (Ibarra et al., 2006), sin contar con el fortalecimiento de la labor científica del departamento.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto antagonista de bacterias nativas de Norte de Santander en el control biológico de la infección por *Monilinia* sp. en cultivos de durazno, que resulten en alternativas viables al uso de fungicidas de síntesis química, optimizando así la cadena productiva del durazno como aporte a la competitividad de la región?

FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Es preciso que la sociedad comience a percibir a la agricultura de manera diferente, debe prevalecer una visión donde las empresas, las cooperativas y los campesinos de pequeña y mediana escala compartan espacios comunes de producción y acudan al mercado en igualdad de condiciones, desde la producción diversificada, el procesamiento, almacenamiento y servicios, hasta la distribución y comercialización; siempre con el objetivo de satisfacer al máximo las demandas sociales y con un resultado económico palpable para lograr un acceso equitativo a la cadena de valor (Misión para la Transformación del Campo, 2014).

En este mismo sentido, los países denominados en desarrollo, deben estructurar las políticas y estrategias que impulsen y fortalezcan el agro mediante el uso sostenible de los recursos naturales al tiempo que se logre el crecimiento dinámico de la agricultura a la par de un desarrollo social con equidad (Perfetti et al., 2013). En el caso de Colombia, deben dinamizarse los productos no tradicionales con potencial exportador para otorgarle al país capacidad competitiva en los mercados mundiales, además de permitir la participación de los pequeños productores reduciendo el desempleo, la informalidad y la pobreza (Becerra y Patricia, 2010). Sin embargo, cabe resaltar que de acuerdo al IGAC (2012) de 22,1 millones de hectáreas con potencial agrícola en Colombia, sólo se utilizan 5,3 millones. El potencial agropecuario del territorio está próximo al 36,2% del territorio, del cual sólo el 19,3% corresponde a la agricultura y el 3,55% a sistemas integrados con el bosque (agrosilvolopastoril). Ese potencial de expansión del área agrícola sin afectar los

bosques, permite que la FAO ubique a Colombia en el puesto 25 entre 223 países con potencial de expansión de tierras para uso agrícola de la tierra, lamentablemente, sólo el 8% del potencial es usado (Perfetti et al., 2013).

Debido a que Colombia es uno de los países con mayor oferta de suelo y clima del mundo, posee una ventaja comparativa y competitiva para el desarrollo de cultivos tropicales como es el caso de algunas frutas (Navas et al, 2021). A pesar de ello departamentos del país como el Norte de Santander no se están beneficiando de dicha ventaja pues este está ubicado en la posición 17 de 25 regiones en el Índice Departamental de Competitividad (IDC) del 2015 con una calificación de 4,19 sobre 10, experimentando una desmejora en el nivel con respecto al 2014 en el que se ubicaba en el puesto 13. Pilares como el tamaño de mercado, educación superior y capacitación e infraestructura sufrieron dicho detrimento de forma importante (Plande desarrollo para el Norte de Santander 2020 — 2023).

Cabe resaltar que, dentro de los frutales, la cadena de caducifolios para el 2010 presentó un incremento del 36,4% del área cosechada respecto al año anterior para el país. Los principales aumentos registrados en porcentaje se dieron para el melocotón y durazno (77%) seguido de la pera (75%) y la manzana (64%) (FAOSTTAT, 2012). La producción de durazno, específicamente, a nivel mundial, ha registrado el mayor incremento en relación con los demás frutales de hoja caduca (Llamas et al., 2006).

En el Norte de Santander el durazno es cultivado principalmente al sur (Provincia de Pamplona); en el 2011 se reportaron 505,4 hectáreas sembradas con un rendimiento de 11,6 toneladas por hectárea, y para el 2014 aumentaron 290 hectáreas sembradas, evidenciando un rendimiento de alrededor de 13,3 toneladas por hectárea (Plan de desarrollo para el Norte de Santander 2020 — 2023), este aumento convirtió al Departamento tal vez en el primer

productor nacional de durazno no sólo por área sembrada sino por productividad por planta. Sin embargo, la producción de durazno en la Provincia de Pamplona, está caracterizada por una introducción de frutos sin estudios técnico- científicos, apoyado básicamente en la intuición de campesinos durazneros de la Colonia Tovar en el Estado Miranda en Venezuela.

El área sembrada está creciendo sin un horizonte determinado en un proyecto de un organismo del Estado, sin asistencia técnica más que la sanitaria prestada por el ICA cuando se presentan enfermedades que afecten el umbral económico del cultivo. Tampoco existen controles previos al uso de agroquímicos, ni respaldan el manejo de los cultivos con fundamentos técnicos o científicos. (Peñaranda, 2012). El departamento posee una muy baja inversión en Ciencia, Tecnología e Investigación y en patentes; a pesar de que la agricultura, ganadería, silvicultura y pesca representan el 10,3% de su economía. El PIB departamental asciende a 11.027.387 COP es decir un 80% menos de ingreso medio que el resto de Colombia.

En el Norte de Santander las exportaciones fueron de US\$ 272,8 millones durante el año 2014 presentando una variación del -32,3% respecto al 2013; mientras que las exportaciones durante enero - noviembre de 2015 fueron de US\$ 182,1 millones, variando -28,2% respecto al mismo periodo del año anterior. En lo referente al sector agropecuario, este se ubica en el quinto renglón de la economía del Norte de Santander con un crecimiento promedio cercano al 1% anual, lo que demuestra un incremento muy lento (Plan de desarrollo para el Norte de Santander 2020 — 2023). En cuanto al índice Departamental de Competitividad, el departamento ocupa la posición 21 de 33 en sostenibilidad ambiental y la 29 en mercado laboral.

Un problema de los cultivos de esta región es el número reducido de variedades

usadas en las siembras, la cual los hace susceptibles a diferentes enfermedades (Mastrapa, Rodríguez y Rodríguez, 2004) como la podredumbre morena del durazno (*Prunus* sp.), causada por el hongo *Monilinia* spp. Su importancia radica en que ataca desde la floración, los brotes y ocasiona finalmente la destrucción de los frutos. En condiciones óptimas de desarrollo de esta enfermedad, resulta muy difícil controlarla.

En el periodo de postcosecha las pérdidas pueden llegar a niveles superiores del 80% cuando las condiciones climáticas son favorables para el desarrollo de la enfermedad (agua libre sobre el fruto o elevada humedad relativa). Los periodos de lluvias favorecen el incremento de la infección en este sentido vale la pena tener presente que los próximos periodos intensos de lluvias en el país seguramente aumentarán las pérdidas causadas por este y otros hongos en los cultivos de durazno de la región. Actualmente, la principal estrategia para el control de *Monilinia* sp en campo se basa en la aplicación de fungicidas de síntesis química, sin embargo, dicha estrategia por sí sola no es efectiva ya que en el tiempo se desarrolla resistencia a estos productos, sin contar con que la legislación es cada vez más estricta debido a que debe asegurarse la salud humana y la conservación del medio ambiente (Casals et al., 2015).

OBJETIVO GENERAL

Evaluar bacterias nativas con capacidad antagónica *in vitro* contra *Monilinia* sp. aislado de cultivos de durazno del Norte de Santander.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer metodologías de aislamiento para bacterias nativas con potencial antagónico y el patógeno *Monilinia* sp. asociados a cultivos de durazno del Norte de Santander.
- Establecer la capacidad antagónica *in vitro* y en frutos de bacterias nativas aisladas de cultivos de durazno en el control del crecimiento del patógeno *Monilinia* sp. previamente caracterizado.
- Caracterizar el fitopatógeno y las bacterias nativas aisladas asociadas a cultivos de durazno que presenten la mayor capacidad de control del crecimiento de *Monilinia* sp. hasta la mínima categoría taxonómica posible.

MARCO TEÓRICO

El Durazno

El durazno pertenece al género *Prunus*, miembro de la familia Rosaceae. El género *Prunus*, dentro de la subfamilia Prunoideae, es caracterizado por especies que producen frutas en drupa (también conocidas como frutas de hueso), y contiene un número significativo de especies de importancia agrícola [almendras (*Prunus dulcis* Mill.), albaricoque (*Prunus armeniaca* Linn.), Cereza dulce (*Prunus avium* L.) y guindas (*Prunus cerasus* L.), el ciruelo (*Prunus japonica* y *Prunus domestica*) y el durazno (*Prunus persica*)]. Es un árbol de 3 a 5 metros de altura, posee un ciclo juvenil corto lo que permite que esté produciendo su máximo potencial al tercer año de edad. Las hojas son planas, con márgenes enteros u ondulados, y aserrados. La hoja es oscura en la región adaxial y el color de las venas principales se relaciona con el color de la pulpa del fruto. Las raíces llegan hasta 50-60 cm de profundidad, son de color naranja claro jóvenes y se van oscureciendo, presentan grandes lenticelas (Bassi y Monet, 2008).

Las yemas están en la base de las hojas y cada nudo contiene tres yemas: dos florales laterales y una vegetativa en centro (Jackson et al, 2011).

Sus flores son hermafroditas, rosadas y solitarias, pero en ramas mixtas se agrupan de 2 o 3. Aunque es una especie que puede ser polinizada por insectos, la mayoría de las variedades son auto fértiles. La autopolinización es de hasta el 90% lo que hace que se formen muchos frutos por lo que se debe hacer raleo para reducir el número y así alcanzar un tamaño comercial (Bassi y Monet, 2008).

El fruto es una drupa con pubescencia, con pulpa amarilla, naranja y algunas variedades con tintes rosados. El tamaño depende de la variedad, pero el peso promedio está

entre los 50 y los 200 gramos. Algunos son esféricos, otros alargados. El exocarpo del fruto es tomentoso. Los duraznos blancos poseen sabor y aroma distintos, pero son muy blandos y susceptibles a daño mecánico y al pardeamiento de la pulpa, en cambio los duraznos amarillos los carotenoides enmascaran la oxidación de los tejidos (Bassi y Monet, 2008).

La semilla puede estar adherida o no a la pulpa lo que les da el destino de si serán para conserva o mesa, respectivamente. Genéticamente, no son muy variables y los cultivos son muy homocigóticos porque han sido auto fecundados repetidamente (Ryugo, 1993).

Este fruto posee gran cantidad de vitaminas y minerales (Pinzón et al., 2014), se caracterizan por su gran contenido de fibra dietética y alimentaria (polisacáridos y ligninas) lo que ayuda a desarrollar y mantener el microbiota intestinal. Dentro de los compuestos encontrados en esta fruta están los flavonoles, catequinas, antocianinas y carotenoides lo que implica que aportan beneficios a la salud humana pues sus compuestos inciden en la prevención del cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas y la diabetes (Campos, 2013).

Es originario de China septentrional y fue introducido a Persia (hoy Irán) a través del comercio de seda, en la literatura China del 2000 a.C se hace referencia al cultivo mediante descripciones de sus frutos y flores. Todo ese comercio permitió que el cultivo pasara rápidamente a Europa. Posteriormente se reporta su presencia en México en el siglo XVI debido a la colonización española (Pinzón et al., 2014).

Llega a Colombia probablemente por comunidades religiosas, pero fue el Instituto Colombiano de la Reforma Agraria (INCORA) quien realizó un esfuerzo por introducir las variedades “Rey Negro” y “Roubidux”, “Elberta Gigante” y “Melocotones” y en el país se originó la variedad “Camuezo” el cual es portainjerto pues es tolerante a nemátodos (Eraso,

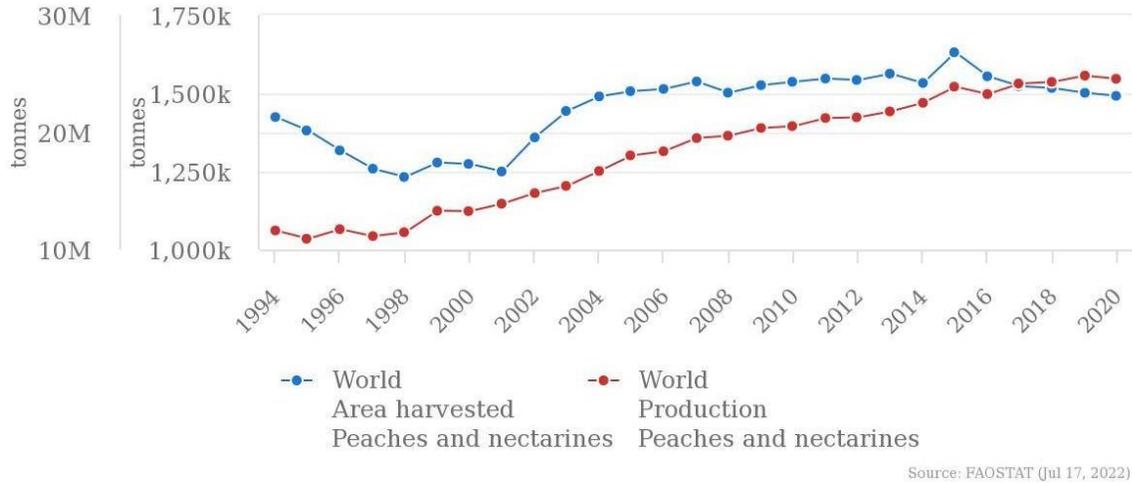
1988). En Colombia fue cultivado en los valles de Tundama y Sugamuxi en Boyacá. Entre las décadas de 1970 y 1980, productores oriundos de la provincia de Pamplona emigraron hacia la zona productora de durazno en Venezuela donde aprendieron cómo manejar estos materiales, con el propósito de desarrollar alternativas rentables frente a los cultivos de papa y trigo de la región. En la época de 1980 el ICA realizó el primer curso de frutales de clima frío en Pamplona.

La producción mundial de durazno se ha incrementado en las últimas décadas, pasando de 11.627.659 toneladas en 1994 a 24.569.744 en 2020 provenientes de árboles sembrados en 1.491.817 hectáreas por lo cual el rendimiento promedio fue de 16,5 ton/ha (Figura 1). En cuanto a Colombia (Figura 2) se ha observado un incremento importante en la producción las últimas dos décadas pasando de 5.300 toneladas en 1999 a 32.985 en 2020 (FAOSTAT, 2020). Lo anterior indica que el aporte de Colombia al mercado mundial de durazno es tan solo del 0,13% pero que es una participación con tendencia al ascenso año a año. Los países más productores son los asiáticos y europeos, en el continente americano Estados Unidos y Chile lideran el mercado (Figura 3.).

En el plano nacional, el Norte de Santander ha incrementado su producción en las últimas décadas, convirtiéndose en el segundo mayor productor de Colombia (27,2% de la participación en el mercado nacional) detrás de Boyacá (60,5%), éstos dos junto a Cundinamarca y Santander poseen condiciones similares a las del lugar de procedencia lo que los convierte en lugares propicios para el establecimiento de la especie *Prunus persica*. El cultivo se encuentra principalmente en municipios entre los 1600 y 3332 msnm (Pinzón et al., 2014). El sistema de producción de durazno en Colombia es de predominio de pequeñas empresas campesinas con extensiones de 2,8 ha en promedio (Puentes et al., 2008).

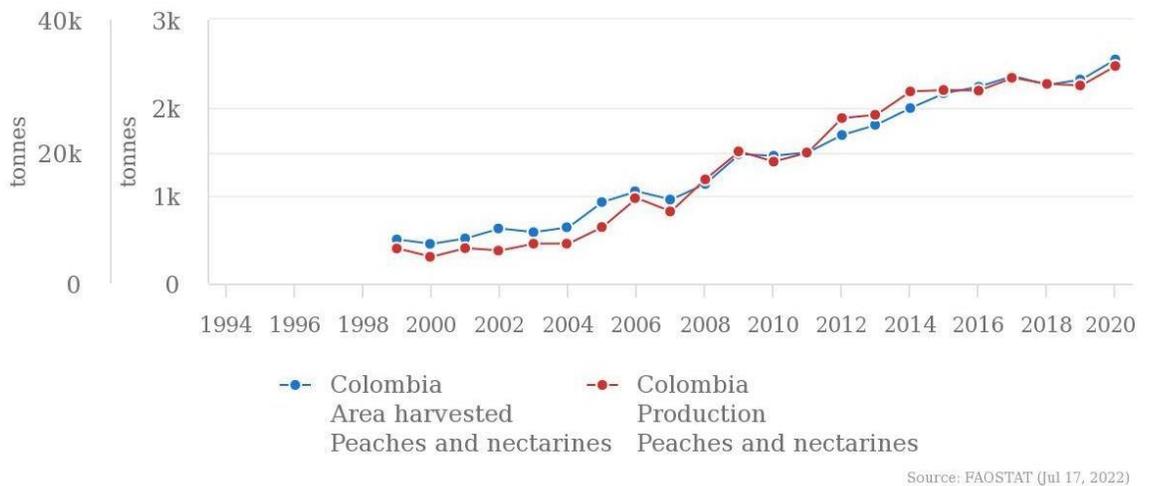
En el departamento Norte de Santander a diferencia de Boyacá y Cundinamarca predominan las variedades Jarillo y Gran Jarillo, provenientes de Venezuela (Campos, 2013).

Figura No. 2. Producción de duraznos en el mundo desde 1999 hasta 2020.



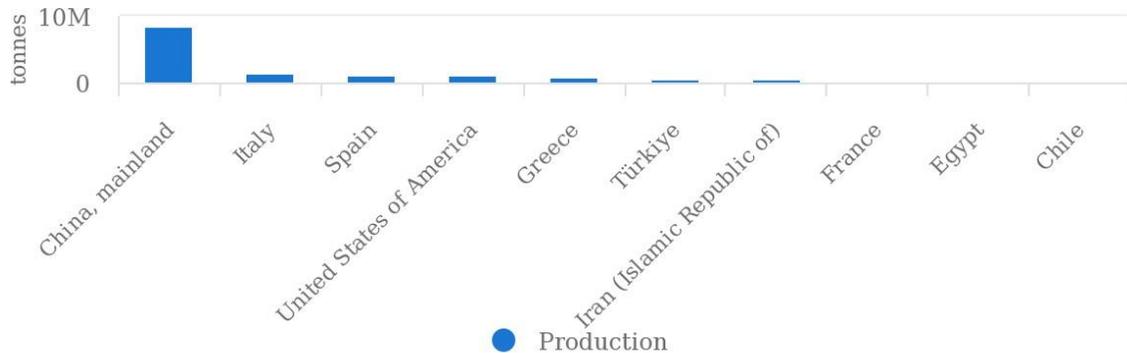
Fuente: FAOSTAT(Julio, 2022).

Figura No. 3. Producción de duraznos en el mundo desde 1999 hasta 2020.



Fuente FAOSTAT(Julio, 2022).

Figura No. 4. Naciones con mayor producción de durazno desde 1994 hasta 2020



Source: FAOSTAT (Jul 17, 2022)

Fuente: FAOSTAT (Julio, 2022).

Es un frutal sembrado comúnmente en áreas tropicales altas por lo que los municipios de clima frío la han encontrado como una alternativa económica.

Dentro de sus exigencias climáticas se encuentran que su lugar de siembra debe tener varias horas de brillo solar para el crecimiento y fructificación, se puede sembrar entre los 1700 y 2700 msnm. En lo referente a precipitaciones es poco exigente, son suficientes 500 — 600 mm para obtener una buena cosecha, pero se requiere riego en los meses de sequía (Pinzón et al., 2014). Necesita temperaturas nocturnas moderadas que no deben superar los 12-14°C. La temperatura promedio del mes más frío debe ser mayor de 13°C y el frío no debe bajar a 1°C pues se causaría daño en el desarrollo de los frutos (George et al., 1988).

En la actualidad el reto para los cultivadores de durazno es adaptarse al cambio climático, reducir el uso de plaguicidas optimizar el manejo de la fruta pre y pos cosecha así mejorar la logística para adaptarse a los diferentes mercados, el control de plagas y enfermedades (Fachinello et al., 2011).

La variedad sembrada en la provincia de Pamplona es en su mayoría la Gran Jarillo (Figura 4) que se caracteriza por su piel rojiza con tonalidades amarillas, su pulpa amarilla con coloración rojiza alrededor del hueso. Forma ligeramente redondeada y de tamaño

grande con peso aproximado de 150 g. Presenta buena resistencia a la manipulación pos cosecha. Este fruto proveniente de Venezuela (Colonia Tovar, Jarillo), se estableció con buena adaptación en el departamento de Norte de Santander especialmente en los municipios de Pamplona, Chitagá, Silos y de Cócota. Las plantas son de gran tamaño debido a la distancia de plantación establecida de 6 a 7 m entre plantas. Para este cultivo en el Norte de Santander se han encontrado una serie de limitantes dentro de las que se encuentran enfermedades como la pudrición café o monilia (*Monilia fruticola*) lo que causa grandes pérdidas en el cultivo. Adicionalmente se ha identificado que en los cultivos no se aplican buenas prácticas de manejo y son artesanales, se manejan con alto número de fumigaciones con productos altamente tóxicos, los frutos salen manchados por el uso de productos químicos y se pierde más del 30% del producto final (Miranda et al., 2013).

Figura No. 5. Árbol de *Prunus persica* (durazno variedad Gran Jarillo)

Monilinia sp.



Fuente: Autores.T(Julio, 2022).

Una de las principales enfermedades del género *Prunus* sp. es la podredumbre morena causada por hongos del género *Monilinia* sp. Este es perteneciente a la subdivisión Ascomycotina y a la familia Sclerotiniaceae y se caracterizan por formar un "pseudostroma miceliar subcuticular, generalmente plano, que da lugar a las fructificaciones esporíferas, tanto asexuales en esporodoquios y pequeñas cavidades como sexuales en apotecios". Produce dos tipos de esporas: ascosporas de origen sexual, contenidas en ascas en cuerpos fructíferos denominados apotecios y conidios en cadenas de origen asexual. Las ascosporas se producen en el suelo, en los apotecios que se forman en las momias que quedaron del año anterior semienterradas y protegidas por los pastos.

Los conidios se producen sobre la planta en los órganos atacados (frutos momificados, canchales, pedúnculos donde hubo una momia). El primer órgano en ser atacado es la flor produciéndose el marchitamiento, o atizonamiento de la misma. Los estambres, pistilos, pétalos o sépalos pueden ser invadidos por el hongo, se producen pequeñas manchas marrones, que se extienden a toda la flor para luego tornarse atizonada. Sobre estas flores atacadas y en condiciones de alta humedad se puede apreciar el signo del hongo consistente en micelio y conidios en cadena de color grisáceo.

La flor atizonada puede caer o permanecer adherida a la rama. En este último caso, si continúan las condiciones favorables (alta humedad y temperatura) el hongo avanza desde la flor por el pedicelo hacia la rama produciendo canchales.

Estos canchales son de color oscuro (marrón) algo deprimidos y en condiciones de alta humedad se observa la producción por parte de la planta de exudados gomosos sobre los mismos. También se puede observar el signo sobre ellos. El cancro puede anillar la rama produciendo la muerte de la misma. El micelio desarrollado en estos órganos se introduce en

lostejidos de la corteza y los va colonizando poco a poco.

Primeramente, estos pierdenturgencia, se decoloran y mueren. Los frutos jóvenes son infectados por las flores contaminadas en los primeros estadios de su desarrollo. Mientras son verdes, éstos muestran generalmente resistencia a la infección. En la etapa de madurez los frutos son atacados produciéndose el síntoma de podredumbre morena que le da nombre a la enfermedad. La misma consiste en una podredumbre firme, de color marrón que avanza rápidamente tomando todo el fruto. Sobre esta podredumbre del fruto se aprecia la esporulación del hongo de aspecto pulverulento y de color gris. El fruto atacado se descompone si cae al suelo, o se momifica si permanece sobre el árbol. En ataques severos las ramas que sostienen a los frutos se secan y mueren (Mondino, 2002).

En post cosecha continúa la infección y es allí donde se dan las principales pérdidas. La infección comienza con una pequeña mancha marrón que se extiende rápidamente. En estas áreas epidérmicas dañadas aparecen pústulas de hifas esporíferas (conidióforos) que rompen la epidermis y son portadores de los conidios. Generalmente estas fructificaciones se sitúan en forma concéntrica dando bandas que toman un aspecto característico (Figura 5).

Figura No. 6. Esporulaci3n de *Monilinia* sp. en frutos de *Prunus persica*.



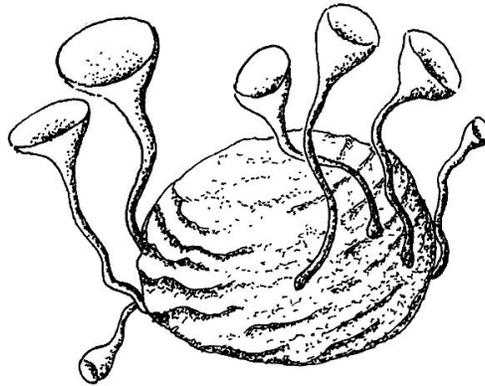
Fuente: Autores. (2022)

El micelio vegetativo se desarrolla al interior del fruto y destruye los tejidos del mesocarpo que se ablandan y van perdiendo agua, de esta forma los frutos que caen al suelo y los que permanecen en el 6rbor se momifican, lo que los convierte en la principal fuente de infecci3n para un nuevo ciclo. Durante la maduraci3n de los frutos, los mosquitos generalmente *Drosophyla* sp. transmiten los conidios, contaminando los frutos y extendiendo la enfermedad en los cultivos (Tuset et al 2007). Posteriormente en tiempo h6medo en la superficie de los duraznos momificados se forman p6stulas de conidi3foros que contienen cadenas de conidios, este es el estado anamorfo del hongo.

Por su parte las esporas sexuales se producen en los apotecios formados en los frutos momificados en el suelo (Figura 6) pero no se producen en todos los ambientes por lo que el estado teleomorfo es dif6cil de observar. Los conidios germinan en condiciones de humedad superior al 80% y a partir de all6 el micelio formado invade la capa suepid6rmica de frutos y tallos, deshidrat6ndolos y produciendo la muerte de 6stos (Figura 7), aqu6 inicia nuevamente el ciclo. Los frutos infectados en las plantas pueden desarrollar la enfermedad post cosecha infectando otros frutos y por lo tanto permitiendo el avance de la enfermedad a la vez que se

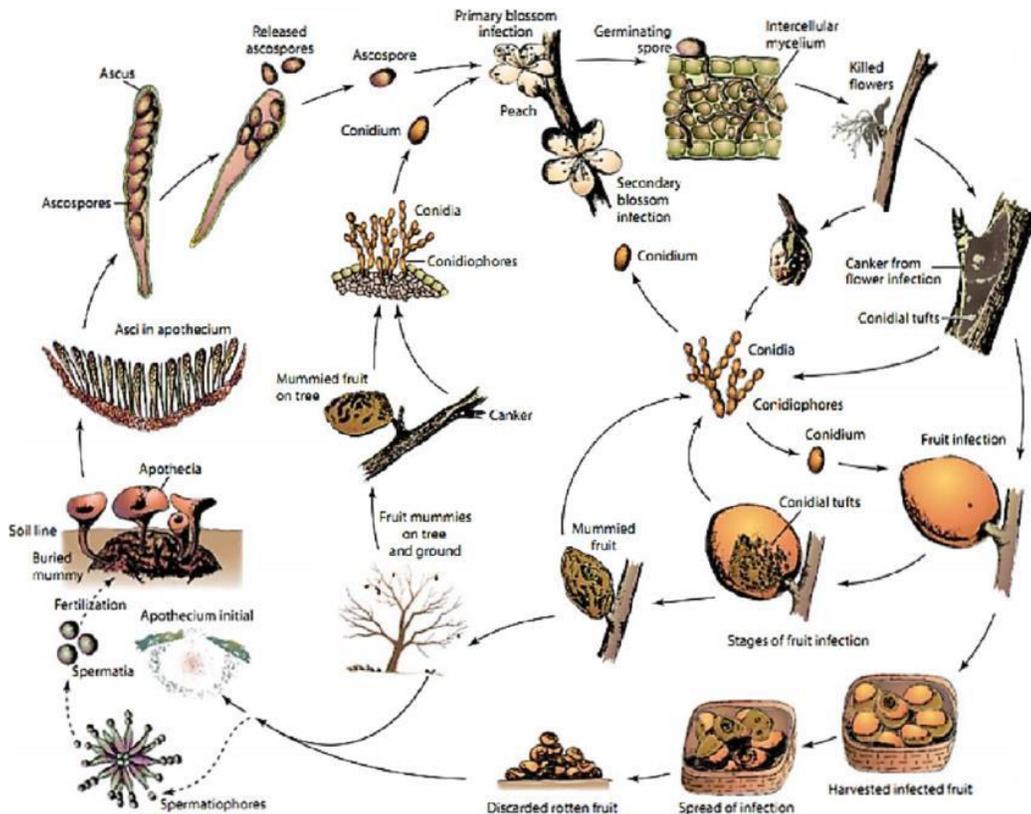
disminuyen las ganancias de los productores (Tuset et al., 2007).

Figura No. 7. Estado teleomorfo de *Monilinia* sp. Con formación de apotecios.



Fuente: Tuset et al., 2007.

Figura No. 8. Ciclo biológico de *Monilinia* sp. en *Prunus persica*.



Fuente: Tuset et al., 2007.

Teniendo en cuenta que el departamento Norte de Santander y dentro de él la Provincia de Pamplona es la segunda región de mayor producción de durazno en Colombia

(Peñaranda., 2012), se requiere realizar estudios enfocados a comprender el estado actual de los cultivos y las posibilidades de optimizar el rendimiento de las cosechas sin afectar los ecosistemas propios de la región con el uso de agroquímicos para el control de enfermedades.

Comprendiendo, que el principal objetivo de la sociedad actual es conseguir el desarrollo sustentable, entendido como la administración eficiente de los recursos naturales mejorando el bienestar de la población actual, sin comprometer el de las generaciones venideras. Aquellos sistemas de cultivo que pueden mantenerse indefinidamente, que contribuyen a la conservación de los recursos, que son competitivos a nivel comercial y protegen el medio ambiente, se definen como artífices de desarrollo sostenible. Desde inicios del siglo XIX se concibe el control biológico reconociéndose el papel de los organismos vivos o sus metabolitos en la eliminación o reducción de los daños causados por organismos perjudiciales. Dentro de sus ventajas se encuentra el reducido o nulo efecto colateral hacia otros seres vivos distintos al patógeno, es muy escasa la resistencia de las plagas a los controladores, posee efectos permanentes, se reduce la contaminación, no existen problemas de intoxicaciones, entre otras (Guédez et al., 2008).

Control biológico

El control biológico o biocontrol consiste en el uso de organismos o los compuestos o extractos de ellos que tienen la facultad de disminuir los efectos negativos de un patógeno sobre los cultivos. Su efectividad depende de las interacciones entre patógenos, biocontroladores, ambiente y planta. Su uso se centra en la reducción del uso de agroquímicos con el objetivo de realizar un control ambientalmente sostenible. Un biocontrolador efectivo debe seleccionarse rigurosamente, basándose en información de sus interacciones.

Los métodos de selección de biocontroladores incluyen métodos de tamizaje *in vitro* mediante pruebas de enfrentamientos directos, difusión en placa, inhibición de germinación de conidias o de crecimiento y la bioautografía (Balouiri et al, 2016). Los métodos anteriormente descritos tienen su fundamento en detectar producción de metabolitos secundarios o enzimas con potencial inhibitorio de patógenos.

Otro tipo de ensayos incluyen evaluaciones en tejidos vegetales incluyendo las plantas completas en los invernaderos en condiciones controladas las cuales permiten evaluar la eficiencia y adicionalmente encontrar en ellos características de incompetencia, parasitismo o inductores de resistencia, características no observables en ensayos *in vitro*. Los ensayos *in vivo* poseen limitaciones pues requieren mayor tiempo de evaluación y por requerir gran cantidad de espacio y ser costosos se limita el número de aislamientos a evaluar. De igual forma, muchos de los resultados evidencian diferencias en el control biológico bajo condiciones controladas respecto al campo por lo cual se deben hacer ensayos brindando a los microorganismos controladores las condiciones reales del cultivo, lo cual permite evaluar su desempeño, formulación, dosis, forma de aplicación, etc. Debido a todo lo anterior se propone combinar los ensayos *in vivo* e *in vitro* (Vinchira y Moreno, 2019).

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) autoriza en la actualidad más de 100 aislamientos de microorganismos biocontroladores en su mayoría bacterias del género *Bacillus*, *Pseudomonas*, y hongos *Trichoderma*, estos actualmente forman parte de productos comercializados por grandes laboratorios. Sin embargo, el uso de estos productos no es tan extensivo en Colombia, solo el 10% de los productos ofertados para el control de plagas y fitopatógenos son de origen biológico.

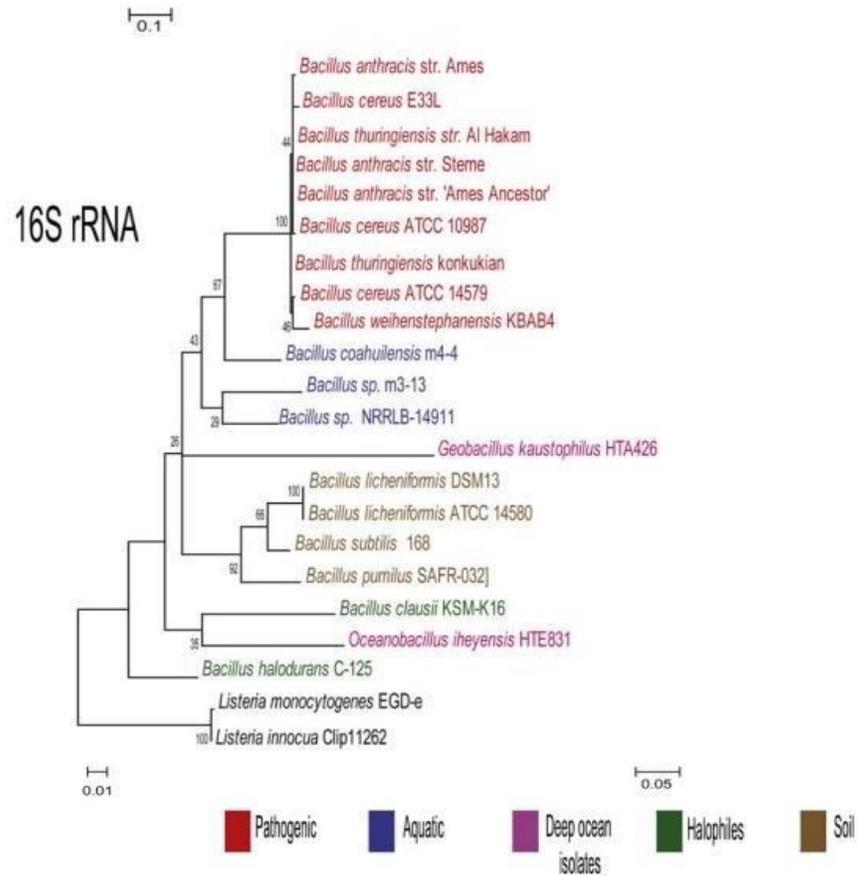
Lo anterior es generado en parte por la escasez de estos insumos, la insuficiente

divulgación sobre su desarrollo y sus beneficios en campo, poca difusión de los resultados de investigación de los resultados de laboratorio en el país para los tomadores de decisiones y agricultores lo que limita su utilización en planes de manejo integrado y por tanto se disminuye el impacto ambiental y social real de los procesos académicos (Vinchira y Moreno, 2019).

Bacillus spp.

El género *Bacillus* se reportó inicialmente por Cohn en 1872 y fue descrito como un género de bacterias productoras de endosporas que les permiten resistir al calor. Este género pertenece al Reino Bacteria, Filo Firmicutes, Clase Bacilli, Orden Bacillales y Familia Bacillaceae. En la actualidad agrupa (Figura 8) alrededor de 336 especies las cuales se clasifican en el grupo de *Bacillus cereus* aquellos asociados a patogenicidad, bacilos ambientales como el grupo de *Bacillus subtilis*, el grupo de *Bacillus clausii-halodurans* y el grupo *Bacillus* industriales. Se trata de un grupo bien caracterizado desde la microbiología clásica, bioquímica y más recientemente la genómica y la proteómica, aunque la mayor parte de las secuencias moleculares disponibles corresponden a patógenos. Son definidos como cepas Gram Positivas, en forma de bastones que pueden ser aeróbicos o anaeróbicos facultativos. Produce endosporas como respuesta a factores de estrés ambiental o nutricional (Alcazar et al., 2010).

Figura No. 9. Filogenia de máxima verosimilitud de *Bacillus* usando ARNr 16S.



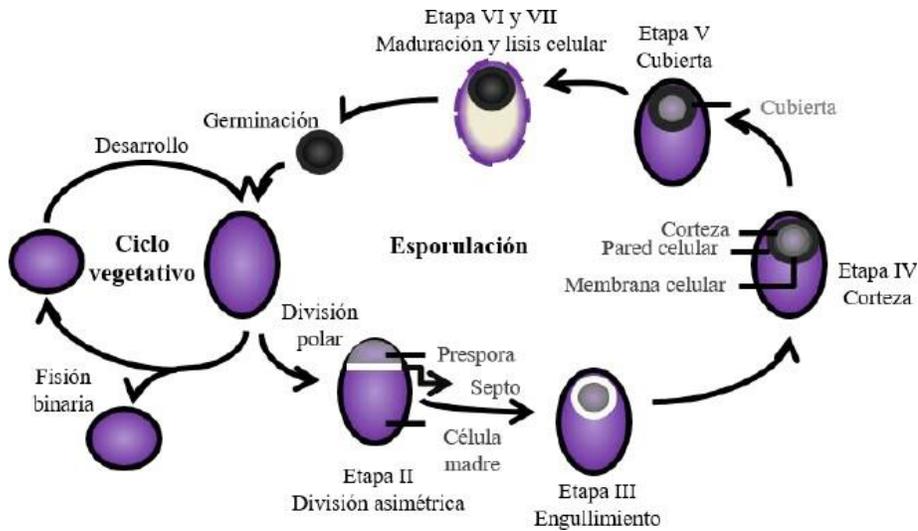
Fuente: Alcázar et al., 2010.

Ecológicamente el suelo es el principal reservorio del género, cabe resaltar que se han realizado insuficientes investigaciones para comprender la diversidad de *Bacillus* en los suelos que interactúan con plantas y presentan capacidades endofíticas, asociativas y simbióticas, características de potenciales inoculantes microbianos. Diversos autores reportaron la producción de biopelículas en el género como mecanismos de colonización y defensa ante patógenos, características de potenciales biocontroladores (Villareal et al., 2018).

Dentro de las características del género se encuentra que crecen a pH neutro, con temperaturas entre 30° y 45° C, formación de las endosporas durante la segunda fase del ciclo de vida (Figura 9), conformado por una fase de crecimiento y una de esporulación.

Durante la primera fase la bacteria crece de manera exponencial por fisión binaria, la segunda se da como respuesta al estrés formando la endospora por división celular asimétrica, esta es viable hasta que las condiciones sean favorables y así se empieza nuevamente el ciclo vegetativo (Villareal et al., 2018).

Figura No. 10. Ciclo reproductivo de *Bacillus*.



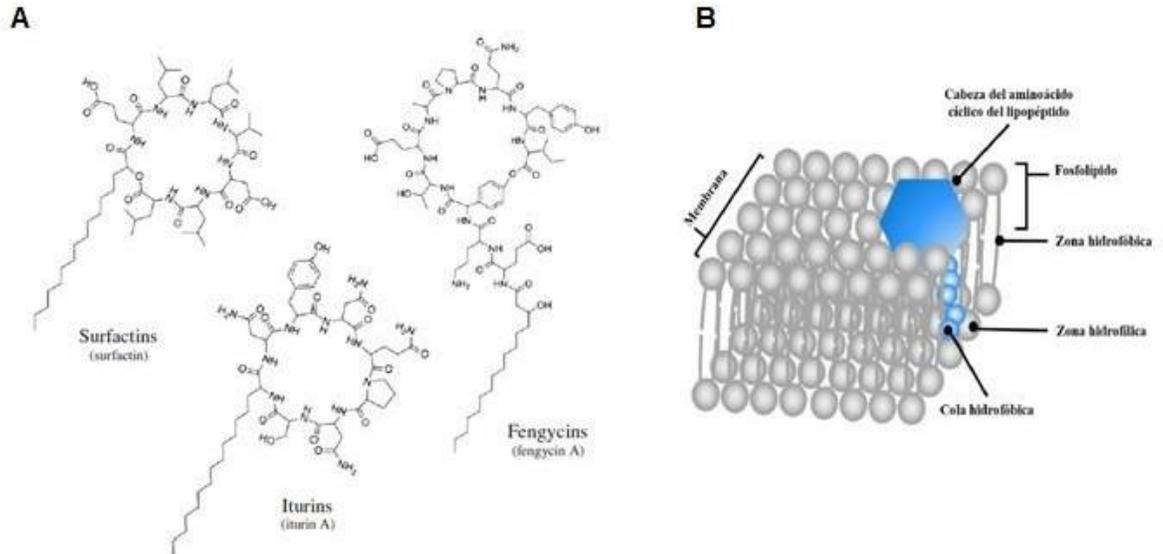
Fuente: Villareal et al., 2018.

El género ha sido de gran interés por demostrar su actividad antagonica ante patógenos de frutales, arroz, maíz, entre otros, lo anterior se da a través de secreción de antibióticos, sideróforos, enzimas líticas, toxinas, inducción de resistencia sistémica a la planta (Tejera et al., 2011).

La producción de antibióticos del género es una característica importante, dentro de ellos se encuentran los lipopéptidos cíclicos no ribosomales, éstos son péptidos cíclicos unidos a una cadena de ácido graso β -hidroxi o β -amino, pertenecientes a 3 familias (Figura 10, A): fengicinas, iturinas y surfactinas, de acuerdo a la secuencia de aminoácidos y longitud de ácidos grasos, éstas han sido ampliamente reconocidas por su actividad antibacteriana y antifúngica (Falardeau, 2013). Esta actividad antibiótica de los lipopéptidos se da por su

interacción con la membrana citoplasmática de la célula atacada, haciéndola porosa y provocando un desbalanceosmótico, lo que conlleva a la muerte celular (Figura 10, B) (Villareal et al., 2018).

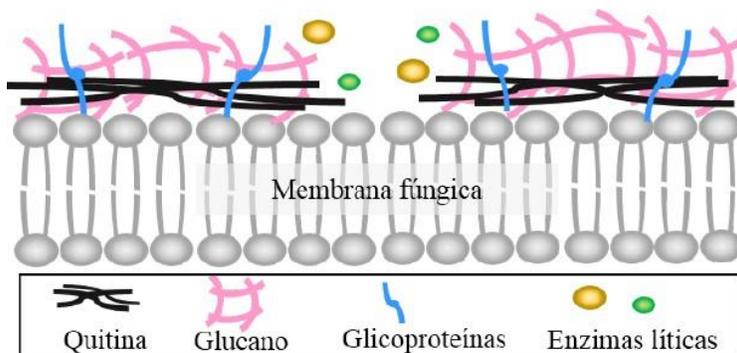
Figura No. 11. A. Metabolitos de *Bacillus* implicados en el control de fitopatógenos. B. Mecanismo de acción de lipopéptidos.



Fuente: Falardeau, 2013 y Villareal et al., 2018.

Otro mecanismo importante del género para el control de patógenos es la producción de enzimas líticas (Villareal et al, 2018) como quitinasas y β -glucanasas las cuales evidencias potenciales inhibitorio contra patógenos fúngicos. Dichas enzimas degradan los polisacáridos de la pared celular de los hongos por hidrólisis de enlaces glucosídicos (Figura 11).

Figura No. 12. Degradación de pared celular de hongos fitopatógenos a través de enzimas líticas.



Fuente: Villareal et al., 2018.

Por otra parte, existe la respuesta sistémica inducida, generada por las plantas como mecanismo evolutivo de defensa, esta respuesta se activa por estímulos ante la interacción con agentes patógenos, esta respuesta puede ser inducida también por señales químicas tipo elicitores producidas por organismos benéficos. Los elicitores producidos por *Bacillus* incluyen respuesta sistémica a lipopéptidos, fitohormonas y compuestos volátiles que activan genes PR (pathogenesis — related) que protegen a la planta de la invasión de patógenos. *Bacillus* también activa otros mecanismos de protección en plantas que incluyen la acumulación de lignina lo que ocasiona cambios en las paredes celulares de las plantas, la producción de metabolitos secundarios tipo auxinas, flavonoides, fitoalexinas o glucosinolatos, etc. Lo anterior hace que *Bacillus* sea el género más utilizado en biotecnología agrícola, con un 85% de la producción de bioplaguicidas en el mercado fabricados a partir de sus especies (Villareal et al., 2018).

Vale aclarar que en los últimos años la producción de plaguicidas químicos ha disminuido un 2% mientras que la de bioplaguicidas ha presentado un incremento de entre el 20% y 30% anual (Zhang, 2018), las razones para el incremento en su utilización dentro de

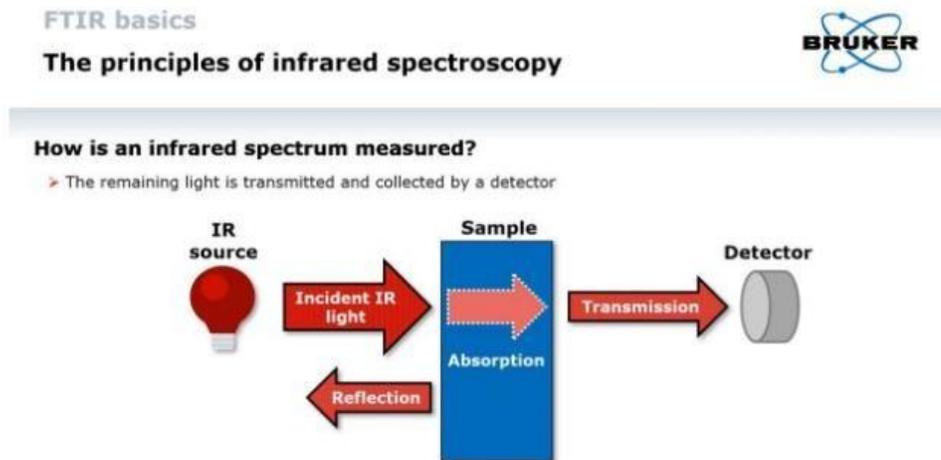
las que destacan la poca generación de resistencia por parte de los patógenos, mayor reconocimiento de los riesgos que conllevan los plaguicidas sintéticos, el incremento en la producción entre otros. El uso de estos bioplaguicidas representa una oportunidad para incentivar el desarrollo y modernización de prácticas agrícolas para favorecer la seguridad alimentaria y la bioseguridad (Villareal et al., 2018).

Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR):

Se trata de una técnica química que se emplea para identificar la huella dactilar molecular de una muestra de tipo orgánico que absorbe el infrarrojo dependiendo del tipo de enlaces que posea la muestra. La espectroscopía infrarroja tiene su fundamento en que la mayoría de las moléculas absorben la luz en la región infrarroja del espectro. Se mide la longitud de onda y como resultado se produce un espectro infrarrojo característico de cada molécula. Antes, las muestras eran analizadas con diferentes longitudes de onda únicas, es decir se debían analizar a diferentes longitudes de onda, pero a través de la FTIR se pueden obtener los datos de todas las longitudes de onda en un solo análisis.

Para ello la luz infrarroja pasa a través de un interferómetro y luego llega a la muestra lo que genera como resultado un interferograma que posteriormente se traduce a un espectro infrarrojo (Figura 12). El interferograma es una señal bruta que representa la intensidad lumínica en función de un espejo móvil pero no en función de la longitud de onda, es aquí donde se debe procesar el resultado con la Transformada de Fourier lo que permite generar una representación IR más familiar de intensidad en función del número de onda, este método es mucho más preciso (Bruker, 2022).

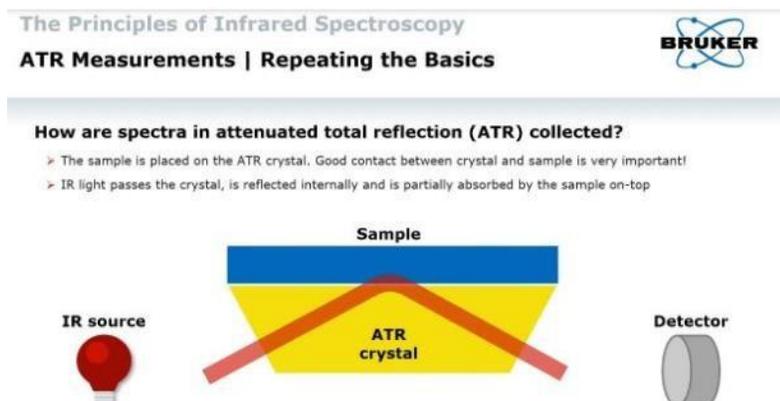
Figura No. 13 Principios de espectroscopia infrarroja



Fuente: Bruker. (2022)

La Reflectancia Total Atenuada o ATR en una técnica para medir espectros FTIR, allí la luz infrarroja pasa a través de un cristal e interactúa con la muestra, como resultado se genera un espectro con todas las características de la sustancia problema (Figura 13). Sus bandas pueden diferir de las generadas en un espectro de transmisión tradicional por efectos físicos, pero ello no significa que sea más difícil de interpretar. Los datos de ATR y transmisión se pueden convertir entre sí y permiten comparaciones con bibliotecas de referencias espectrales de ambos métodos (Bruker, 2022).

Figura No. 14. Mecanismo de reflectancia total atenuada



Fuente: Bruker. (2022)

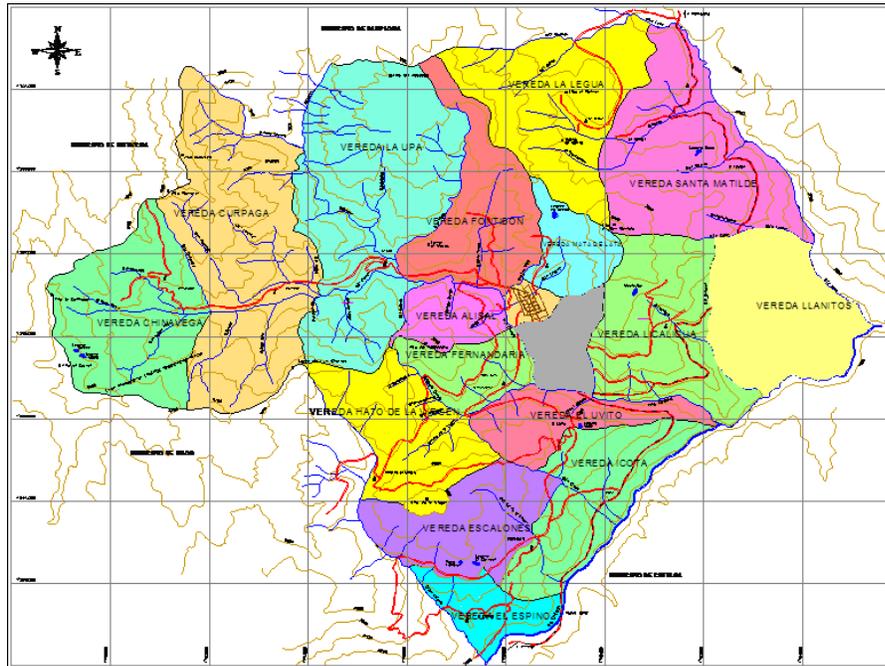
Contextualización sobre Cácuta

Municipio que se localiza en el Suroccidente del Norte de Santander, con una altura promedio de 2465 msnm, a una distancia de 102 km de San José de Cúcuta. Su temperatura promedio es de 18°C, su extensión es de 139 km². Se encuentra entre las cuencas de los ríos Chitagá y Pamplonita. Más de 4000 hectáreas de su territorio pertenecen al páramo de Santurbán. Cuenta con 17 veredas. La fundación tuvo lugar en 1555. Su economía se basa en la agricultura destacándose productos como papa, zanahoria, arveja, curuba, durazno y fresa. También posee producción pecuaria con aves de corral y bovinos y minería de carbón y arcilla.

Como actividades adicionales se encuentra la alfarería y la artesanía en general (Ruta del Durazno y del Agua, 2022). El índice de pobreza multidimensional del municipio muestra un 27,2 % en el área urbana y un 59,1 % en el área rural, destacándose como principales privaciones el trabajo informal (93,1%), la ausencia de acceso a fuentes de agua mejorada (90,4%) y el bajo logro educativo (85,9%) (DANE, 2018).

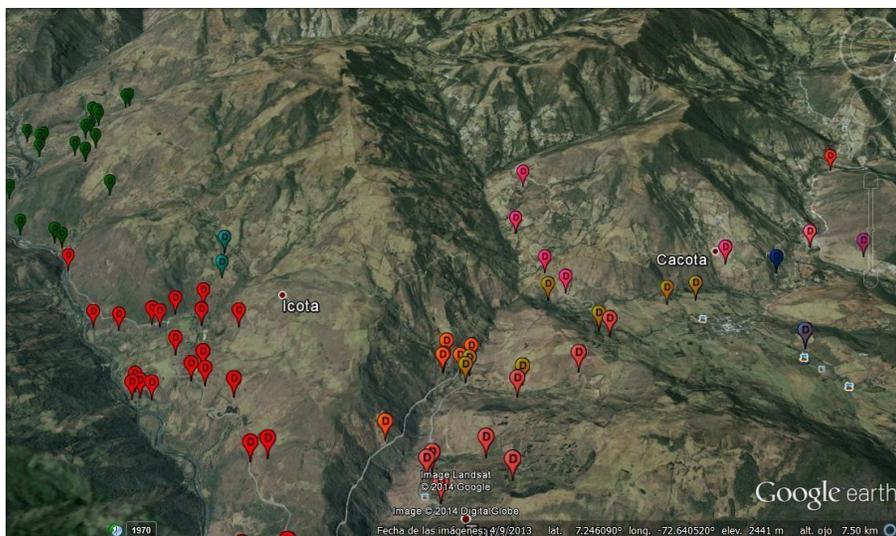
Los productores de durazno del municipio (Figura 15) de acuerdo a Fernández, 2012 ascienden a 84 distribuidos en 12 veredas con un área cultivada de 210,5 ha y una producción promedio de 20 t/ha (Tabla 1). Esta actividad genera alrededor de 1000 empleos en toda la cadena de producción (Ruta del Durazno y del Agua, 2022).

Figura No. 15. División política del municipio de Cécota. Fuente Ruta del Durazno y del Agua.



Fuente: Fernández, (2012). Ruta del Durazno y del Agua, Universidad de Pamplona.

Figura No. 16. Ubicación espacial de los predios productores de durazno del municipio de Cécota.



Fuente: Fernández, (2012). Ruta del Durazno y del Agua, Universidad de Pamplona.

Tabla No. 1. Productores de durazno el municipio de Cácuta.

SIMBOLO	VEREDA	TOTAL PRODUCTORES	Area Jarillo (ha)	Area Gran Jarillo (ha)	Area Lotes Mezcla	Area otra Variedad	Area Total	# plantas Jarillo	# plantas Gran Jarillo	# plantas otra variedad
	ICOTA	22	20,8	106,4			127,2	4306	18656	
	EL ESPINO	20	9,93	15,09			25	2103	3287	
	LICALIGUA	17	1,2	17,5			18,7	260	3862	
	EL UVITO	6	0,26	3,64			3,9	50	911	
	SISARA-TABICHÁ	7	0,13	7,3			7,4	50	1588	
	FERNANDARIA	5	1,7	4,2			5,9	382	1076	
	FONTIBON	2	1,8				1,8	512		
	ESCALONES	2		8,6			8,6		1850	
	ALISAL	1	0,72	0,196			0,916	140	40	
	MATA DE LATA	1	1,28	9,84			11,12	200	2000	
	LA UPA	1	0,05			0,08	0,13	24		56
	TOTAL	84	37,87	172,76		0,08	210,5	8027	33270	56

Fuente: Fernández 2012

Fuente: Fernández, (2012). Ruta del Durazno y del Agua, Universidad de Pamplona.

Contextualización sobre Chitagá

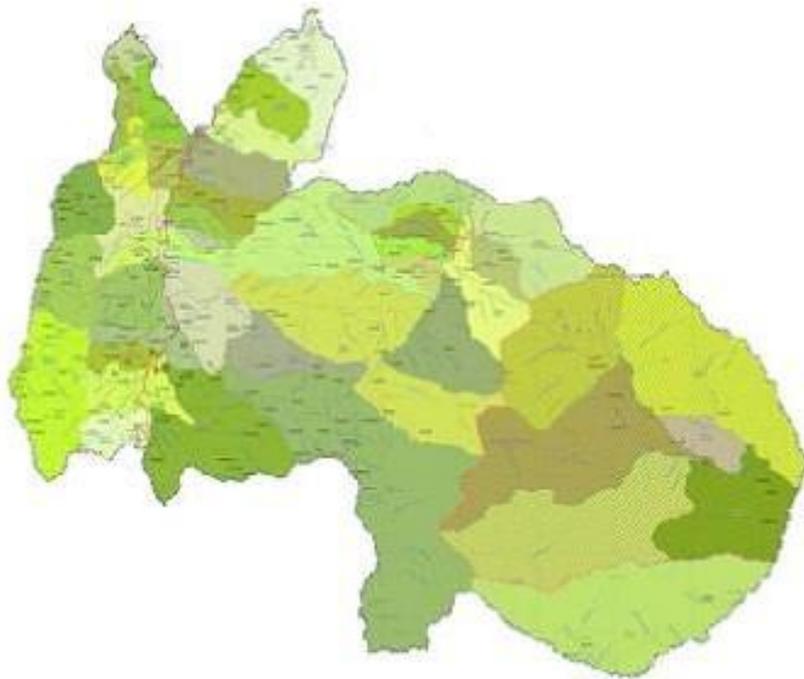
El municipio de Chitagá se localiza en el Suroccidente del Norte de Santander, con una población de 11.400 habitantes aproximadamente, se encuentra a una altura de 2379 msnm, con una temperatura media de 14°C y una distancia a Cúcuta de 123 km. Su extensión es de 1172 km². El municipio cuenta con 44 veredas (Figura 16). Posee quebradas, riachuelos, lagunas y humedales que conforman los ríos Chitagá, Valegrá y Cubugón, además de otras corrientes de gran importancia. Los dos primeros luego de su confluencia forman el río Margua, el cual al unir sus aguas con el río Cubugón forman las fuentes del río Arauca.

Fue fundada en 1804. Su economía se basa en la producción agropecuaria liderando el renglón del durazno, la papa criolla, curuba, hortalizas, trucha, bovinos y leche (Ruta del Durazno y del Agua, 2022). El índice de pobreza multidimensional del municipio muestra un 34,8% en el área urbana y un 68,5% en el área rural, destacándose como principales

privaciones el trabajo informal (97,2%), el bajo logro educativo (89,2%) y la ausencia de acceso a fuentes de agua mejorada (68,7%) (DANE, 2018).

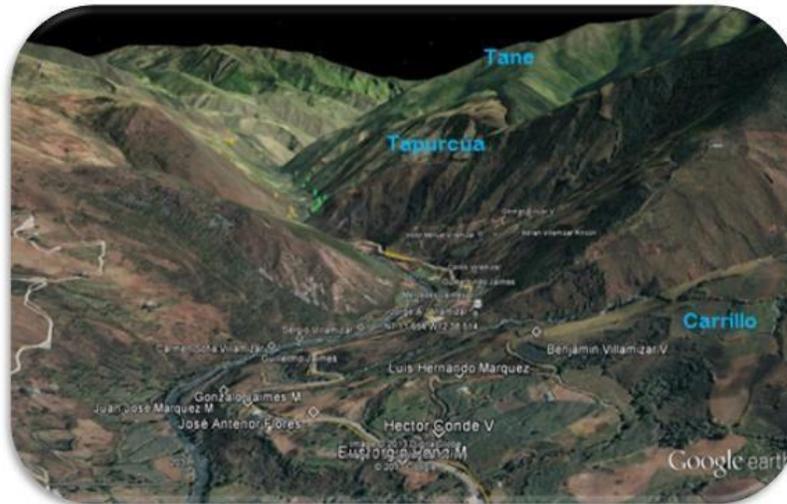
En cuanto a la producción de durazno, el municipio cuenta con 182 productores en 16 veredas (Figuras 17, 18, 19) con un área sembrada de 236,5 ha donde 135,9 ha corresponden a la variedad Gran Jarillo y 100,6 ha de Jarillo (Tabla 2). La vereda Llano Grande es la vereda con mayor área sembrada (54.70 ha) seguida por Carrillo con 47.90 ha. La mayor producción se ubica en las riberas del río Chitagá (Ruta del Durazno y del Agua, 2022).

Figura No. 17. División política del municipio de Chitagá.



Fuente: Fernández, (2012). Ruta del Durazno y del Agua, Universidad de Pamplona.

Figura No. 18. Ubicación espacial de los predios productores de durazno del municipio de Cácuta.



Fuente: Fernández, (2014). Ruta del Durazno y del Agua, Universidad de Pamplona.

Figura No. 19. Ubicación espacial de los predios productores de durazno del municipio de Cácuta.



Fuente: Fernández, (2014). Ruta del Durazno y del Agua, Universidad de Pamplona.

Figura No. 20. Ubicación espacial de los predios productores de durazno del municipio de Cácosta.



Fuente: Fernández, (2014). Ruta del Durazno y del Agua, Universidad de Pamplona.

Tabla No. 2. Productores de durazno del municipio de Chitagá.

VEREDA	Total Productores	Área Jarillo (ha)	Área Gran Jarillo (ha)	Área Total (ha)	Altura Máxima	Altura Mínima
VEGA	2	4,1082	1,8111	5,9193	2.193	2.104
TAPURCUA	12	9,7639	22,4142	32,1781	1.942	1.858
TANE	3	1,4737	1,8491	3,3228	1.912	1.799
SIAGA	9	3,6289	0,9477	4,5766	2.168	2.099
RITAPA	12	10,4171	8,9413	19,3584	2.529	2.083
PUEBLO VIEJO	5	1,8873	3,2039	5,0912	2.500	2.131
PEDREGAL	23	13,9514	13,4507	27,4021	2.160	2.011
LLANO GRANDE	50	30,6139	24,0912	54,7051	2.315	1.991
LAGUNA	4	1,8449	2,2652	4,1101	2.435	2.107
HOJANCHA	4	1,0722	2,738	3,8102	2.449	2.332
DON ANTONIO	1	0,6324	1,92	25524	1.940	
CARRILLO	28	16,1180	31,7883	47,9063	2.158	1.864
CAMPESINA	2	0	0,7336	0,7336	2.395	2.360
BARTAQUI	3	0,0828	2,0113	2,0941	2.294	2.251
ALTO VIENTO	4	2,7039	0,7	3,4039	2.259	2.134
ALISAL	20	2,318	17,0394	19,3574	2.037	2.526
TOTAL	182	100,61	135,905	236,5216		

Fuente: Fernández, (2014). Ruta del Durazno y del Agua, Universidad de Pamplona.

Contextualización sobre Pamplonita

El municipio de Pamplonita se localiza en el Suroccidente del Norte de Santander, con una población de 4.790 habitantes aproximadamente, se encuentra a una alturade 1750 msnm, con una temperatura media de 18°C y una distancia a Cúcuta de 54 km. Su extensión es de 173,4 km². El municipio cuenta con 22 veredas (Figura 18). Su recurso hídrico principal es el río Pamplonita y las quebradas La Colonia o Tescua y la Chorrera o Urengue.

Fue fundada en 1550. Su economía se basa en laproducción agropecuaria destacándose productos como café, habichuela, tomate de mesa, fríjol, caña de azúcar y yuca (en las zonas más bajas) y cebolla junca, arveja, apio, papa criolla y brevas (en las más altas), fresa, ciruela y durazno. (Rutadel Durazno y del Agua, 2022). El índice de pobreza multidimensional del municipiomuestra un 16,9% en el área urbana y un 47,8% en el área rural, destacándose como principales privaciones el trabajo informal (87,9%), el bajo logro educativo (77,2%) y la ausencia de acceso a fuentes de agua mejorada (64,4%) (DANE, 2018).

En cuanto a la producción de durazno, el municipio cuenta con 4 veredas productoras (Tabla 3) siendo Batagá la que posee mayor área sembrada con 35.85ha de las 64.49 ha sembradas en el municipio, seguida por la vereda Hojancha con24,4 ha. Del total sembrado 46.72 ha son de la variedad Gran Jarillo y 16.70 ha de Jarillo. El total de plantas sembradas es de 12.067 (Ruta del Durazno y del Agua, 2022).

Tabla No. 3. Productores de durazno el municipio de Pamplonita

SÍMBOLO	VARIETAL	TOTAL PRODUCCIONES	ÁREA CULTIVADA (HA)	ÁREA DE CULTIVO (HA)	ÁREA CULTIVADA (HA)							
	Barraza	3	1.501	30.883	0.029		35.254	1.397	4.434	35	1754	1555
	Llano Grande	4	0.395	0.412		0.945	1.883	180	201		2103	2030
	Hojas de	18	4.5712	15.929			26.451	1.513	2.991		2032	1775
	El Palmar	7	4.153	1.304			1.312	1.037	224		2159	1921
	TOTAL	32	10.7045	48.328	0.029	0.945	64.412	1.997	8.331	35		

Fuente: FERNÁNDEZ, 2014

Fuente: Fernández, (2014). Ruta del Durazno y del Agua, Universidad de Pamplona.

Estado del Arte

El control biológico de fitopatógenos ha sido reportado como una alternativa viable de sustitución de pesticidas químicos hace décadas pues ya desde 1987 y 1988 Beaker y Cook, respectivamente, se referían a este como un innovador y sostenible método. El rango de bacterias que demuestran efectividad en el control biológico es extenso, a pesar de ello el género *Bacillus* es el más ampliamente conocido por sus habilidades de rápida replicación y resistencia al estrés del medio (Shafi *et al*, 2017).

Dentro de los compuestos que le otorgan al género estas habilidades controladoras están la surfactina, fengicina, iturinas, micosubtilinas, y bacilomicinas, lipopéptidos con función biosurfactante de membrana que les otorga actividad antimicrobiana (Ariza y Sánchez, 2012). A este respecto en México se ha utilizado el biocontrol de suelos contaminados con *Fusarium*, *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora capsici* encontrando rendimientos en control de la marchitez y la pudrición de la raíz superiores en ocasiones a los efectos del control químico (Guillen-Cruz et al., 2006). En Colombia, Suárez y Riaño en el 2013 aislaron 20 cepas de suelos del Norte de Santander correspondientes a hongos y

bacterias (varias de ellas del género *Bacillus*) con potenciales antagónicos de alrededor del 89% contra el hongo *Moniliophthora roreri* que afecta el cacao.

De igual forma se han realizado estudios enfocados a la identificación de las especies de *Monilinia* spp. aisladas de duraznos cultivados en España, mediante marcadores de tipo SCAR (región amplificada de secuencia caracterizada) (Gell, 2007). En Uruguay se han caracterizado de igual forma mediante PCR, diferentes especies del patógeno causante de la podredumbre morena del durazno (Málvarez et al., 2001). Los estudios de este tipo son escasos en Colombia, por lo que se requiere iniciar la investigación en los cultivos de durazno colombianos, principalmente en el Norte de Santander, donde son casi nulos y muy necesarios como parte de los procesos de fortalecimiento de la cadena productiva frutícola.

METODOLOGÍA

El presente estudio corresponde una investigación de tipo cuantitativo experimental. Para desarrollar la investigación se tuvieron en cuenta las siguientes etapas:

I. Actividades de campo

- Área de estudio y toma de muestras

II. Actividades de Laboratorio

- Evaluación de antagonismo *in vitro* e identificación de antagonistas.

Evaluación de diversas metodologías.

- Evaluación de antagonismo *in vivo*
- Caracterización taxonómica, bioquímica y molecular de antagonistas y patógenos.

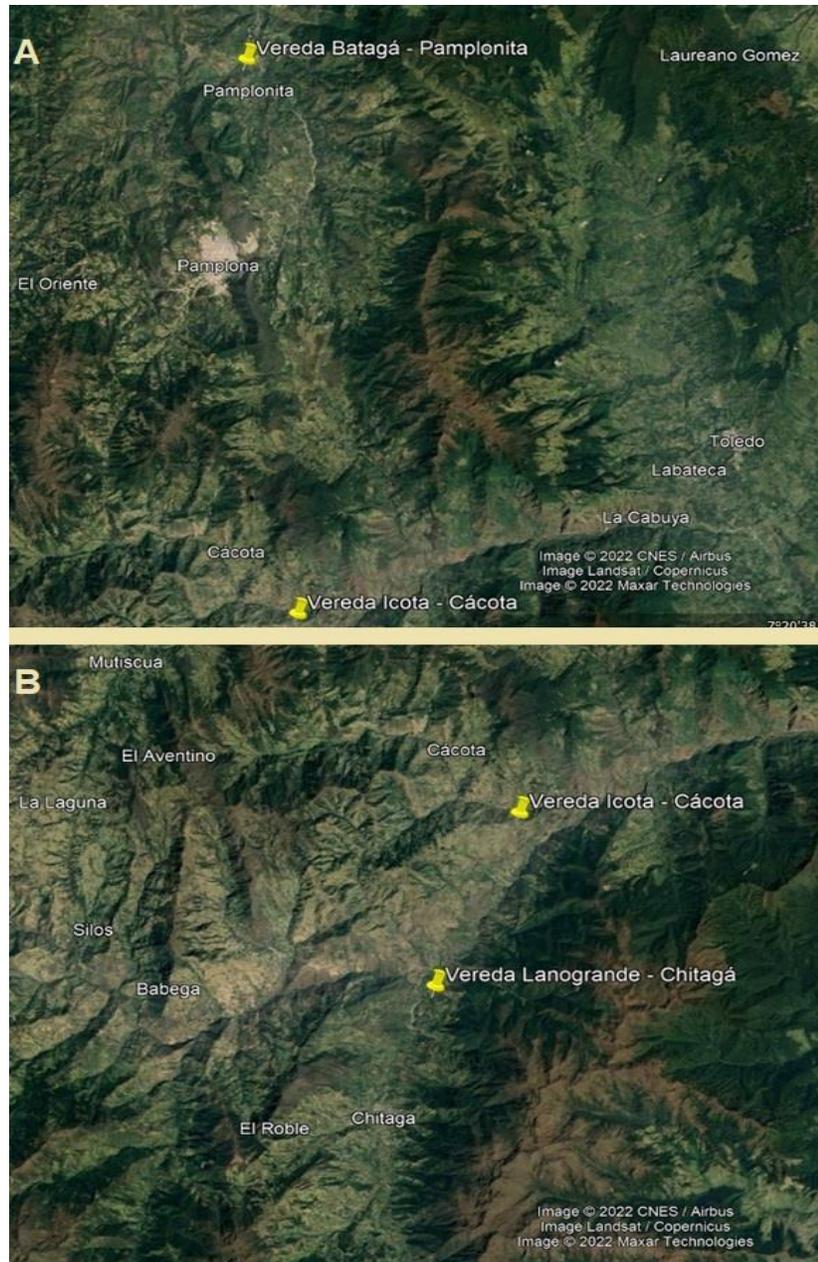
Dichas etapas se describen a continuación:

Área de estudio y toma de muestras

Se realizó una selección a partir de literatura (Ruta del Durazno y del Agua, 2022) de las veredas más productoras de durazno en los municipios en cuestión lo que arrojó Llanogrande en Chitagá, Ícota en Cácuta y Batagá en Pamplonita (Figura 20). Se caracterizaron 9 fincas (tres por municipio) productoras de durazno, finca La Vega, El Veranito y Buenavista en la vereda Llanogrande Chitagá; finca La Victoria, Icota Quintero Predio 1 y El Recuerdo vereda Ícota en Cácuta y finca La Puerta del Sol, Bella Vista y El Triángulo vereda Batagá en Pamplonita. Allí se tomaron al azar muestras de suelo a 20 cm de profundidad en el área de los cultivos (Figura 21). Las muestras fueron transportadas al laboratorio de Investigaciones Biotecnológicas de la Universidad de Pamplona (CD 201) en cavas para

posteriormente ser procesadas mediante la metodología estandarizada por el equipo de investigación.

Figura No. 21. Área de muestreo (Veredas Batagá de Pamplonita, Ícota de Cécota y Llano grande de Chitagá)



Fuente: Elaboración Propia (2022)

Figura No. 22. Toma de muestras compuestas en fincas cultivadoras de durazno de Norte de Santander



Fuente: Los Autores. (2022).

Ya en el laboratorio las muestras de suelo se mantuvieron a 4°C para asegurar la preservación de los microorganismos mientras se preparó el material necesario para llevar a cabo las metodologías de aislamiento de antagonistas seleccionadas. Estas últimas fueron escogidas con criterios de reproducibilidad, bajos costos, practicidad, eficacia en la medición de resultados y disponibilidad de materiales y reactivos en el laboratorio.

En el caso del patógeno *Monilinia* sp. se tuvieron en cuenta una serie de parámetros para el aislamiento del patógeno dentro de los que se incluye la elección de frutos de durazno con síntomas de podredumbre por *Monilinia* sp. por ser los frutos los órganos donde la sintomatología de la enfermedad es más evidente. De igual forma se tuvo en cuenta que se tratara de la misma variedad de durazno de donde se aislaba el patógeno y que éste no llegara a momificar totalmente el fruto para evitar la presencia de organismos saprófitos.

Estandarización de metodología de aislamiento de bacterias

Cada pool de suelo obtenido de las 9 fincas seleccionadas fue procesado en el Laboratorio de Investigaciones Biotecnológicas (CD 201) de la Universidad de Pamplona de

acuerdo a la metodología estandarizada por los investigadores y que se describirá a continuación:

1. Se realizó un pool de suelos mezclando cantidades proporcionales de los suelos recolectados en las tres fincas por municipio.
2. Se disolvieron 25g de suelo en 1 litro de solución salina 0,85% (sin esterilizar).
3. Se filtró la solución (Figura 22A)
4. Se realizaron esterilizaciones fraccionadas a 121°C por 30 minutos (Figura 22B). Esterilizando una primera vez, luego dejando enfriar y repitiendo el procedimiento dos veces más. Se trataba de la solución extracto de suelo.

5. Posteriormente se prepararon soluciones de caldo nutritivo modificado al 20%. Teniendo en cuenta la proporción de medio de cultivo Caldo Nutritivo 13g/L.

- Así: Volumen de medio de cultivo preparado 200 ml x 2 = 400 ml
- 13 g → 1000 ml
- X → 400 ml
- $X = 5,2$
g
- Ahora se le restó a 5,2 g de caldo nutritivo 1,04 g = 4,16g de caldo nutritivo.
- 100% → 400 ml
- 20% → X
- X = 80 ml de solución de extracto de suelo.
- 400 ml – 80 ml = 320 ml de agua destilada

Figura No. 23. A. Preparación de soluciones agua suelo. B. Autoclaves para esterilización fraccionada de la solución extracto de suelo



Fuente: Los Autores. (2022)

Preparación

Se midieron los 320 ml de agua destilada en un frasco de 1000 ml, se agregaron los 3,2 g de caldo nutritivo hasta diluirlo completamente, se agregaron 80 ml de solución de extracto de suelo, se distribuyeron en dos botellas cada una con 200 ml, se marcaron, se taparon y se cubrieron con papel aluminio y vinipel, se esterilizaron por 15 minutos a 120°C y 15 libras de presión. Posteriormente se agregaron 50 ml de una solución (50 ml de solución salina al 0,85% esterilizada y luego se adicionaron 10 g del pool de suelos, se calentaron a 80°C por 10 minutos. Se incubaron a 35°C por 24 y 48 horas. Los productos de este proceso fueron repicados en cajas de Petri con agares modificados para aislamiento de hongos y bacterias.

La preparación de los agares modificados al 20% con solución de suelo se estandarizó de la siguiente manera:

Para el caso del agar nutritivo la proporción indicada por la casa comercial Merck® es 20g/l.

La preparación (Tabla 4) consistió en medir los 800 ml de agua destilada, precalentar y agregar los 18g de Agar Nutritivo, los 2,4 g de agar — agar para realizarla corrección del agar, se dejó hervir, se agregaron los 200 ml de solución extracto de suelo y se esterilizó por 15 minutos a 120°C y 15 libras de presión.

Tabla No. 4. Agar Nutritivo Modificado al 20%

Composición del medio		
Agar Nutritivo (A.N)		
Componente	Cantidad	
	100%	Modificado 20%
Peptona de carne	5g	4g
Extracto de carne	3 g	2,4 g
Agar - agar	12 g	12 g
Agua	1000 mL	800 mL
Sol extracto de suelo	0 mL	200 mL



Fuente: Elaboración Propia (2022)

Las modificaciones para hongos al 20% de Agar Papa Dextrosa (Tabla 5) y Agar Rosa de Bengala (Tabla 6) se prepararon exactamente igual al protocolo anterior, pero modificando las proporciones de acuerdo a la composición de cada medio.

Tabla No. 5. Agar Papa Dextrosa Modificado al 20%

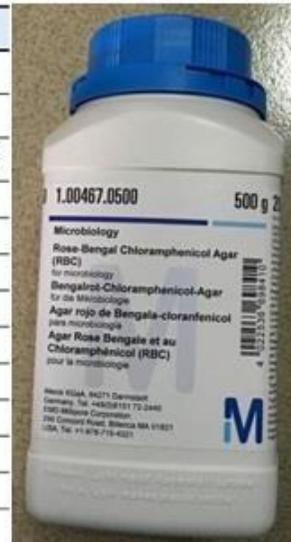
Composición del medio		
Agar Papa Dextrosa (PDA)		
Componente	Cantidad	
	100%	Modificado 20%
Infusión de papa*	4 g	3,2 g
D(+) glucosa	20 g	16 g
Agar-agar	15 g	15 g
Agua	1000 mL	800 mL
Sol extracto de suelo	0 mL	200 mL



Fuente: Elaboración Propia (2022)

Tabla No. 6. Agar Papa Dextrosa Modificado al 20%

Composición del medio		
Agar Rosa de Bengala (A.R.B)		
Componente	Cantidad	
	100%	Modificado 20%
Peptona	5 g	4 g
Glucosa	10 g	8 g
K ₂ HPO ₄	1 g	0,8 g
Dicloran	0,002 g	0,16 g
SO ₄ .7H ₂ O	0,5 g	0,4 g
Rosa de bengala	0,025 g	0,02 g
Cloranfenicol	0,1 g	0,08g
Agar-agar	15 g	15 g
Agua	1000 mL	800 mL
Solución agua-suelo	0 mL	200 mL

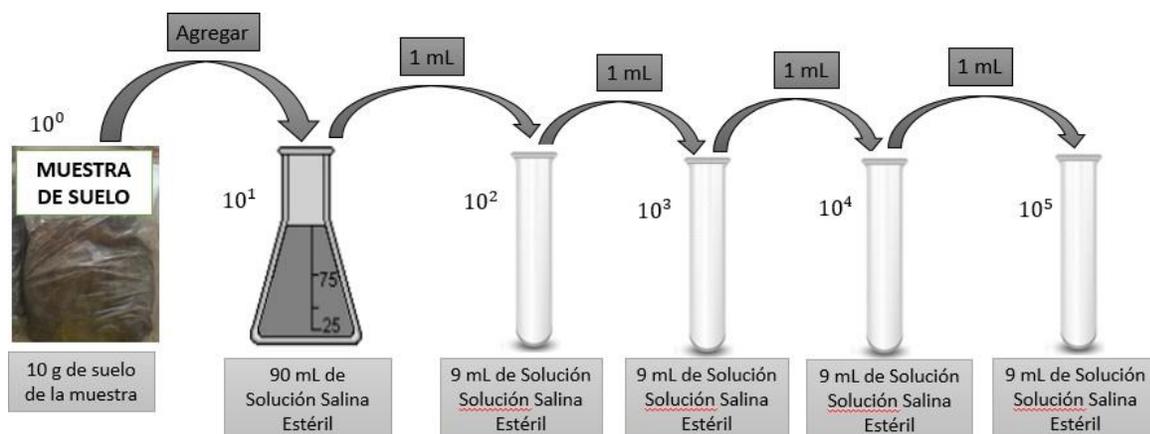


Fuente: Elaboración Propia (2022)

Para la realización de las siembras en los agares modificados se realizaron diluciones seriadas a partir de la solución madre para realizar la selección de las bacterias de interés (Figura 23), teniendo en cuenta que el género *Bacillus* es un controlador biológico ampliamente descrito como antagonista de fitopatógenos (Pedraza et al., 2020) y que a su vez es resistente a altas temperaturas por su capacidad de formar endosporas (Vaca, 2022), se realizó una pre selección bacteriana mediante calentamiento a 80°C por 10 minutos en baño

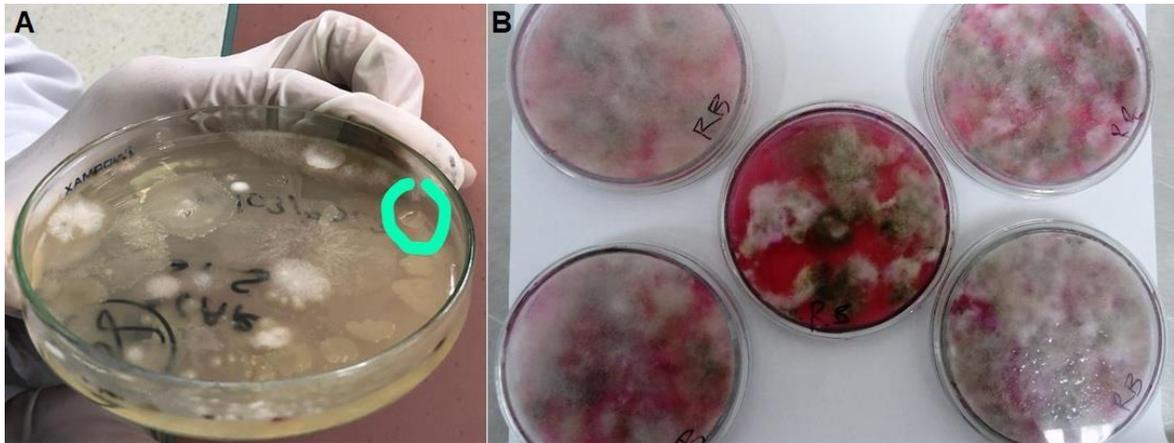
maría (García- Martínez et al., 2022), en este paso se sembraron 100 μl de las diluciones 10^3 , 10^4 y 10^5 por siembra en superficie con asa de Drigralsky de acuerdo a la metodología propuesta por Carlina et al., 2021. Cabe aclarar que aunque el proyecto se orientó al aislamiento de *bacterias del suelo*, se estandarizaron también protocolos para aislamiento de potenciales biocontroladores fúngicos que pudieran utilizarse en proyectos posteriores (Figura 24). Las cajas de Agar Nutritivo Modificado sembradas con las diluciones para aislamiento bacteriano se incubaron a 28°C de 24 a 48 horas sin fotoperiodos (García- Martínez et al., 2022). Por su parte las diluciones para hongos se sembraron en PDA Modificado y Rosa Bengala Modificado a 25°C de 48 a 72 horas (Sánchez, 2020).

Figura No. 24. Diluciones seriadas de las muestras de suelo.



Fuente: Elaboración Propia (2022)

Figura No. 25. A. Aislamiento de bacterias a partir de soluciones de suelos en Agar Nutritivo Modificado al 20% B. Aislamiento de hongos a partir de soluciones de suelos en Agar Rosa de Bengala Modificado al 20%



Fuente: Elaboración Propia (2022)

Para aislar las cepas de *Monilinia* spp se seleccionó la metodología de Petróczy et al., 2012 y Vasić, 2018 que consiste en identificar frutos en campo con las lesiones características (Figura 25) del hongo causante de la podredumbre morena que consisten en típicas lesiones circulares de color pardo, una eflorescencia grisácea constituida por los ramilletes de conidios (Herbario Virtual, 2022), colectarlos en bolsas plásticas transparentes de cierre hermético y transportarlas al laboratorio CD 201 de la Universidad de Pamplona.

Allí se sometieron a una desinfección superficial con agua destilada estéril y etanol al 70% por un minuto. Posteriormente se cortaron pequeños fragmentos de la lesión (5 mm) y se pusieron en el centro de una caja de Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA) [Sigma, Aldrich] + Ácido láctico al 25%, posteriormente se incubaron por 4 días en oscuridad.

Posteriormente, los fragmentos de micelio fueron transferidos a PDA limpio. A continuación se realizaron cultivos monospóricos (Rosas et al., 2014), realizando diluciones seriadas (Figura 26) hasta lograr una concentración de 1×10^3 conidios mL⁻¹ contabilizados

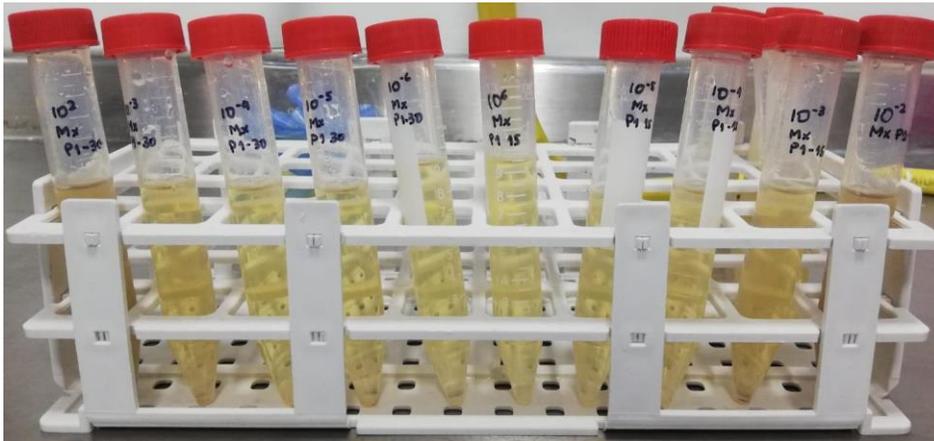
con Cámara de Neubauer, luego 100 ul de dicha solución se depositó en agar PDA y se homogenizó con asa de Drigralski incubando a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por tres días para luego seleccionar un conidio individual germinado de cada cepa aislada y transferirlo con asa a una nueva caja de PDA y así permitir su crecimiento en incubación por 7 días, tiempo en el cual se calculó el crecimiento de cada colonia con la media de dos diámetros trazados en el reverso de las cajas petri. A los 15 días de incubación se determinaron las características morfológicas: coloración de la colonia, forma de los márgenes, presencia de estromas, y formación de anillos de crecimiento. (Muñoz, Moret & Bech 2008 p. 121).

Figura No. 26. Fruto de *Prunus persica* con lesión característica de *Monilinia* sp.



Fuente: Elaboración Propia (2022)

Figura No. 27. Diluciones seriadas de *Monilinia* spp.



Fuente: Elaboración Propia (2022)

Evaluación de antagonismo *in vitro* e identificación de antagonistas

Para la evaluación de la capacidad antagonica de los microorganismos nativos aislados se evaluaron 4 metodologías, la de Igarashi et al., 1997 en Márquez et al 2002, Gómez y Ortega 1993, Villamil et al., 2012 y Bashan et al., 1996 en Rojas et al., 2017, enfrentando cada uno de los microorganismos aislados al patógeno en estudio y posteriormente determinando el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del patógeno en placa y el tipo de antagonismo. Se realizaron tres (3) repeticiones de cada enfrentamiento, junto a los testigos correspondientes, utilizando como control el agroquímico más comúnmente usado en la región (Optix 28 sc ®) para el control de la podredumbre morena del durazno. De las 4 metodologías de evaluación de antagonismo se seleccionó aquella que presentó menor índice de contaminación, fácil reproducibilidad y evaluación de resultados. Las 2 bacterias que presentaron la mejor capacidad antagonica fueron identificadas hasta la menor categoría taxonómica posible utilizando métodos tradicionales de identificación y métodos moleculares (RNA 16s) (Janga et al., 2017).

1. La metodología de Igarashi et al., 1997 consistió en el cultivo masivo de cada

cepa bacteriana en PDA a 3 cm del borde formando un cuadrante en la región central de la caja y en el centro se inoculó con asa recta por punción el fitopatógeno e incubando a 28°C por 8 días.

2. Por su parte la técnica de Gómez y Ortega, 1993 consistió en inocular las cepas bacterianas en una línea vertical que atravesaba el diámetro total de la caja y a un cm del borde de la caja colocar por punción el patógeno e incubando a 28°C por 8 días.

3. La técnica de Villamil et al., 2012 consistió en poner un disco de PDA cubierto de micelio del patógeno con 12 días de crecimiento y sobre los ejes horizontal y vertical, a 3 cm del borde de la caja las cepas bacterianas y luego incubar a 28°C por 8 días.

4. Finalmente, la técnica de Bashan et al., 1996 consistió en sembrar en PDA 100 ul de bacterias ajustada a una concentración de 10^8 cel ml^{-1} tomando como referencia el tubo 0,5 de la escala de McFarland. Dicha cantidad de bacterias se diseminó por el PDA con asa de Drigalski y se dejó secar por 15 minutos. Posteriormente se colocó en el centro de la caja un disco de agar de 5 mm con micelio del hongo y se incubó a 28°C por 8 días.

Al finalizar los experimentos se calculó el porcentaje de inhibición en cada tratamiento así:

$$\%I = ((DCC - DCP) / DCC) \times 100$$

Dónde: %I= Porcentaje de Inhibición.

DCC= Diámetro control.

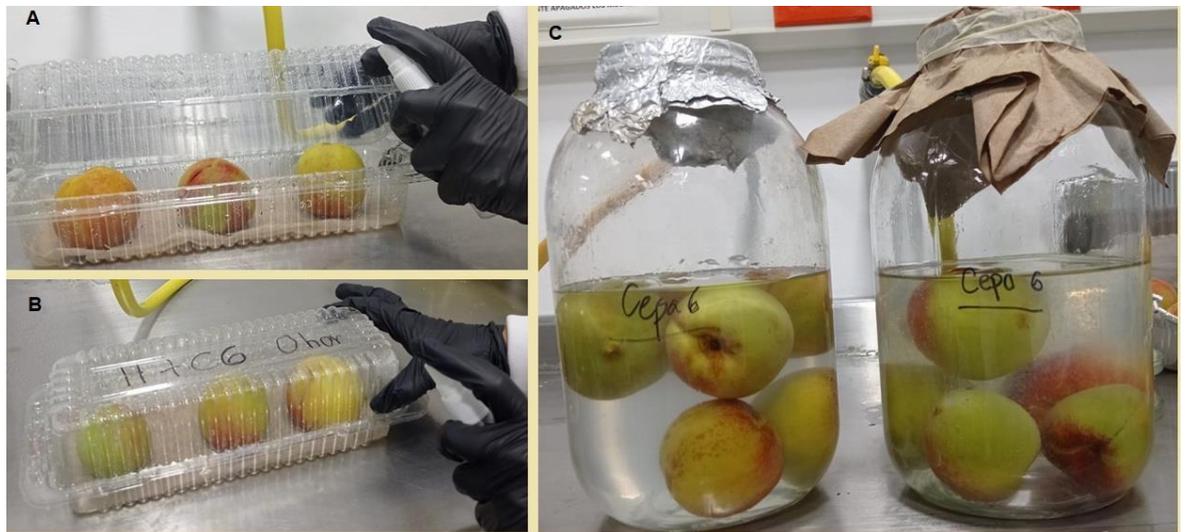
DGP= Diámetro problema

Evaluación de antagonismo in vivo e identificación de patógenos

Los 2 microorganismos que presentaron la mejor capacidad antagónica in vitro se sometieron a pruebas in vivo (Mohammadi et al., 2017) en cámara húmeda (Figura 27) infectando en diferentes tiempos (0, 24, 48 y 72 horas) frutos de durazno frescos previamente desinfectados e inoculados con los biocontroladores, la infección se realizó con el patógeno que demostró mayor índice de daño mediante pruebas de severidad (Corrales et al., 2012; Baños et al., 2004). Paralelamente estos patógenos fueron identificados hasta la mayor categoría taxonómica posible utilizando métodos tradicionales de identificación molecular mediante ITS.

Figura No. 28. A-B. Inoculación de *Monilinia* sp. en frutos de durazno. C.

Inoculación de bacterias antagonistas (cepas 6 y 9) en frutos de durazno.



Fuente: Elaboración Propia (2022)

Extracción de ADN de *Monilinia* sp.

Las extracciones se realizaron a partir de 150 mg de micelio de una placa de 7 días de crecimiento de cultivos monospóricos. La extracción consistió en una maceración del material e incubación en buffer de lisis (200mM Tris HCL, pH 7,5; 250mM NaCl; 25mM EDTA; 0,5% SDS) a 65°C por 30 min. Posterior a la incubación se centrifugó por 10 min a 10000 rpm. Para la precipitación del ADN se utilizó isopropanol a -20°C por 30 min y nuevamente centrifugación a 10000rpm por 5 min. El ADN se resuspendió en 50ml de buffer TE (10mM TRIS, 1mM EDTA, pH8). Para comprobar la presencia de ADN, las muestras fueron corridas en gel de agarosa 1%, con 0,3mg de bromuro de etidio/ml. Para ajustar la cantidad de ADN a usar en PCR, el ADN se cuantificó en espectrofotómetro a 260nm (DO= 1 equivale aproximadamente a 50mg de ADN doble hélice). (Malvárez, Rodríguez, Aguilar, Silvera, y Mondino. 2001p.50).

Amplificación para determinación de especies de *Monilinia* spp.

Para determinar la especie responsable de la infección (más patogénica) se realizó una amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) especie específica de las regiones ITS1 e ITS2 (Internal Transcribed Spacer), según el protocolo de Ios & Frey, 2000.

Extracción de ADN de bacterias

La extracción de ADN total se realizó de acuerdo al método modificado reportado por Rosso & Delécluse, 1997 y Saldivia & Tisnao, 2021.

Para ello, se obtuvo un cultivo bacteriano de 2 mL en medio Luria-Bertani ® a 28 °C, se centrifugó a 8 000 rpm por 5 min, se eliminó el sobrenadante y se re suspendió en 500 µL de buffer (1.0 M TrisHCl, 0.1 M EDTA y 0.15 M NaCl, pH 8). Nuevamente se

centrifugó a 8 000 rpm por 5 min, se re suspendió en 300 µL de buffer conteniendo 40 mg mL de lisozima y se incubó a 37 °C durante 1 h. Posteriormente se le adicionaron 20 µL de SDS al 10%, se homogenizó suavemente y se incubó a 70 °C por 20 min.

Se adicionaron 5 µL de RNAsa (10 mg mL), 10 µL de proteinasa K (10 mg mL) y se incubó a 60 °C por hora y media. Se adicionaron 50 µL de NaCl 5M y se incubó en hielo agitándolo. Se centrifugó a 13000 rpm por 20 min, se recuperó el sobrenadante, se precipitó con el mismo volumen de isopropanol frío y se incubó a

-70 °C durante 30 min. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm por 20 min y se eliminó el sobrenadante, se lavó el pellet con 200 µL de etanol al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente, el ADN se resuspendió en 20 µL de agua destilada estéril y se conservó a -20 °C (Ramírez et al., 2018).

Amplificación para determinación de especies de bacterias

Para la identificación molecular de los aislamientos bacterianos se utilizaron los cebadores universales 616V: 5'- AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG -3' y 699R: 5'-GGG TYK CGC TCG TTR -3', para el extremo 5' del gen, y los cebadores P609D: 5' - GGTTAGATACCCBDGTA -3', P1525R: 5' - WAGGAGGTRATCCADCC -3', para el extremo 3' y BacF (5'-GGGAAACCGGGGCTAATACCGGAT-3'); específico para *Bacillus* y los taxones relacionados) y R1378 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG-3'), el cebador reverso universal bacteriano 16S (Garbea et al., 2003).

La secuenciación de los fragmentos de PCR se llevó a cabo utilizando los mismos cebadores de la PCR a una concentración de 5 nM.

El análisis de la secuencia del gen 16S rRNA se realizó utilizando EzTaxon (Kim et

al., 2012) y BLAST (Altschul et al., 1997). El resultado obtenido se presentó evaluando el porcentaje de semejanza y el número de acceso de la secuencia de la cepa tipo de la especie que presenta el mayor grado de identidad.

Análisis de bacterias mediante espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier

Las cepas bacterianas que demostraron mayor potencial antagónico (2 en total) fueron liofilizadas y posteriormente tratadas mediante espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier para evidenciar regiones características de microorganismos antagonistas. Para tal fin se utilizaron aproximadamente 5mg (5×10^6 UFC) de cada cepa liofilizada. Para cada cepa se tomó el espectro FTIR-ATR comprendida entre 400 y 4.000 cm^{-1} . Todas las medidas fueron precedidas por la toma del espectro de referencia como medida de calibración. Se tomó en cuenta que cada muestra tuviera la misma profundidad de penetración, el ATR se calibró y normalizó previamente, para obtener el espectro de referencia (Rebuffo et al, 2007). Los interferogramas obtenidos para cada especie, se analizaron según varias referencias espectrales (Meena, 2020). De acuerdo a las frecuencias obtenidas en las muestras analizadas, se usó el programa Origin Pro 8.5.0 para calcular la primera derivada de los espectros procesados para así aumentar la resolución de las bandas (Cuellar et al., 2011).

Análisis estadístico

Con el objetivo de seleccionar los microorganismos nativos más eficientes en el control de *Monilinia* sp. tanto *in vitro* como *in vivo* y determinar si existen diferencias en las metodologías de antagonismo evaluadas, se aplicó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, utilizando el software IBM® SPSS® Statistics (Versión

20 para Windows).

Consideraciones Éticas del Proyecto

El proyecto requirió permiso de colecta de ejemplares de la diversidad biológica con fines no comerciales, no se requirió consulta previa a comunidades indígenas o afrodescendientes ni contrato de acceso a recursos genéticos.

El presente proyecto no causó impactos ambientales o sociales negativos. Se dio una adecuada disposición final a los residuos generados producto de los ensayos de laboratorio de acuerdo al Programa de Gestión Integral de los Residuos Hospitalarios y Similares (PGIRHS) de la Universidad de Pamplona (Acuerdo 003 de 2015). Los impactos fueron positivos en materia de conocimiento de la diversidad genética de *Monilinia* spp. y aislamiento e identificación de bacterias antagonistas de patógenos en beneficio de la comunidad científica, los productores de durazno y la competitividad de la región.

RESULTADOS

Objetivo Específico 1:

Aislamiento de cepas de suelos con potencial biocontrolador:

Los protocolos estandarizados anteriormente descritos permitieron aislar 23 (Figura 28) cepas pertenecientes al género *Bacillus* spp de las cuales 9 corresponden al municipio de Chitagá, 8 a Pamplonita y 6 a Cécota.

Figura No. 29. Aislamientos de bacterias de suelos correspondientes a Cécota, Pamplonita y Chitagá.



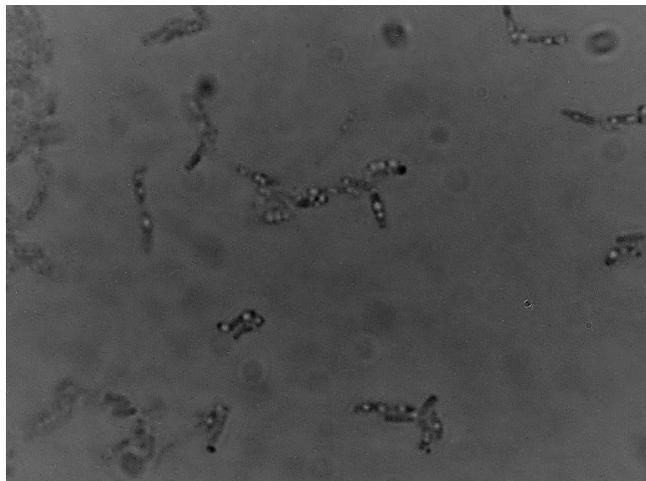
Fuente: Elaboración Propia (2022)

Tabla No. 7. Descripción morfológica de las colonias bacterianas aisladas.

MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS								
	Elevación	Bordes	Forma	Superficie	Tamaño	Reflexión luz	Color	Consistencia
Cepa 1	Plana	Ondulados	Irregular	Lisa	Mediana	Brillante	Beige	Blanda
Cepa 2	Plana	Ondulados	Irregular	Lisa	Grande	Brillante	Beige	Blanda
Cepa 3	Plana	Ondulados	Irregular	Lisa	Grande	Brillante	Beige	Blanda
Cepa 4	Plana	Filamentosos	Filamentosa	Rugosa	Mediana	Mate	Beige	Dura
Cepa 5	Plana	Lobulados	Irregular	Lisa	Mediana	Brillante	Beige	Blanda
Cepa 6	Plana	Lobulados	Irregular	Lisa	Mediana	Brillante	Beige	Mucoide
Cepa 7	Plana	Ondulados	Irregular	Lisa	Grande	Brillante	Beige	Blanda
Cepa 8	Plana	Ondulados	Irregular	Lisa	Grande	Brillante	Beige	Blanda
Cepa 9	Plana	Lobulados	Irregular	Lisa	Pequeña	Brillante	Beige	Mucoide
Cepa 10	Umblicada	Rizoides	Irregular	Plegada	Mediana	Brillante	Beige	Mucoide
Cepa 11	Plana	Lobulados	Irregular	Lisa	Mediana	Mate	Beige	Blanda
Cepa 12	Plana	Redondeados	Circular	Lisa	Mediana	Brillante	Beige	Blanda
Cepa 13	Plana	Redondeados	Circular	Lisa	Mediana	Brillante	Beige	Blanda
Cepa 14	Plana	Redondeados	Circular	Lisa	Puntiforme	Mate	Beige	Blanda
Cepa 15	Plana	Lobulados	Irregular	Lisa	Pequeña	Brillante	Beige	Blanda
Cepa 16	Plana	Lobulados	Irregular	Lisa	Mediana	Brillante	Beige	Blanda
Cepa 17	Plana	Lobulados	Irregular	Lisa	Mediana	Brillante	Beige	Blanda
Cepa 18	Plana	Redondeados	Irregular	Lisa	Grande	Brillante	Beige	Blanda
Cepa 19	Plana	Lobulados	Irregular	Lisa	Mediana	Brillante	Beige	Blanda
Cepa 20	Plana	Lobulados	Irregular	Lisa	Grande	Brillante	Beige	Blanda
Cepa 21	Plana	Lobulados	Irregular	Lisa	Mediana	Brillante	Beige	Blanda
Cepa 22	Plana	Lobulados	Irregular	Lisa	Mediana	Brillante	Beige	Mucoide
Cepa 23	Convexa	Lobulados	Irregular	Lisa	Grande	Mate	Beige	Blanda

Fuente: Elaboración Propia (2022)

Figura No. 30. Bacilos Gram positivos endosporados



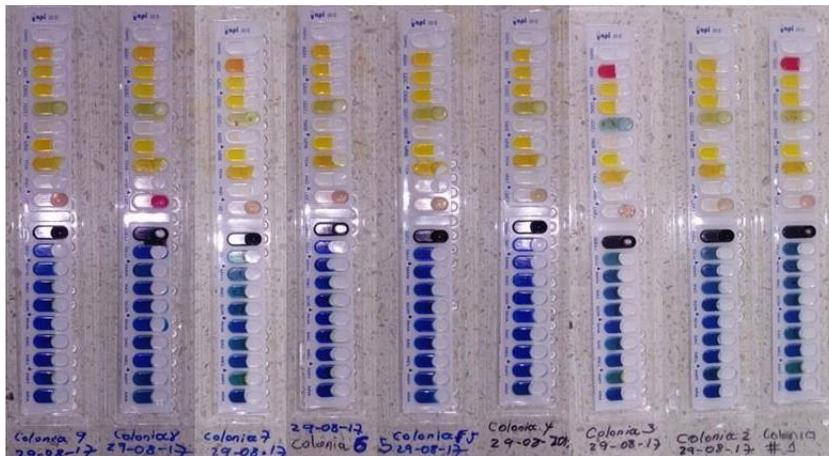
Fuente: Elaboración Propia (2022)

Figura No. 31. Pruebas bioquímicas de las cepas aisladas (A. Hemólisis de sangre. B. Hidrólisis de almidón. C. Prueba de reducción de Nitratos. D. Prueba de oxidación-fermentación Xilosa. E. Prueba de oxidación-fermentación Ribosa.



Fuente: Elaboración Propia (2022)

Figura No. 32 . Pruebas API de las 9 cepas de bacterias pre seleccionadas en el estudio.



Fuente: Elaboración Propia (2022)

La caracterización (Tabla 8) de las cepas realizada macroscópica, microscópica y bioquímicamente permitió seleccionar (9 cepas) aquellos microorganismos con características que la literatura referencia como presentes en la mayor parte de los antagonistas de fitopatógenos, tal es el caso de las bacterias con forma de bacilos, gram positivos y con presencia de endospora (Figura 27) y la capacidad de algunos para hemolizar la sangre, realizar hidrólisis de la albúmina y del almidón, la reducción de nitratos y la oxidación-fermentación de azúcares, entre otros (Figura 32).

Todo lo anterior fue apoyado por pruebas bioquímicas rápidas para identificación de bacilos API 20E que si bien son baterías diseñadas para enterobacterias (APIWEB™, 2022), algunas de las pruebas son útiles para caracterización bioquímica de las muestras en cuestión.

Las 9 cepas mostraron las siguientes características:

Tabla No. 8. Resultados de pruebas bioquímicas de las cepas bacterianas aisladas.

	<i>Cepa 1</i>	<i>Cepa 2</i>	<i>Cepa 3</i>	<i>Cepa 4</i>	<i>Cepa 5</i>	<i>Cepa 6</i>	<i>Cepa 7</i>	<i>Cepa 8</i>	<i>Cepa 9</i>
ONPG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADH	+	-	+	-	-	-	+	-	-
LDC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CIT	-	-	+	-	-	-	-	-	-
H₂S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	+	-	-	-	-	+	+	+	+
GEL	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitratos	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Yema Egg	+	+	+	+	-	-	+	+	-
Sangre	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Almidón	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Rib	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Fruc	+	+	+	+	-	-	+	+	-
Xil	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ram	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ara	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gal	-	O- F+	-	-	-	-	-	-	-
Man	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fuente: Elaboración Propia (2022)

Aislamiento de cepas de *Monilinia spp* de frutos de duraznos contaminados:

La metodología estandarizada permitió aislar 14 cepas (Tabla 9) pertenecientes a los 3 municipios, 2 de Cécota, 5 de Chitagá y 7 de Pamplonita (Figura 32).

Figura No. 33 . Aislamientos de *Monilinia* spp. pertenecientes a Cécota, Chitagá y Pamplonita.



Fuente: Elaboración Propia (2022)

Tabla No. 9. Aislamientos de *Monilinia* spp en cada uno de los 3 municipios con su respectiva codificación.

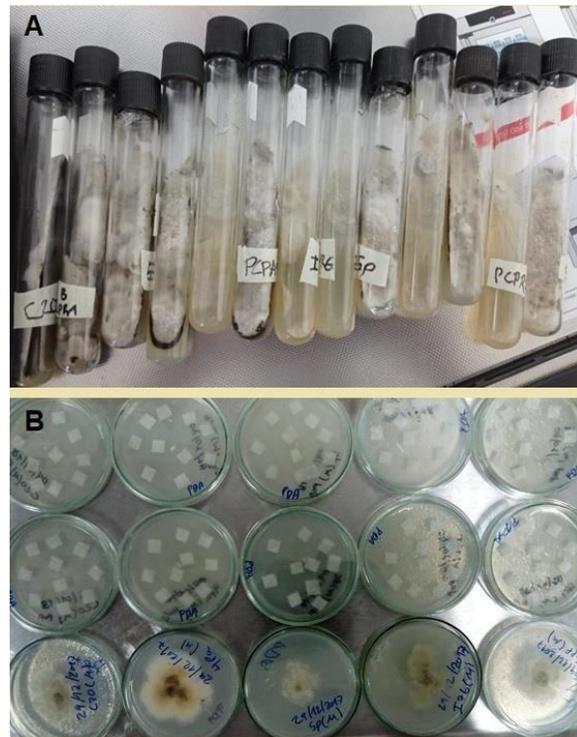
	PAMPLONITA	#	CHITAGA	#	CACOTA
1	PCPa1	1	C20	1	I7B
2	PCPa2	2	4Pa	2	5P
3	PCPr1	3	5Pa		
4	PCPr2	4	5Pf		
5	PZUr1	5	5pe		
6	PZUr6				
7	PZUr7				

Fuente: Elaboración Propia (2022)

Dichos aislamientos se conservaron mediante diferentes métodos para los procedimientos posteriores que incluyen las pruebas de antagonismo in vitro e in vivo y la posterior caracterización morfológica y molecular. Uno de los métodos inicialmente probados fue el de repique sucesivo, pero este demostró ser ineficiente en varios aspectos dentro de los que se incluye la pérdida de patogenicidad, de virulencia, de capacidad de esporular, el cambio de morfología y los altos costos (Gutiérrez et al., 2017). Posteriormente se utilizó el método de cultivo en tubo en “pico de flauta” con PDA (Figura 33 A) que consiste en poner inóculo en tubos con PDA con asa recta e incubar por 4 días a 25 °C para posteriormente guardar en nevera.

Adicionalmente se utilizó un tercer método que consiste en preservar los cultivos en papel filtro (Figura 33 B), para ello se usan tiras cortas de papel filtro Whatman N. 4 de 0,5 cm x 0,5 cm previamente esterilizadas en autoclave por 20 min a 120°C y secadas posteriormente en horno, luego se ponen sobre el PDA recién inoculado y se espera que se dé el crecimiento, se sacan con pinzas aquellas que ya estén colonizadas de micelio, se ponen a secar en cajas de Petri estériles en incubadora y se introducen en sobres de papel aluminio estéril y luego en sobres de papel sulfurizado (10 x 10 cm) y se guardan en cajones estériles a 4°C (Tibaduiza Castañeda et al., 2021).

Figura No. 34 . A. Cultivo de *Monilinia* spp. en tubo “pico de flauta”. B. Cultivo de *Monilinia* spp. en papel filtro.



Fuente: Elaboración Propia (2022)

Para preservar la virulencia y patogenicidad de las cepas se realizaron inoculaciones de éstas en duraznos maduros previamente desinfectados con hipoclorito al 1% por 1

minuto, enjuague con agua destilada estéril, inmersión en etanol al 70% por 1 minuto y triple lavado con agua destilada estéril, estos se incubaron por 7 días con intervalos 12/12 horas de luz oscuridad en cámara húmeda(Estrada-Vélez et al., 1999) y se volvieron a aislar de las lesiones causadas (Figura 34) para posteriormente repetir los métodos de conservación anteriormente descritos.

Figura No. 35 . Infección de duraznos con *Monilinia* spp. previamente aislado y en cultivomonospórico.



Fuente: Elaboración Propia (2022)

Nota: Durante el aislamiento producto de la emergencia económica, social y ecológica decretada por la pandemia de COVID 19 se contaminaron la totalidad de las cepas de *Monilinia* spp por lo cual tuvieron que someterse a varias limpiezas y finalmente la mayor parte de ellas se perdieron (65%) y solamente lograron recuperarse 5 (35%) de ellas (PZUr1, PCPr2, C20, PCPr1 y 5Pa).

Las pruebas de severidad en frutos evidenciaron los siguientes resultados:

PCPr2=5.1cm / PCPr1=4,7cm / 5Pa=3,1cm / C20=1,1cm / PZUr1=0,6cm

El porcentaje de *severidad* es el siguiente:

$\%S = ((DM*100)/DC)$ donde DM: Diámetro medido y DC: Diámetro control que equivale a 6 cm como diámetro promedio de los frutos de durazno Extra — A (Gutierrez-Acosta et al, 2008).

$$\mathbf{PCPr2\%S=}$$

$$(5,1*100)/6)= \mathbf{85\%}$$

$$PCPr1\%S=$$

$$((4,7*100)/6)=\mathbf{78,3\%5Pa\%S=}$$

$$((3,1*100)/6)=\mathbf{51,6\%}$$

$$C20\%S= ((1,1*100)/6)=\mathbf{18,3\%}$$

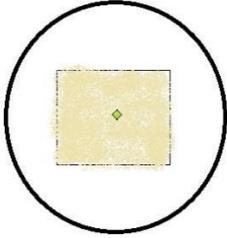
$$PZUr1\%S=$$

$$((0,6*100)/6)=\mathbf{10\%}$$

Objetivo Específico 2:

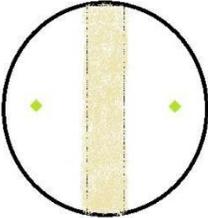
Los enfrentamientos realizados *in vitro* obedecieron a 4 metodologías pre seleccionadas de las cuales se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla No. 10. Resultados de enfrentamientos duales cepa de *Monilinia* sp. PCPr2 mediante la metodología de Igarashi et al., 1997 (Crecimiento del hongo mm)

<p>Técnica A</p> 	Cepa 1A= 53	Cepa 4A= 25	Cepa 7A= 72
	Cepa 1B= 55	Cepa 4B= 25	Cepa 7B= 90
	Cepa 1C= 63	Cepa 4C= 27	Cepa 7C= 75
	Cepa 2A= 0	Cepa 5A= 0	Cepa 8A= 90
	Cepa 2B= 0	Cepa 5B= 0	Cepa 8B= 55
	Cepa 2C= 0	Cepa 5C= 0	Cepa 8C= 85
	Cepa 3A= 90	Cepa 6A= 0	Cepa 9A= 0
	Cepa 3B= 65	Cepa 6B= 0	Cepa 9B= 0
	Cepa 3C= 55	Cepa 6C= 0	Cepa 9C= 0

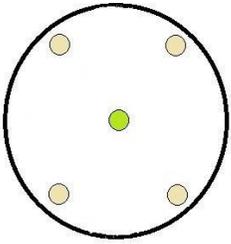
Fuente: Elaboración Propia. (2022)

Tabla No. 11. Resultados de enfrentamientos duales cepa de *Monilinia* sp. PCPr2 mediante la metodología de Gómez y Ortega, 1993 (Crecimiento del hongo mm)

<p>Técnica B</p> 	Cepa 1A= 21,5	Cepa 4A= 35	Cepa 7A= 45
	Cepa 1B= 20	Cepa 4B= 30	Cepa 7B= 45
	Cepa 1C= 45	Cepa 4C= 40	Cepa 7C= 45
	Cepa 2A= 22,5	Cepa 5A= 30	Cepa 8A= 45
	Cepa 2B= 30	Cepa 5B= 28,5	Cepa 8B= 45
	Cepa 2C= 35	Cepa 5C= 25	Cepa 8C= 25
	Cepa 3A= 45	Cepa 6A= 30	Cepa 9A= 0
	Cepa 3B= 45	Cepa 6B= 25	Cepa 9B= 0
	Cepa 3C= 45	Cepa 6C= 0	Cepa 9C= 0

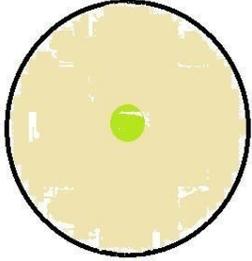
Fuente: Elaboración Propia. (2022)

Tabla No. 12. Resultados de enfrentamientos duales cepa de *Monilinia* sp. PCPr2 mediante la metodología de Villamil et al., 2012 (Crecimiento del hongo mm).

Técnica C 	Cepa 1A= 45	Cepa 4A= 05	Cepa 7A= 47
	Cepa 1B= 58	Cepa 4B= 33	Cepa 7B= 50
	Cepa 1C= 82	Cepa 4C= 30	Cepa 7C= 45
	Cepa 2A= 30	Cepa 5A= 15	Cepa 8A= 55
	Cepa 2B= 23	Cepa 5B= 0	Cepa 8B= 35
	Cepa 2C= 15	Cepa 5C= 0	Cepa 8C= 23
	Cepa 3A= 55	Cepa 6A= 0	Cepa 9A= 0
	Cepa 3B= 85	Cepa 6B= 0	Cepa 9B= 0
Cepa 3C= 42	Cepa 6C= 0	Cepa 9C= 0	

Fuente: Elaboración Propia. (2022)

Tabla No. 13. Resultados de enfrentamientos duales cepa de *Monilinia* sp. PCPr2 mediante la metodología de Bashan et al., 1996 (Crecimiento del hongo mm).

Técnica D 	Cepa 1A= 45	Cepa 4A= 20	Cepa 7A= 55
	Cepa 1B= 60	Cepa 4B= 45	Cepa 7B= 38
	Cepa 1C= 40	Cepa 4C= 50	Cepa 7C= 45
	Cepa 2A= 15	Cepa 5A= 0	Cepa 8A= 25
	Cepa 2B= 15	Cepa 5B= 0	Cepa 8B= 15
	Cepa 2C= 10	Cepa 5C= 0	Cepa 8C= 15
	Cepa 3A= 40	Cepa 6A= 0	Cepa 9A= 0
	Cepa 3B= 48	Cepa 6B= 0	Cepa 9B= 0
Cepa 3C= 60	Cepa 6C= 0	Cepa 9C= 0	

Fuente: Elaboración Propia. (2022)

Fue evidente a simple vista la capacidad de control de algunas cepas como la 9 y la pobre capacidad de antagonismo de otras como la 3 (Figura 35).

El porcentaje de inhibición de cada cepa fue:

$$\text{Cepa 1: } \%I = ((38,2\text{mm}-48,9\text{mm}) / 38,2\text{mm}) \times 100 = -28\%$$

$$\text{Cepa 2: } \%I = ((38,2\text{mm}-16,2\text{mm}) / 38,2\text{mm}) \times 100 = 57,5\%$$

$$\text{Cepa 3: } \%I = ((38,2\text{mm}-56,2\text{mm}) / 38,2\text{mm}) \times 100 = -47,1\%$$

$$\text{Cepa 4: } \%I = ((38,2\text{mm}-41,9\text{mm}) / 38,2\text{mm}) \times 100 = -9,6\%$$

$$\text{Cepa 5: } \%I = ((38,2\text{mm}-8,2\text{mm}) / 38,2\text{mm}) \times 100 = 78,5\%$$

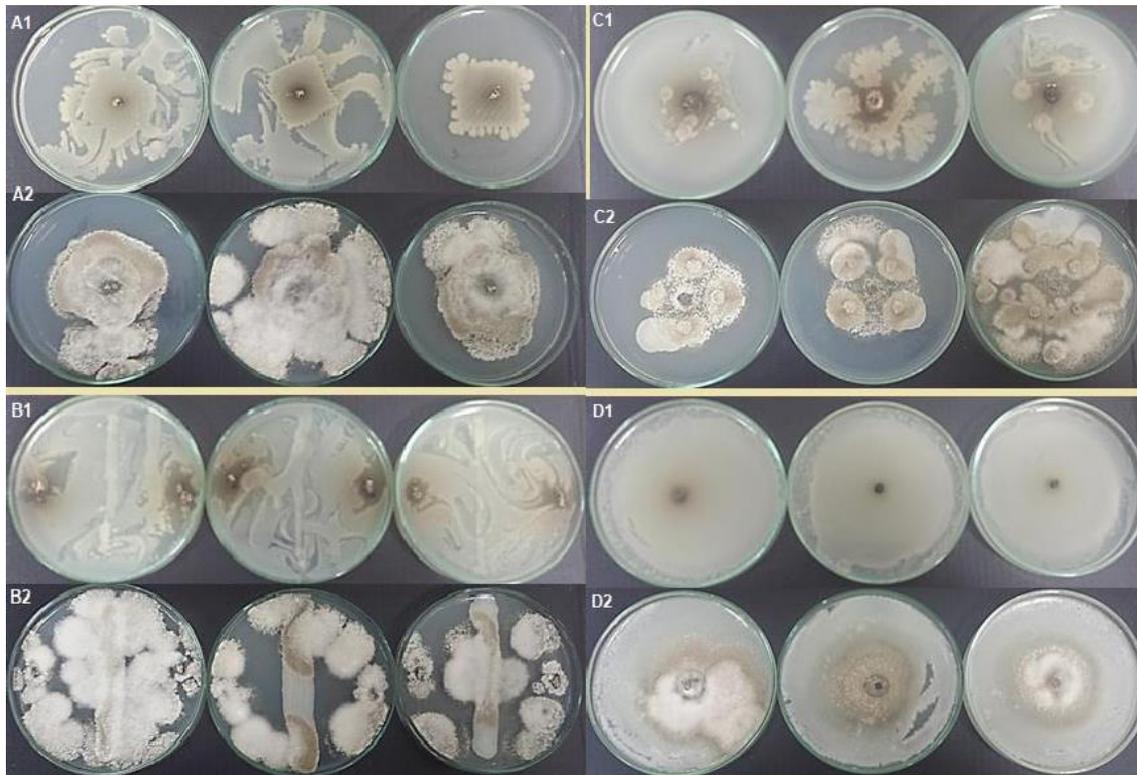
$$\text{Cepa 6: } \%I = ((38,2\text{mm}-4,5\text{mm}) / 38,2\text{mm}) \times 100 = \underline{88,2\%}$$

$$\text{Cepa 7: } \%I = ((38,2\text{mm}-54,3\text{mm}) / 38,2\text{mm}) \times 100 = -42,1\%$$

$$\text{Cepa 8: } \%I = ((38,2\text{mm}-44,4\text{mm}) / 38,2\text{mm}) \times 100 = -16,23\%$$

$$\text{Cepa 9: } \%I = ((38,2\text{mm}-0\text{mm}) / 38,2\text{mm}) \times 100 = \underline{100\%}$$

Figura No. 36 . Metodología de Igarashi et al., 1997 (1.Cepa 9. 2. Cepa 3.). B. Metodología de Gómez & Ortega, 1993 (1.Cepa 9. 2. Cepa 3.). C. Metodología de Villamil et al., 2012 (1.Cepa 9. 2. Cepa 3.). D. Metodología de Bashan et al., 1996 (1.Cepa 9. 2. Cepa 3.).



Fuente: Autores (2022)

En un primer análisis estadístico para evaluar si existen diferencias significativas entre el crecimiento de la cepa de *Monilinia* sp. PCPr2 versus cada una de las 9 cepas de *Bacillus* en cada uno de los 4 protocolos de enfrentamiento puestos a prueba se encontró lo siguiente:

La prueba de contraste de Levene sobre la homogeneidad de varianzas y las de normalidad de la distribución del crecimiento de la cepa de *Monilinia* sp. PCPr2 respecto a cada protocolo y respecto a las 9 cepas (Figura 34) arrojó diferencias significativas entre las varianzas ($p < 0,05$) para la primera y segunda prueba en todos los casos y en 5 de los 9 de la tercera prueba

en Shapiro-Wilk (C) lo que indica que al tratarse de datos heterocedásticos y que no presentan una distribución normal, deben ser analizados mediante pruebas no paramétricas (Tabla 14).

Tabla No. 14. A. Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas. B. Pruebas de normalidad del crecimiento de la cepa de *Monilinia* sp PCPr2 en cada protocolo de enfrentamiento. C. Pruebas de normalidad del crecimiento de la cepa de *Monilinia* sp PCPr2 con cada cepa de *Bacillus* spp.

A. Variable dependiente: CRECIMIENTO

F	gl1	gl2	Sig.
5,007	35	72	,000

B. Pruebas de normalidad

	PROTOCOLO	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
CRECIMIENTO	1	,277	27	,000	,811	27	,000
	2	,174	27	,034	,841	27	,001
	3	,162	27	,067	,901	27	,014
	4	,193	27	,011	,859	27	,002

a. Corrección de la significación de Lilliefors

C. Pruebas de normalidad^c

	CEPA	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
CRECIMIENT O	1	,159	12	,200*	,949	12	,622
	2	,158	12	,200*	,918	12	,274
	3	,197	12	,200*	,837	12	,025
	4	,157	12	,200*	,967	12	,882
	5	,409	12	,000	,665	12	,000
	6	,498	12	,000	,481	12	,000
	7	,274	12	,013	,789	12	,007
	8	,177	12	,200*	,893	12	,128

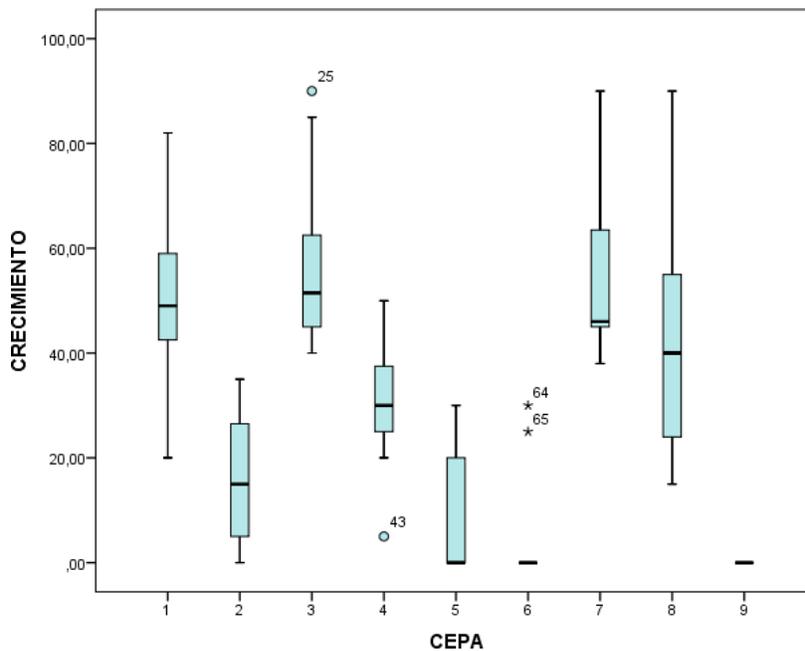
*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

c. CRECIMIENTO es una constante cuando CEPA = 9 y se ha desestimado.

Fuente: Autores (2022)

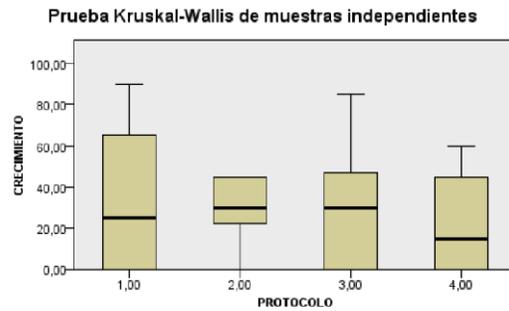
Figura No. 37 Gráfico de distribución de los valores de crecimiento (medias) de la cepade *Monilinia* sp. PCPr2 ante la exposición con cada una de las 9 cepas de *Bacillus* spp.



Fuente: Autores (2022)

La prueba no paramétrica realizada fue Kruskal – Wallis (KW) de muestras independientes la cual evidenció que la distribución del crecimiento no presenta diferencias significativas (Figura 35) respecto a cada uno de los 4 protocolos utilizados para las pruebas de antagonismo *in vitro* ($p>0.05$).

Figura No. 38. Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes (medianas) para la distribución del crecimiento de la cepa en cada uno de los 4 protocolos evaluados.



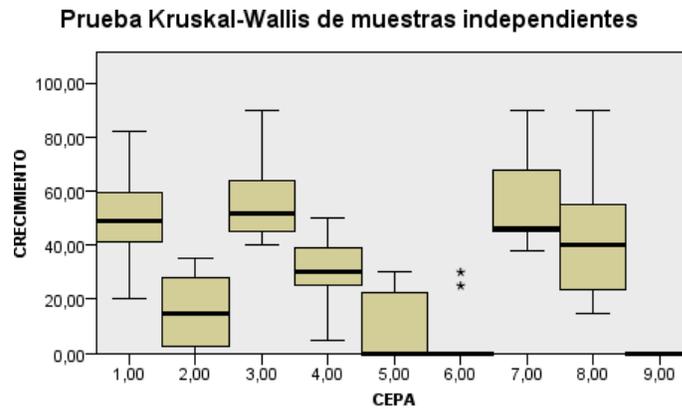
N total	108
Probar estadística	1,184
Grados de libertad	3
Sig. asintótica (prueba de dos caras)	,757

1. Las estadísticas de prueba se ajustan para empates.
2. No se realizan múltiples comparaciones porque la prueba global no muestra diferencias significativas en las muestras.

Fuente: Autores (2022)

Por su parte la prueba KW de muestras independientes evidenció que la distribución del crecimiento de la cepa de *Monilinia* sp. PCPr2 presenta diferencias significativas (Figura 36) con la exposición a cada cepa de *Bacillus* spp. durante las pruebas de antagonismo *in vitro* ($p<0,05$).

Figura No. 39. Prueba Kruskal-Wallis (KW) de muestras independientes (medianas) para la distribución del crecimiento de la cepa de *Monilinia* sp. PCPr2 ante la exposición con cada una de las 9 cepas de *Bacillus* spp.



N total	108
Probar estadística	79,466
Grados de libertad	8
Sig. asintótica (prueba de dos caras)	,000

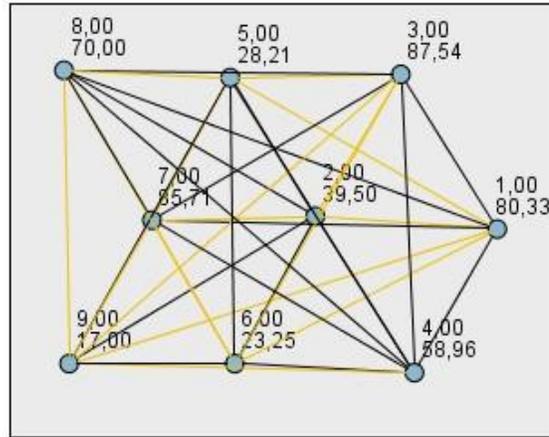
1. Las estadísticas de prueba se ajustan para empates.

Fuente: Autores (2022)

Las comparaciones por parejas permitieron establecer que existe un grupo formado por las cepas 9, 6, 5 y 2 quienes entre sí no muestran diferencias significativas en el crecimiento de la cepa de *Monilinia* sp. PCPr2 (Figura 37). De ellas las cepas 6 y 9 son las que mostraron mayor potencial inhibitorio del crecimiento fúngico (menor crecimiento del patógeno) por lo que fueron seleccionadas para los ensayos in vivo.

Figura No. 40. Comparación por parejas en la prueba Kruskal-Wallis (KW) de muestras independientes (medianas) para la distribución del crecimiento de la cepa de *Monilinia* sp. PCPr2 ante la exposición con cada una de las 9 cepas de *Bacillus* spp.

Comparaciones por parejas de CEPA



Cada nodo muestra el rango de media de muestras de CEPA.

Muestra1-Muestra2	Prueba estadística	Error típico	Desv. Prueba estadística	Sig.	Sig. ady.
9,00-6,00	6,250	12,584	,497	,619	1,000
9,00-5,00	11,208	12,584	,891	,373	1,000
9,00-2,00	22,500	12,584	1,788	,074	1,000
9,00-4,00	41,958	12,584	3,334	,001	,031
9,00-8,00	53,000	12,584	4,212	,000	,001
9,00-1,00	63,333	12,584	5,033	,000	,000
9,00-7,00	68,708	12,584	5,460	,000	,000
9,00-3,00	70,542	12,584	5,606	,000	,000
6,00-5,00	4,958	12,584	,394	,694	1,000
6,00-2,00	16,250	12,584	1,291	,197	1,000
6,00-4,00	35,708	12,584	2,838	,005	,164
6,00-8,00	-46,750	12,584	-3,715	,000	,007
6,00-1,00	57,083	12,584	4,536	,000	,000
6,00-7,00	-62,458	12,584	-4,963	,000	,000
6,00-3,00	64,292	12,584	5,109	,000	,000
5,00-2,00	11,292	12,584	,897	,370	1,000
5,00-4,00	30,750	12,584	2,444	,015	,524
5,00-8,00	-41,792	12,584	-3,321	,001	,032
5,00-1,00	52,125	12,584	4,142	,000	,001
5,00-7,00	-57,500	12,584	-4,569	,000	,000
5,00-3,00	59,333	12,584	4,715	,000	,000
2,00-4,00	-19,458	12,584	-1,546	,122	1,000
2,00-8,00	-30,500	12,584	-2,424	,015	,553
2,00-1,00	40,833	12,584	3,245	,001	,042
2,00-7,00	-46,208	12,584	-3,672	,000	,009
2,00-3,00	-48,042	12,584	-3,818	,000	,005
4,00-8,00	-11,042	12,584	-,877	,380	1,000
4,00-1,00	21,375	12,584	1,699	,089	1,000
4,00-7,00	-26,750	12,584	-2,126	,034	1,000
4,00-3,00	28,583	12,584	2,271	,023	,833
8,00-1,00	10,333	12,584	,821	,412	1,000
8,00-7,00	15,708	12,584	1,248	,212	1,000
8,00-3,00	17,542	12,584	1,394	,163	1,000
1,00-7,00	-5,375	12,584	-,427	,869	1,000
1,00-3,00	-7,208	12,584	-,573	,567	1,000
7,00-3,00	1,833	12,584	,146	,884	1,000

Cada fila prueba la hipótesis nula que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son las mismas. Se muestran las significancias asintóticas (pruebas de 2 caras). El nivel de significancia es ,05.

Fuente: Autores (2022)

Los ensayos in vivo se realizaron evaluando las cepas 6 y 9 las cuales demostraron el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno PCPr2 in vitro. Los ensayos se realizaron inoculando el patógeno al tiempo con los potenciales antagonistas, a las 24 de horas de haber sido tratados con las cepas, a las 48 y 72 horas (Tabla 15).

Tabla No. 15. Crecimiento (cm) del patógeno PCPr2 en frutos de durazno embebidos con las cepas de *Bacillus* sp. 6 y 9 en 4 diferentes tiempos.

COMBINACIÓN	TIEMPO	CRECIMIENTO		
PCPr2 + Cepa 6	0 horas	3,3	6	6
PCPr2 + Cepa 6	24 horas	0	5,3	1,4
PCPr2 + Cepa 6	48 horas	1,7	0	2,5
PCPr2 + Cepa 6	72 horas	2,6	2	0,6
PCPr2 + Cepa 9	0 horas	0	0	0
PCPr2 + Cepa 9	24 horas	0	1,8	0
PCPr2 + Cepa 9	48 horas	0	0	0,5
PCPr2 + Cepa 9	72 horas	0	0,7	0

Fuente: Autores (2022)

Los análisis estadísticos para evaluar si existen diferencias significativas entre el crecimiento de la cepa de *Monilinia* sp. PCPr2 en frutos de durazno cubiertos con las 2 cepas de *Bacillus* en 4 diferentes tiempos permitieron establecer: La prueba de contraste de Levene sobre la homogeneidad de varianzas y las de normalidad de la distribución del crecimiento de la cepa de *Monilinia* sp. PCPr2 en frutos de durazno cubiertos con las 2 cepas de *Bacillus* en 4 diferentes tiempos arrojó diferencias significativas entre las varianzas ($p < 0,05$) para la primera prueba (A) y para la segunda prueba 1 de los 2 casos (B). En la tercera prueba 2 de los 4 mediante Shapiro-Wilk (C), lo que indica que al tratarse de datos heterocedásticos y que no presentan una distribución normal, deben ser analizados mediante pruebas no paramétricas (Tabla 16).

Tabla No. 16. A. Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas. B.

Pruebas de normalidad del crecimiento de la cepa de *Monilinia* sp. PCPr2 en frutos de durazno expuestos a las cepas 6 y 9. C. Pruebas de normalidad del crecimiento de la cepa de *Monilinia* sp. PCPr2 en frutos de durazno expuestos a las cepas 6 y 9 a las 0, 24, 48 y 72 horas.

A. Variable dependiente: CRECIMIENTO

F	gl1	gl2	Sig.
4,556	7	16	,006

B. Pruebas de normalidad

	TRATAMIENTO	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
CRECIMIENT	1,00	,170	12	,200*	,901	12	,165
O	2,00	,428	12	,000	,552	12	,000

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

C. Pruebas de normalidad

	TIEMPO	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
CRECIMIENT	1,00	,305	6	,084	,776	6	,035
O	2,00	,260	6	,200*	,767	6	,029
	3,00	,271	6	,191	,794	6	,052
	4,00	,270	6	,194	,865	6	,208

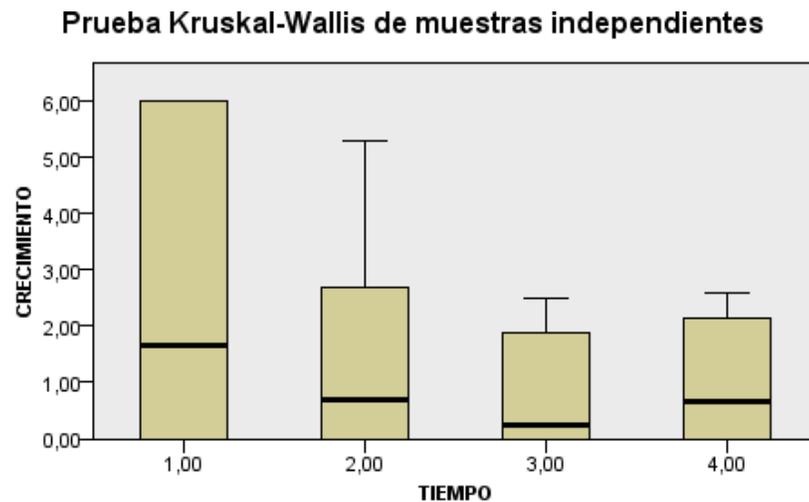
*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Fuente: Autores (2022)

La prueba no paramétrica realizada fue Kruskal – Wallis (KW) de muestras independientes la cual evidenció que el crecimiento no presenta diferencias significativas (Figura 40) respecto a cada uno de los 4 tiempos de las pruebas de antagonismo in vivo ($p>0,05$).

Figura No. 41. Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes (medianas) para el crecimiento de la cepa de *Monilinia* sp. PCPr2 en cada uno de los 4 tiempos evaluados.



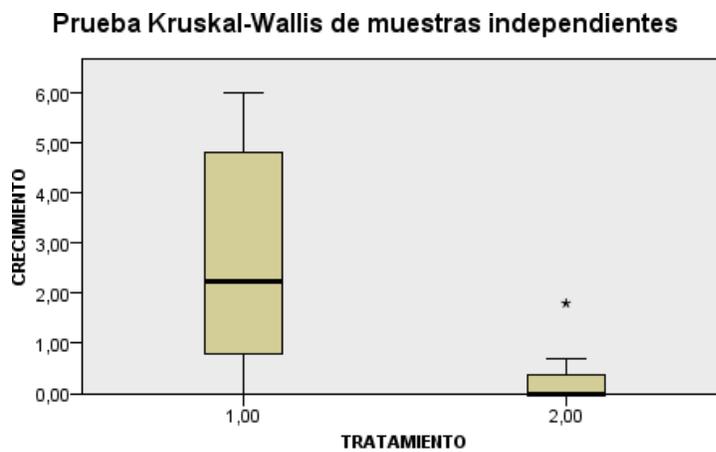
N total	24
Probar estadística	,863
Grados de libertad	3
Sig. asintótica (prueba de dos caras)	,834

1. Las estadísticas de prueba se ajustan para empates.
2. No se realizan múltiples comparaciones porque la prueba global no muestra diferencias significativas en las muestras.

Fuente: Autores (2022)

Por su parte la prueba KW de muestras independientes evidenció que la distribución del crecimiento de la cepa de *Monilinia* sp. PCPr2 presenta diferencias significativas (Figura 41) con la exposición a cada cepa de *Bacillus* spp. durante las pruebas de antagonismo *in vivo* ($p < 0,05$).

Figura No. 42 Prueba Kruskal-Wallis (KW) de muestras independientes (medianas) para la distribución del crecimiento de la cepa de *Monilinia* sp. PCPr2 ante la exposición a cada una de las 2 cepas de *Bacillus* spp.



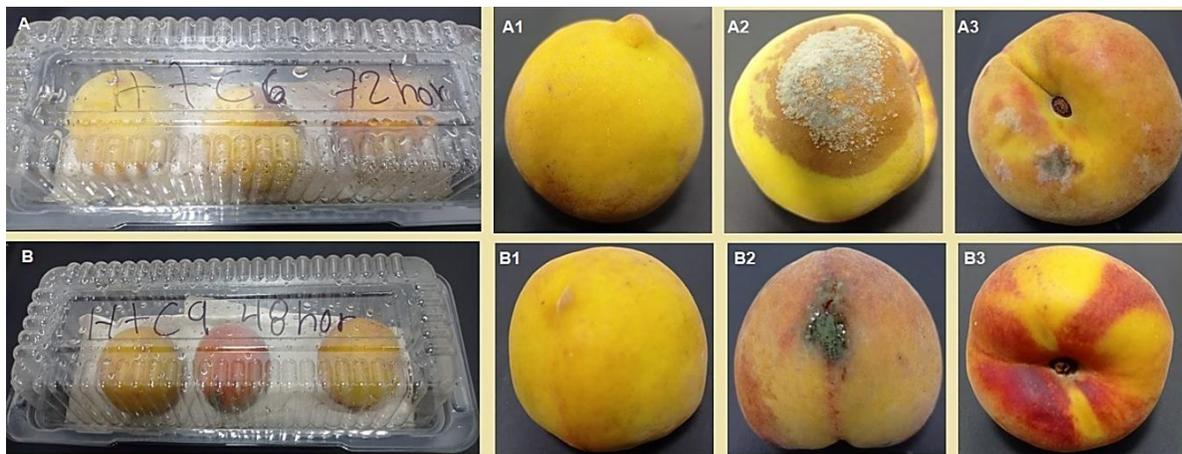
N total	24
Probar estadística	10,359
Grados de libertad	1
Sig. asintótica (prueba de dos caras)	,001

1. Las estadísticas de prueba se ajustan para empates.
2. No se realizan múltiples comparaciones porque hay menos de tres campos.

Fuente: Autores (2022)

Se evidencia entonces que el tratamiento 2 (cepa 9) inhibe casi en su totalidad el crecimiento del patógeno en los 4 tiempos y que éstos a su vez no determinan significativamente la efectividad de las dos bacterias antagonistas evaluadas (Figura 40 B). Por su parte el tratamiento 1 (cepa 6) permite, en un grado mayor, aunque bastante bajo, el crecimiento del patógeno (Figura 42 A).

Figura No. 43 Pruebas de antagonismo *in vivo* A-1-2-3. Frutos de durazno cubiertos de la cepa 6 de *Bacillus* sp. e inoculadas con el patógeno *Monilinia* sp. PCPr2 a las 72 horas de aplicado el biocontrolador. B-1-2-3. Frutos de durazno cubiertos de la cepa 9 de *Bacillus* sp. e inoculadas con el patógeno *Monilinia* sp. PCPr2 a las 48 horas de aplicado el biocontrolador.



Fuente: Autores (2022)

Lo anterior permitió seleccionar la cepa **PCPr2** para realizar las pruebas de antagonismo.

Objetivo Específico 3:

Teniendo en cuenta que en las pruebas *in vitro* e *in vivo* las cepas 6 y 9 de fueron las de mayor potencial antagonico se procedió a realizar su caracterización morfológica, bioquímica, microscópica, mediante FTIR-ATR y molecular.

Figura No. 44 Cepas 6 y 9 cultivadas en Agar Nutritivo.



Fuente: Autores (2022)

La cepa 6 corresponde morfológicamente a colonias medianas de bacilos endosporados aeróbicos. Se trata de colonias planas, de bordes lobulados, con forma irregular, de superficie lisa, brillante y húmeda y de consistencia mucoide.

Por su parte la cepa 9 corresponde a colonias pequeñas de bacilos endosporados aeróbicos. Se trata de colonias planas, de bordes lobulados, con forma irregular, de superficie lisa, brillante y húmeda y de consistencia mucoide.

En el aspecto bioquímico la cepa 6 en la prueba ONPG β -galactosidasa (orto- nitrofenil- β Dgalactoprianosidasa) muestra que no es fermentadora de la lactosa, enADH Arginina-dihidrolasa evidencia que no tiene la capacidad de realizar catálisis de L-arginina, en cuanto a LDC Lisina Decarboxilasa muestra que la cepa 6 no posee enzimas descarboxilasas para la Lisina, ODC Ornitina Decarboxilasa la cepa 6 posee enzimas descarboxilasas para la Ornitina,

CIT la bacteria no utiliza el Citrato, H₂S no produce H₂S, URE Ureasa no posee capacidad para hidrolizar la urea, TDA Triptofano DesAminasa la cepa no posee enzimas para catalizar la liberación del resto amina primaria del triptófano, IND la bacteria no produce Indol, VP la cepa produce acetoina, GEL Gelatinasa la cepa 6 hidroliza la gelatina, la bacteria posee la capacidad de reducir nitratos, Yema de Huevo la bacteria no posee la enzima lecitinasa, Sangre la cepa 6 produce hemolisinas, Almidón la bacteria no hidroliza el almidón, la cepa 6 ni oxida ni fermenta los azúcares ribosa, fructosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, galactosa, manitol.

Por su parte la cepa 9 en la prueba ONPG β -galactosidasa (orto-nitrofenil- β Dgalactopiranosidasa) muestra que no es fermentadora de la lactosa, en ADH Arginina-dihidrolasa evidencia que no tiene la capacidad de realizar catálisis de L- arginina, en cuanto a LDC Lisina Decarboxilasa muestra que la cepa 9 no posee enzimas descarboxilasas para la Lisina, ODC Ornitina Decarboxilasa la cepa no posee enzimas descarboxilasas para la Ornitina, CIT la bacteria no utiliza el Citrato, H₂S no produce H₂S, URE Ureasa no posee capacidad para hidrolizar la urea, TDA Triptofano DesAminasa la cepa no posee enzimas para catalizar la liberación del resto amina primaria del triptófano, IND la bacteria no produce Indol, VP la cepa produce acetoina, GEL Gelatinasa la cepa 9 hidroliza la gelatina, la bacteria posee la capacidad de reducir nitratos, Yema de Huevo la bacteria no posee la enzima lecitinasa, Sangre la cepa 9 produce hemolisinas, Almidón la bacteria no hidroliza el almidón, la cepa 9 ni oxida ni fermenta los azúcares ribosa, fructosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, galactosa, manitol.

Tanto la cepa 6 como la 9 no sintetizan catalasa para hidrolizar el peróxido de hidrógeno (Figura 44).

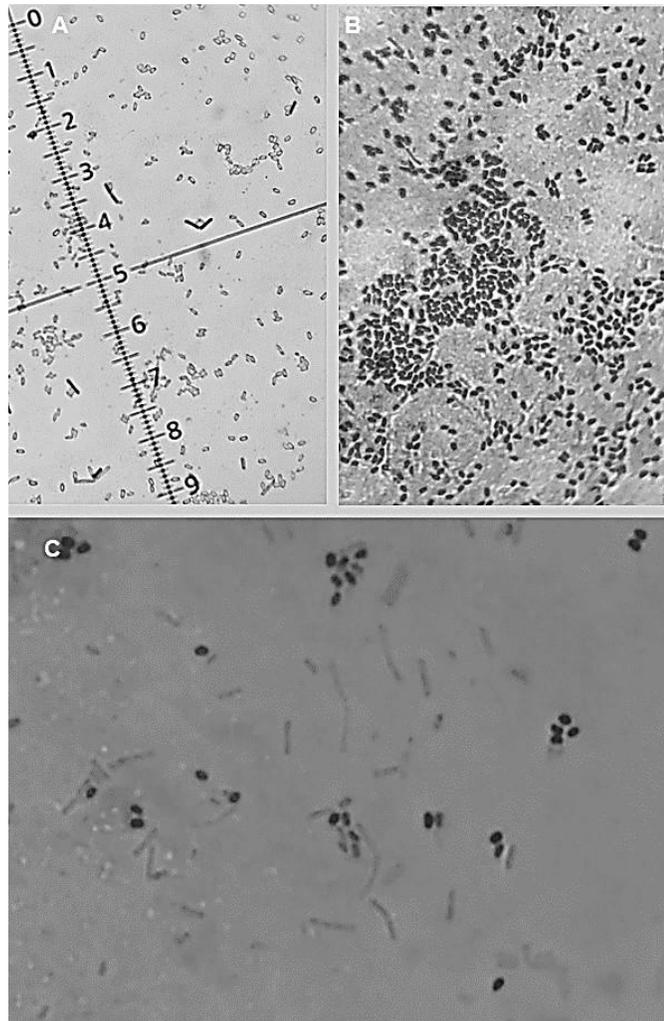
Figura No. 45 Prueba de catalasa cepas 6 y 9. *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* controles positivos.



Fuente: Autores (2022)

Las cepas 6 y 9 son bacilos Gram positivos endosporados de 3,8 μm de largo por 1 μm de ancho y 3,1 μm de largo por 0,8 μm de ancho respectivamente y endosporas de 2 μm de largo por 1 μm de ancho para ambas cepas (Figura 45).

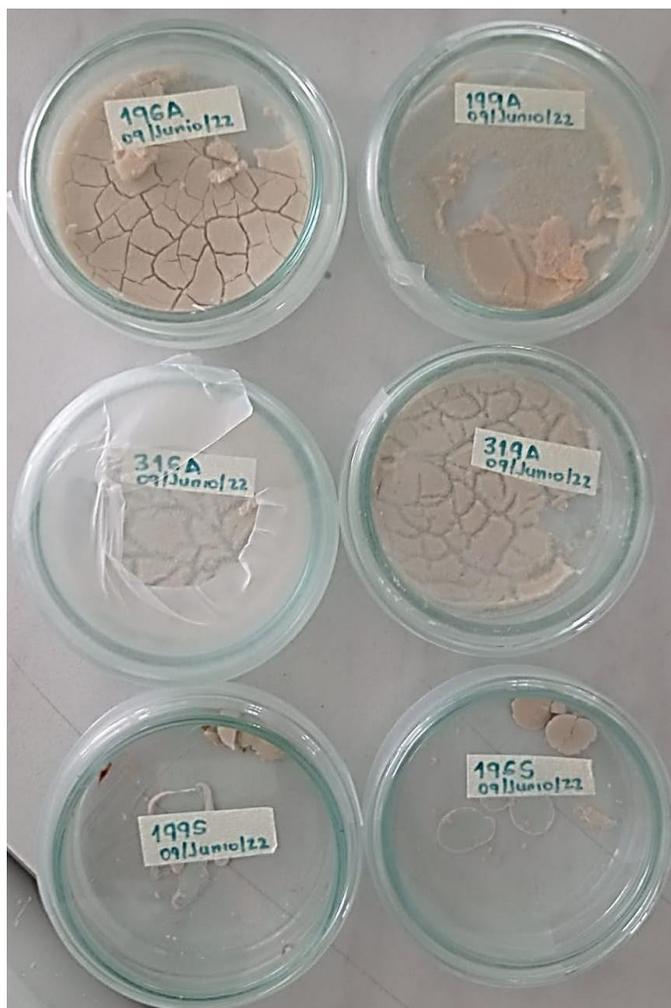
Figura No. 46 Células vegetativas y esporas de la cepa 6 (A) y 9 (B) y tinción de esporas con Verde de Malaquita (C).



Fuente: Autores (2022)

Las cepas 6 y 9 fueron liofilizadas para realizar las pruebas de FTIR-ATR (Figura 44). Las cepas 196A y 199A fueron incubadas por 22 días y depositadas en agua destilada estéril previa liofilización. Las cepas 196S y 199S fueron incubadas por 22 días y tratadas en seco previa liofilización. Las cepas 316A y 319A fueron incubadas por 10 días y depositadas en agua destilada estéril previa liofilización.

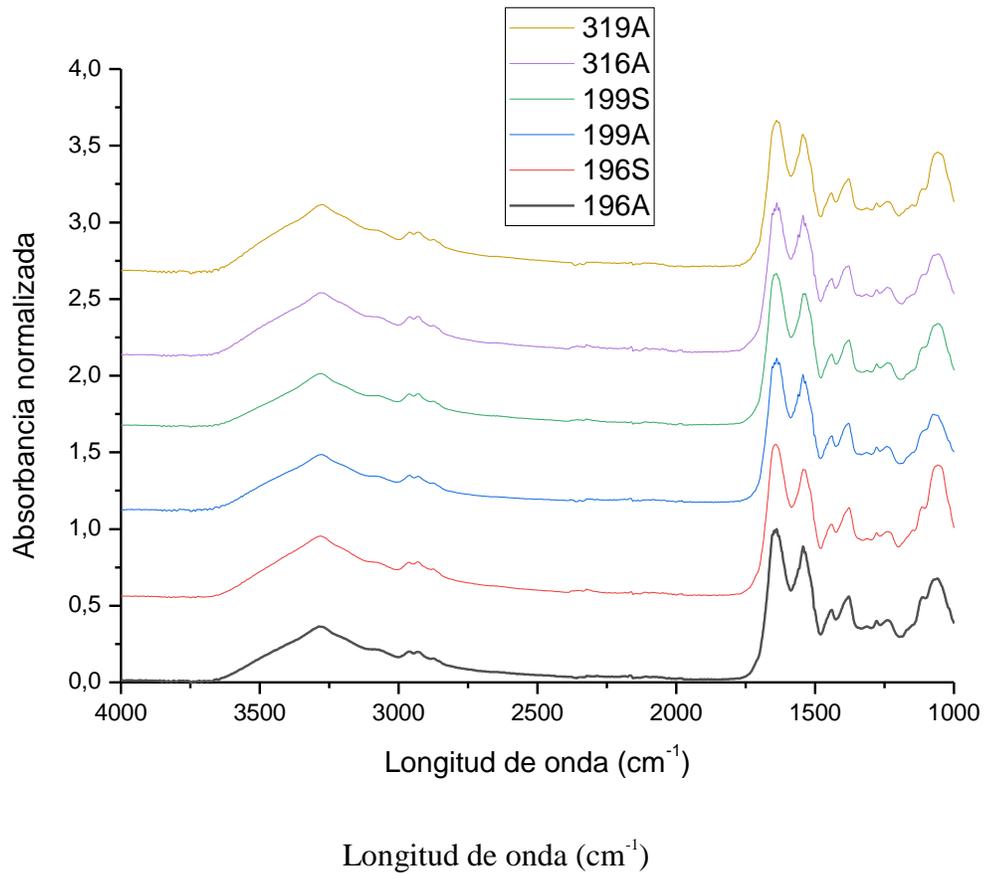
Figura No. 47 Cepas 6 y 9 liofilizadas.



Fuente: Autores (2022)

El procesamiento de los datos obtenidos permitió generar una serie de espectros de absorbancia infrarroja (IR) característicos del género *Bacillus* (Figura 47).

Figura No. 48. Espectro FTIR de las cepas 6 y 9 aisladas de suelos de cultivos de durazno.

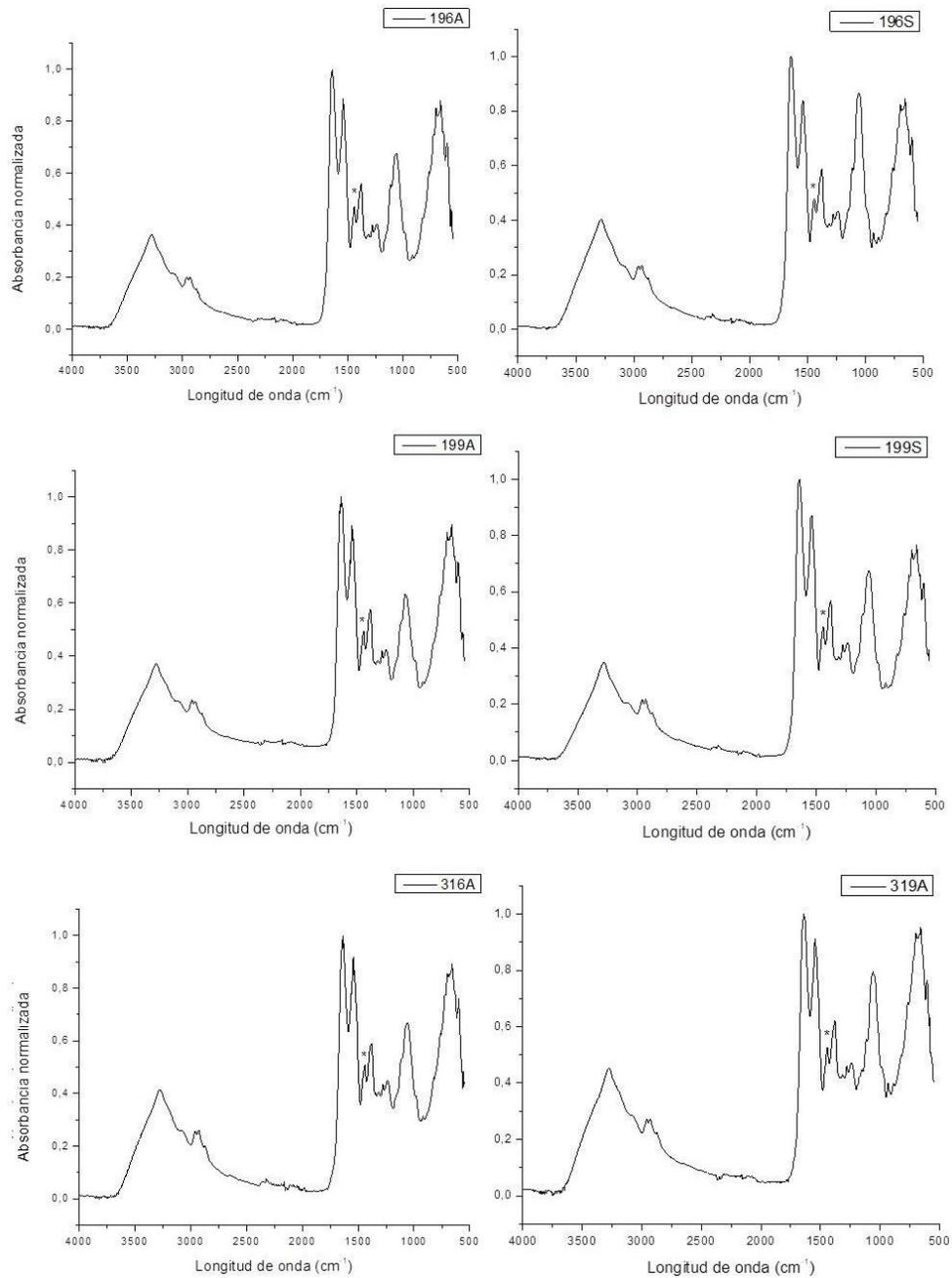


Fuente: Autores (2022)

De igual forma se realizó el espectro para detectar la presencia del ácido dipicolínico (Hindle & Hall. 1999), compuesto químico presente en las endosporas, características del género *Bacillus* y que le confiere resistencia al calor (Figura 48).

Figura No. 49. Espectro FTIR del ácido dipicolínico encontrado en las cepas 6 y 9

y característico del género *Bacillus* spp

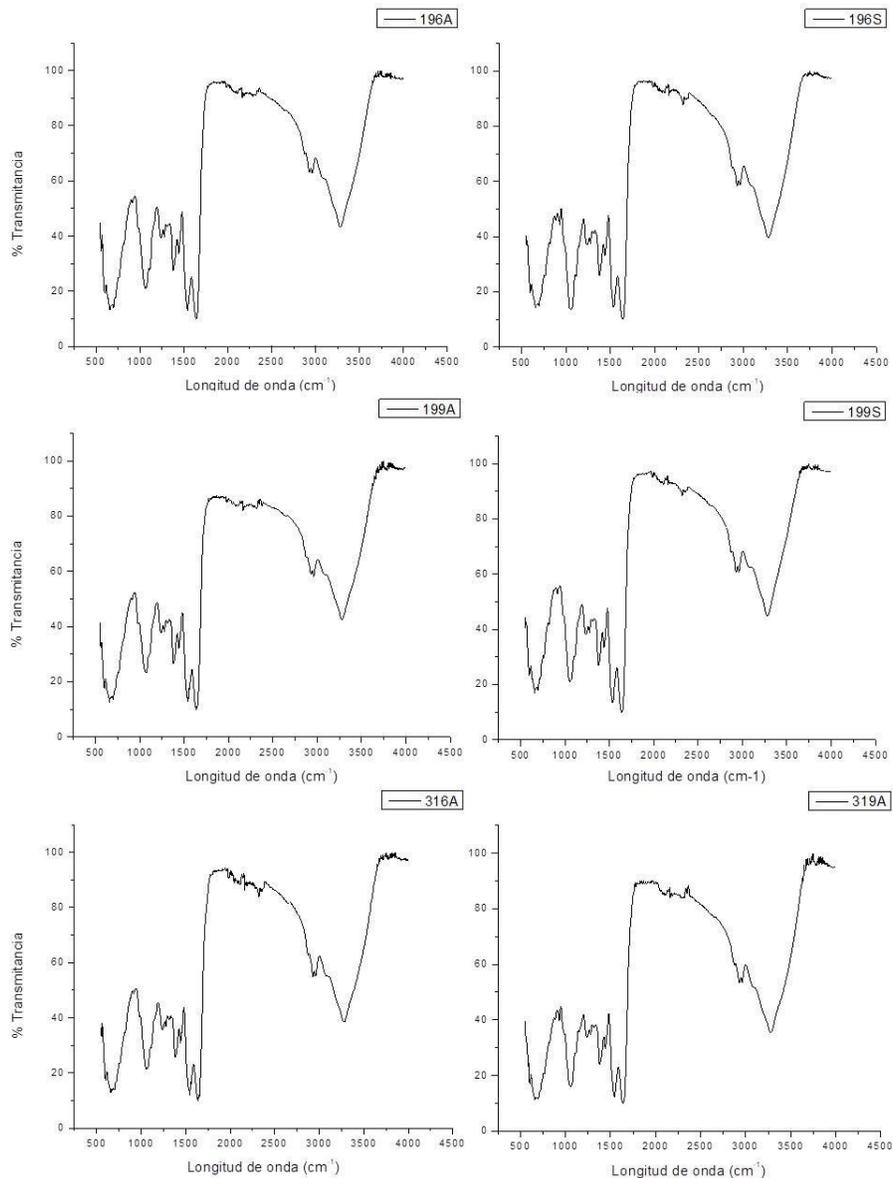


Fuente: Autores (2022)

De igual forma se evaluó la presencia de iturina A, un metabolito secundario del tipo

lipopéptido cíclico no ribosomal de las bacterias con actividad antifúngica (Calvo et al., 2019), principal responsable de la actividad antibiótica del género *Bacillus* sobre fitopatógenos fúngicos como *Monilinia* spp. (Figura 49).

Figura No. 50. Espectro FTIR de la Iturina A en las cepas 6 y 9 aisladas de suelos de cultivos de durazno durazno.



Fuente: Autores (2022)

Por su parte se procedió a caracterizar molecularmente las cepas 6 y 9 encontrándose lo

siguiente:

El clasificador de RDP (Ribosomal Data Project) determinó que se trata de secuencias de un microorganismo perteneciente al género *Bacillus*, sin embargo, el poder de resolución de este clasificador no permite asignar una especie (Figura 50). Solo se muestra una figura ya que son iguales.

Figura No. 51. Resultado de la comparación de la secuencia problema contra la base de datos RDP.

Classifier :: Hierarchy View

Classifier: RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.11, September 2015
Taxonomical Hierarchy: RDP 16S rRNA training setNo 18 07/2020
Query File: classifier_seq_upload5510698043846039472.FASTA
Query Submit Date:

Display depth: Confidence threshold: CopyNumber Adjusted:

domain	%	Library
Bacteria	100.0	

Hierarchy View (click a node to make it the root -- only show sequences assigned to that node with confidence above the threshold):

rootrank Root (1 sequences) [show assignment detail for Root only] [download entire hierarchy as text file](#)
» » domain Bacteria (1)
» » » phylum Firmicutes (1)
» » » » class Bacilli (1)
» » » » » order Bacillales (1)
» » » » » » family Bacillaceae 1 (1)
» » » » » » » genus Bacillus (1)

Fuente: Autores (2022)

La comparación con la base de datos de secuencias de 16S de RDP, utilizando la herramienta *SeqMatch* (Figuras 51 A y B) contra aislamientos cultivados, indica que las secuencias problema ensambladas presentan una mayor homología con secuencias del género *Bacillus* sp.

Figura No. 52 Resultado de la comparación de la secuencia problema contra

SeqMatch-RDP.

A

SeqMatch :: Result

Seqmatch: version 3
 RDP Data: release11_6
 Data Set: both type and non-type strains, isolates, near-full-length sequences (≥1200 bases), good quality sequences
 Comments: 307934 sequences were included in the search
 The screening was based on 7-base oligomers

Query Submit Date:

Match hit format: short ID, orientation, **similarity score**, **S_ab score**, unique common oligomers and sequence full name. More help is available.

Lineage:

Results for Query Sequence: seqmatch_seq, 1360 unique oligos

```

rootrank Root (20) (match sequences)
domain Bacteria (20)
  phylum Firmicutes (20)
    class Bacilli (20)
      order Bacillales (20)
        family Bacillaceae 1 (20)
          genus Bacillus (20)
            S000382403 not_calculated 0.994 1424 Bacillus sp.; TKSP21; AB017591
            S000692054 not_calculated 0.994 1419 Bacillus subtilis; B-F501; DQ520955
            S000968977 not_calculated 0.994 1426 Bacillus subtilis; C8-4; EU257436
            S001155214 not_calculated 0.994 1420 Bacillus amyloliquefaciens; CTSP3; EU855186
            S001155222 not_calculated 0.994 1420 Bacillus amyloliquefaciens; CTSP12; EU855194
            S002305573 not_calculated 0.994 1440 Bacillus amyloliquefaciens; H102; HQ407277
            S002446589 not_calculated 0.994 1437 Bacillus sp.; 3639ABRRJ; JF309257
            S002961930 not_calculated 0.995 1392 Bacillus sp.; AEP20; JN817496
            S002961931 not_calculated 0.995 1391 Bacillus sp.; AEP21; JN817497
            S003277643 not_calculated 0.994 1420 Bacillus sp.; LS05; GU972599
            S003277821 not_calculated 0.994 1399 Bacillus amyloliquefaciens; OV12; HE681733
            S003286915 not_calculated 0.994 1419 Bacillus subtilis; M16K; AB735993
            S003298836 not_calculated 0.994 1423 Bacillus amyloliquefaciens; WY13; JQ936683
            S003719194 not_calculated 0.994 1448 Bacillus subtilis; KBDL40; KC542358
            S003722729 not_calculated 0.994 1444 Bacillus methylotrophicus UCMB5036; HF563562
            S003722731 not_calculated 0.994 1444 Bacillus methylotrophicus UCMB5036; HF563562
            S004083205 not_calculated 0.998 1437 Bacillus sp.; S122907; KF956703
            S004217284 not_calculated 0.996 1424 Bacillus sp.; LS-508; KJ601743
            S004226489 not_calculated 0.995 1431 Bacillus methylotrophicus; IHB B 7249; KJ767354
            S004226496 not_calculated 0.995 1431 Bacillus methylotrophicus; IHB B 7294; KJ767361
  
```

B.

SeqMatch :: Result

Seqmatch: version 3
 RDP Data: release11_6
 Data Set: both type and non-type strains, isolates, near-full-length sequences (≥1200 bases), good quality sequences
 Comments: 307934 sequences were included in the search
 The screening was based on 7-base oligomers

Query Submit Date:

Match hit format: short ID, orientation, **similarity score**, **S_ab score**, unique common oligomers and sequence full name. More help is available.

Lineage:

Results for Query Sequence: seqmatch_seq, 1366 unique oligos

```

rootrank Root (20) (match sequences)
domain Bacteria (20)
  phylum Firmicutes (20)
    class Bacilli (20)
      order Bacillales (20)
        family Bacillaceae 1 (20)
          genus Bacillus (20)
            S002440703 not_calculated 0.992 1165 Bacillus amyloliquefaciens; Tikusei-12-1; AB610827
            S002440705 not_calculated 0.992 1169 Bacillus amyloliquefaciens; Mito-5-13; AB610829
            S002911092 not_calculated 0.995 1202 Bacillus subtilis; B512; JF318966
            S002961101 not_calculated 0.992 1326 Bacillus methylotrophicus; R14; JN700099
            S002961102 not_calculated 0.992 1325 Bacillus methylotrophicus; R17; JN700100
            S002964442 not_calculated 0.992 1304 Bacillus amyloliquefaciens; NSII-11; JN993722
            S003298205 not_calculated 0.992 1289 Bacillus sp. 08C; JQ838063
            S003298206 not_calculated 0.993 1307 Bacillus sp. 15S; JQ838064
            S003301572 not_calculated 0.993 1242 Bacillus sp.; AP77; JX094293
            S004077212 not_calculated 0.993 1313 Bacillus sp.; 72BK7Y10; KC815822
            S004077228 not_calculated 0.995 1304 Bacillus sp.; 123B121Y11; KC815838
            S004229317 not_calculated 0.995 1193 Bacillus sp.; F311; KJ948350
            S004491767 not_calculated 0.995 1194 Bacillus methylotrophicus; MT3; KT036458
            S004497236 not_calculated 0.992 1327 Bacillus amyloliquefaciens; CanS-5; KT580587
            S004497293 not_calculated 0.992 1327 Bacillus amyloliquefaciens; CanR-5; KT580644
            S004497305 not_calculated 0.992 1327 Bacillus amyloliquefaciens; CanR-53; KT580660
            S004497309 not_calculated 0.992 1327 Bacillus methylotrophicus; CanR-63; KT580660
            S004504948 not_calculated 0.995 1280 Bacillus methylotrophicus; K39.1; KJ882888
            S004504952 not_calculated 0.995 1280 Bacillus methylotrophicus; 11P4; KJ882892
            S004504954 not_calculated 0.995 1280 Bacillus methylotrophicus; K51.3; KJ882894
  
```

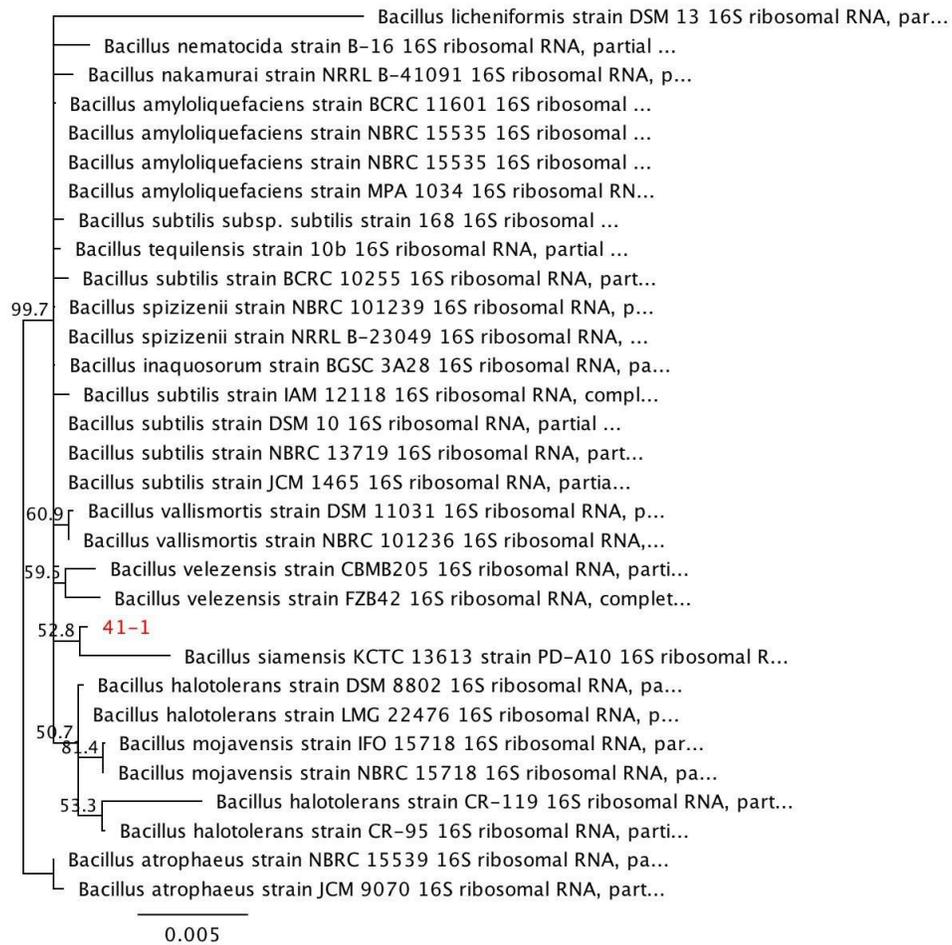
Fuente: Autores (2022)

Los resultados del análisis taxonómico de las secuencias problema ensambladas de 1479 pb y 1467 pb, contra la base de datos ref_seq del NCBI, indican que tienen, en promedio, un 99% de identidad en el 99% de su longitud, con secuencias del genribosomal 16S pertenecientes a la especie *Bacillus velezensis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus subtilis*.

El árbol de distancias (Figuras 52 y 53) construido, para cada aislamiento, a partir de las treinta secuencias de microorganismos cultivables más cercanas disponibles en la base de datos de NCBI RefSeq_RNA, muestran que las secuencias analizadas se agrupan con secuencias del género *Bacillus* sp.

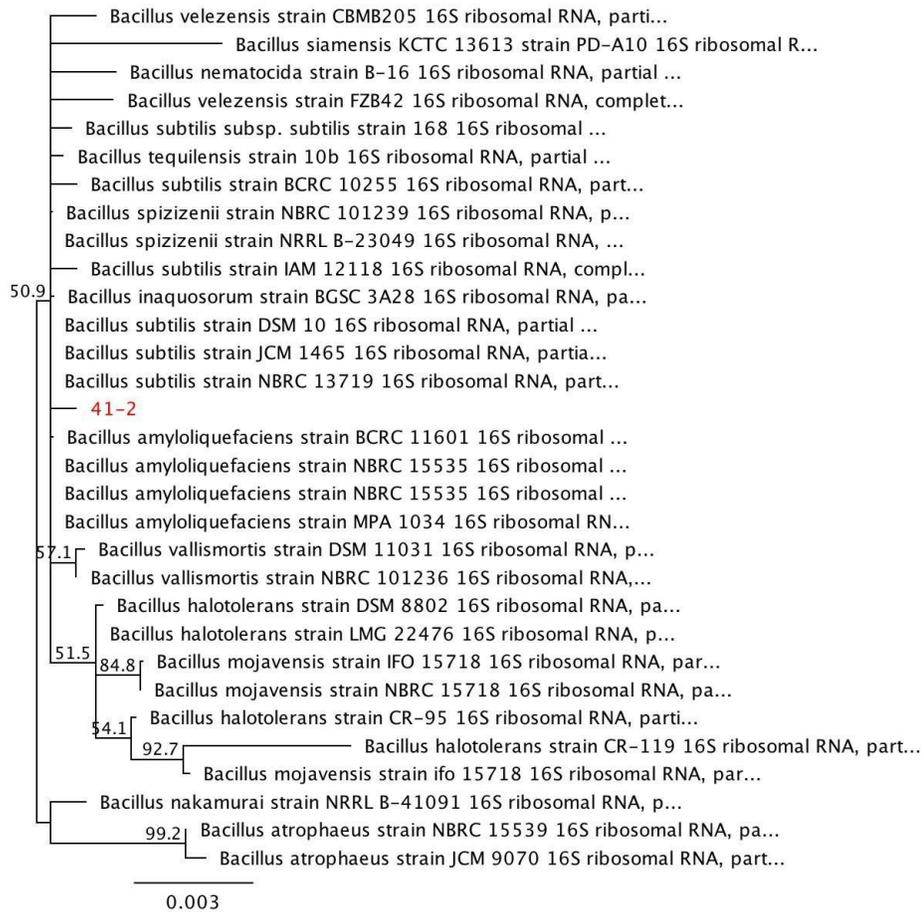
Dados los resultados encontrados en las diferentes bases de datos, se puede concluir que las muestras pertenecen al **grupo *Bacillus subtilis***. El grupo cuenta con once especies que están relacionadas muy de cerca a nivel genético y/o bioquímico. Para poder distinguir entre ellas es necesario llevar a cabo otro tipo de ensayos moleculares como MLST (*Multilocus Sequence Typing*), AAI (*Average Amino Acid Identity*) o Superárboles.

Figura No. 53 Árbol filogenético de la cepa 6.



Fuente: Autores (2022)

Figura No. 54 Árbol filogenético de la cepa 9.



Fuente: Autores (2022)

Finalmente se realizó la caracterización de la cepa de *Monilinia* sp. (PCPr2), la cual demostró una gran capacidad de patogenicidad en los ensayos *in vitro* e *in vivo*.

La caracterización morfológica arrojó lo siguiente:

Figura No. 55 Morfología en caja de la cepa de *Monilinia* sp (PCPr2).



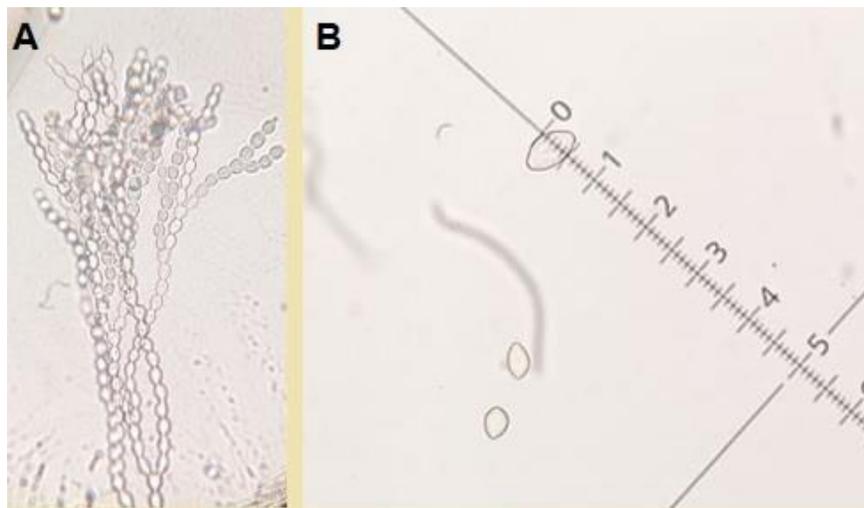
Fuente: Autores (2022)

Su diámetro de crecimiento en agar PDA recién aislado de duraznos enfermos fue en promedio de 3,48 cm cada 7 días y en PDA + ácido láctico al 25% de 2,34 cm en el mismo tiempo. Luego de realizados los cultivos monospóricos, los sucesivos repiques, el re aislamiento de duraznos para recuperar la patogenicidad y de la descontaminación producto del descuido de las cepas durante la emergencia sanitaria por COVID 19, presentaron una disminución del promedio de crecimiento a 2,47 cm en 7 días en PDA sin ácido láctico al 25% y 1,51 con ácido, de márgenes lobulados, color Hazel -Isabelino (amarillo- blanco - marron — gris), presencia de anillos de crecimiento concéntrico, esporulación inicial abundante de color gris, colonias elevadas, morfología sugerente de *Monilinia fruticola* (Figura 54).

La descripción microscópica permitió evidenciar lo siguiente:

Los conidióforos (Figura 55 A) poseen hifas primarias con ramificaciones antes del primer septo, formadas en cadenas y de tamaño entre 8,13 y 13,8 μm . Los conidios (Figura 53 B) son alimonados de 6 μm de largo x 4 μm de ancho en promedio (Torreset al., 2019).

Figura No. 56 A.B. Morfología microscópica de *Monilinia* sp. (PCPr2). A. Conidióforos 40X. B. Conidios 40X.



Fuente: Autores (2022)

Por su parte se procedió a caracterizar molecularmente la cepa PSPr2 de *Monilinia* sp. encontrándose lo siguiente:

Los resultados del análisis taxonómico de esta secuencia de 543 pb contra la base de datos nr/nt del NCBI, indican que la secuencia problema resultante del ensamblaje muestra un 99% de identidad en el 100% de su longitud con secuencias de la especie *Monilinia fructicola*. Este mismo análisis fue realizado contra la base de datos UNITE (<http://unite.ut.ee/>), el cual mostró que la mayor similitud de la secuencia estudiada está con la especie *Monilinia fructicola* (Figura 56).

La herramienta “*Classifier*”, perteneciente al sitio Web de RDP, al comparar con la base de datos “*Warcup Fungal ITS trainset 2*”, especializada en secuencias de hongos, indica que la

secuencia problema tienen mayor similitud con el género *Botryotinia* sp. (Figura 57).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de las bases de datos, el aislamiento se puede clasificar como perteneciente a la especie *Monilinia fruticola*.

Figura No. 57. Resultado de la comparación de la secuencia problema contra la base de datos UNITE.

```
# BLASTN 2.11.0+
# Database: /opt/analyses/BLAST/data/unite_all
# Mode: ultra condensed output

Query - The name of the query (input) sequence
Reference - The name of the reference sequence
Score - The BLAST score
E-value - The BLAST E-value
Prcnt - Percent identity over the BLAST alignment
MisM - The number of mismatches over the BLAST alignment
Qstart - The position in the query sequence where the BLAST alignment starts
Qend - The position in the query sequence where the BLAST alignment ends
Rstart - The position in the reference sequence where the BLAST alignment starts
Rend - The position in the reference sequence where the BLAST alignment ends

Query 1 of 1: query
Reference
MHB60465 SH1518606.08FU Monilinia fruticola 966 0.0 98.895 0002 1 543 548 10
MN049476 SH1518606.08FU Monilinia fruticola 961 0.0 99.620 0000 1 527 545 21
MHB64497 SH1518606.08FU Monilinia fruticola 961 0.0 99.620 0000 1 527 666 142
MHB55692 SH1518606.08FU Monilinia fruticola 961 0.0 99.620 0000 1 527 530 6
MHB54789 SH1518606.08FU Monilinia fruticola 961 0.0 99.620 0000 1 527 531 7
ME91580 SH1570090.08FU Monilinia fruticola 961 0.0 99.620 0000 1 527 546 22
KER00261 SH1570090.08FU Monilinia fruticola 961 0.0 99.620 0000 1 527 732 208
FJ515894 SH1570090.08FU Monilinia fruticola 961 0.0 99.620 0000 1 527 546 22
EF207419 SH1570090.08FU Monilinia fruticola 961 0.0 99.620 0000 1 527 546 22
MHB54846 SH1518606.08FU Monilinia fruticola 955 0.0 99.432 0000 1 527 531 6
KM279616 SH1570090.08FU Monilinia fruticola 955 0.0 99.618 0000 1 524 522 1
KM652457 SH1570090.08FU Monilinia fruticola 953 0.0 99.431 0000 1 527 545 22
FJ411109 SH1570090.08FU Monilinia fruticola 953 0.0 99.618 0000 1 523 521 1
MHB29422 SH1570090.08FU Monilinia fruticola 952 0.0 99.617 0000 1 522 520 1
LT615169 SH1570090.08FU Monilinia fruticola 950 0.0 99.429 0000 1 525 522 1
MKS56181 SH1518606.08FU Monilinia fruticola 946 0.0 99.615 0000 1 519 517 1
LT615175 SH1570090.08FU Monilinia fruticola 946 0.0 99.240 0000 1 525 523 1
FJ411110 SH1570090.08FU Monilinia fruticola 946 0.0 99.426 0000 1 523 520 1
```

Fuente: Autores (2022)

Figura No. 58. Resultado de la comparación de la secuencia problema contra la base de datos Warcup fungal RDP

Classifier :: Hierarchy View

Classifier: RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.11, September 2015
 Taxonomical Hierarchy: Warcup Fungal ITS trainset 2
 Query File: classifier_seq_upload2336267341624108376.FASTA
 Query Submit Date:

Display depth: Confidence threshold:

domain	%	Library
Fungi	100.0	

Hierarchy View (click a node to make it the root -- only show sequences assigned to that node with confidence above the threshold):

```
norank Root (1 sequences) [show assignment detail for Root only] download entire hierarchy as text file
* * domain Fungi (1)
* * * phylum Ascomycota (1)
* * * * subphylum Pezizomycotina (1)
* * * * * class Leotiomyces (1)
* * * * * * subclass Leotiomycetidae (1)
* * * * * * * order Helotiales (1)
* * * * * * * * family Sclerotiniaceae (1)
* * * * * * * * * genus Botryotinia (1)
* * * * * * * * * * unclassified_Botryotinia (1)
```

Fuente: Autores (2022)

DISCUSIÓN

La literatura y el resultado de proyectos como la Ruta del Durazno y del Agua, 2022 permitieron establecer que Chitagá, Cácosta y Pamplonita son los grandes productores de durazno del departamento Norte de Santander. Dentro de Chitagá las veredas Tapurcuá, Llano grande y Carrillo son las principales productoras de durazno (*Prunus persica*), en Cácosta la vereda Icota y en Pamplonita la vereda Batagá destinan gran parte de su territorio a estos cultivos.

Es importante resaltar que la topografía y la susceptibilidad a la erosión de los terrenos donde se cultiva durazno en la región hace que los productores dispongan sus cultivos en las riberas de los ríos y las mesetas de las montañas para sembrar. Allí se referencia que los suelos del área de siembra poseen pendientes superiores al 50% y que su capa arable es muy delgada, son suelos de poca profundidad, no muy fértiles, ácidos, con poca materia orgánica y tendencia a la erosión. Por tal motivo los cultivadores deben realizar fertilizaciones químicas y orgánicas frecuentes, alterando las características originales de los suelos (Salinas-García et al., 2005).

En ese orden de ideas, los suelos que pierden su capacidad de autodepuración y de albergar organismos que incentiven la fertilidad del mismo suelo, son áreas que no aportan a la calidad y rendimiento de los cultivos que allí se establecen. Las fertilizaciones químicas unidas al uso de pesticidas para el control de plagas, ha convertido muchas áreas en tierras infértiles producto de desequilibrios ecológicos. Es importante recalcar que la presencia de microorganismos en los suelos es indicativo de fertilidad y sustentabilidad ecológica y que éstos potencian el desarrollo de las plantas, pero que el uso de fertilizantes y pesticidas de síntesis química en los cultivos han disminuido su diversidad y alterado sus funciones (Montoya Muñoz et al., 2022).

Los resultados obtenidos como respuesta al primer objetivo específico permitieron

establecer metodologías para el aislamiento de antagonistas de suelos de las fincas productoras así como de los patógenos que afectan los cultivos. Éste diseño metodológico permitió aislar cepas con potencial antagónico de los mismos suelos (nativas) cultivados para no alterar el equilibrio ecológico de las áreas si se llegaran a usar como biocontroladores y así preservar sus servicios ecosistémicos (Pedraza et al., 2010)

Cabe resaltar que del total de las 9 fincas visitadas en el proyecto, 2 de ellas (El Veranito e Igota Quintero Predio 1) para la fecha de toma de muestras se encontraban certificadas por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) como fincas con Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) mediante la resolución 4174 del 06 de noviembre de 2009 por medio de la cual se reglamenta la certificación de Buenas Prácticas Agrícolas en la producción primaria de frutas y vegetales para consumo en fresco, esta resolución en su artículo 5 establece una serie de compromisos que deben cumplir los productores en sus predios para lograr la certificación dentro de los que se incluyen componentes como el manejo de suelos que contiene rotación de cultivos, labranza mínima y manejo de curvas a nivel para siembras en ladera. El material de siembra debe ser certificado por el ICA, trazabilidad de las prácticas de nutrición vegetal y registro ante el ICA de los agro insumos utilizados. Finalmente la protección del cultivo debe realizarse a través de un plan de Manejo Integrado de Plagas priorizando el uso de métodos culturales, biológicos, físicos y etológicos sobre el control químico (ICA, 2009). Lo anterior es un dato relevante máxime cuando de los suelos de éstas fincas se aislaron cepas nativas de biocontroladores.

Las metodologías establecidas para el aislamiento de potenciales antagonistas incluyeron la estandarización de medios de cultivo modificados con suelos de la misma área, esto con el objetivo de simular las condiciones naturales donde se encuentran los microorganismos satisfaciendo al máximo sus necesidades nutricionales (Nápoles et al., 2006). Un medio de

cultivo adecuado para el aislamiento de los agentes controladores biológicos debe considerar que las siembras de las concentraciones sean idóneas para el caso de diluciones o siembras directas, que se considere el tiempo de crecimiento del microorganismo, que tenga algún tipo de antibiótico o fungicida como es el caso del ácido láctico para realizar una primera selección y realizar un aislamiento eficiente y medios con pH o sustratos que lo hagan selectivo para los requerimientos del microorganismo diana. Bajo todas éstas premisas se constituyeron los medios de cultivo elaborados en el presente estudio (Cotes et al., 2018).

Esta estandarización permitió pre seleccionar microorganismos con potencial comprobado de actividad antifúngica, tal es el caso del género *Bacillus*, ampliamente reconocido por su capacidad para producir antibióticos (Ruiz-Sánchez et al., 2014).

Las 23 cepas del género aisladas evidencian la correcta estandarización de los medios de cultivo modificados, teniendo en cuenta que el suelo es una matriz donde se encuentra gran cantidad (1×10^9 células/gramo de suelo) y diversidad (1×10^4 especies/gramo de suelo) de diferentes microorganismos (Villarreal-Delgado et al., 2018).

Las descripciones morfológicas y pruebas bioquímicas de las 23 cepas permitieron inicialmente diferenciar morfoespecies y posteriormente seleccionar 9 por presentar características representativas de antagonistas reconocidos (Cotes et al., 2018) que en el caso del género *Bacillus* comprenden la capacidad de producir endosporas, de utilizar ciertos sustratos dentro de su metabolismo y por supuesto varias características morfológicas.

Un paso importante luego de aislados es el método de conservación, el cual debe asegurar la viabilidad del microorganismo por largos periodos de tiempo y garantizar su estabilidad genética y fisiológica, es por ello que se optó por la crioconservación

en tubo y en papel filtro de los organismos antagonistas y patógenos aislados, pues aseguran inactividad metabólica o latencia (Cotes et al., 2018).

A pesar de tener protocolos estandarizados para la conservación de antagonistas y patógenos como se evidenció en los resultados, el no contar con todos los requerimientos (Pullés et al., 2006) dentro de las áreas de trabajo para mantener las condiciones óptimas (temperatura constante, acceso a revisión de las cepas, disponibilidad de medios de cultivo para repiques, agua de óptima calidad, espacios físicos en condiciones óptimas de asepsia, entre otros), condujo a la pérdida de gran parte del material aislado y por ende de tiempo y dinero por lo que es indispensable solventar estos inconvenientes para futuros trabajos.

En lo referente al segundo objetivo específico, se evidenció que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las metodologías seleccionadas para los ensayos *in vitro* de control biológico. Teniendo en cuenta que los ensayos de control biológico deben contar con una serie de factores para que sus resultados sean verídicos dentro de los que se incluye el control de la contaminación, la fácil reproducibilidad, el costo (Orozco et al., 2022). Si se desea evaluar mediante los ensayos la eficacia de algún microorganismo en su actividad como fungicida, se deben poder evaluar dos factores principalmente, la incidencia y la severidad, éstos pueden ser expresadas en porcentaje por lo que las metodologías aquí seleccionadas cumplieron a cabalidad con los criterios necesarios para realizar una selección confiable científicamente hablando de antagonistas (ICA, 2015). Estos resultados están bien soportados por los análisis estadísticos.

El porcentaje de inhibición de las cepas 6 y 9 es del 88,2% y 100% respectivamente, esto evidencia microorganismos con efectividad muy superior en el control de patógenos y las cepas 2 y 5 con muy buenas capacidades de biocontrol, lo anterior debido a que se consideran altamente efectivos aquellos microorganismos del género *Bacillus* con capacidad inhibitoria superior al

50% (Gajbhiye et al., 2010). La escala de Bell para evaluar la competencia por sustrato *in vitro* clasifica a las cepas 6 y 9 como “*muy buenas*” ya que en los ensayos de crecimiento dual, el antagonista ocupa totalmente la superficie del medio de cultivo cubriendo totalmente al patógeno y clasifica a las cepas 2 y 5 como buenas pues el antagonista llega a sobrepasar las 2 terceras partes del medio de cultivo (Ñacato & Vlencia, 2016).

En lo referente a los ensayos *in vivo* los diferentes tiempos no afectaron la capacidad antagonista significativamente mientras que la comparación entre las cepas 6 y 9 sí evidenció diferencias significativas en el crecimiento del hongo fitopatógeno.

Sin embargo es importante resaltar que durante los primeros días del cultivo dual, las bacterias del género *Bacillus* ejercen un efecto antibiótico notable sobre el fitopatógeno, esto debido a su crecimiento exponencial, lo que les permite alcanzar rápidamente el estado estacionario y producir metabolitos secundarios de defensa y de esta manera colonizar el medio de cultivo. Transcurrido ese tiempo los hongos iniciarían su producción de metabolitos que contrarresten el efecto producido por las bacterias antagonistas y/o los metabolitos bacterianos lo que redundaría en disminución de la efectividad del antagonista (Tejera et al., 2012).

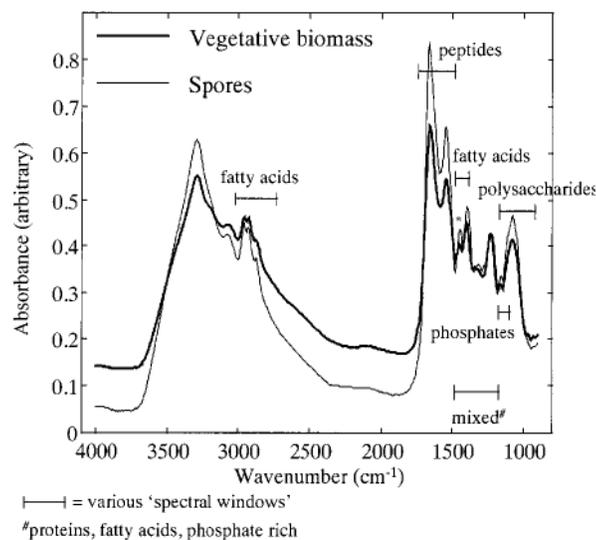
En lo referente al tercer objetivo específico la descripción morfológica, microscópica, bioquímica, mediante FTIR-ATR y RNA 16s permitió evidenciar claras diferencias entre las cepas 6 y 9 y controladores ampliamente descritos como es el caso de *Bacillus subtilis*.

Morfológicamente las colonias de *Bacillus subtilis* son más pequeñas (2 a 4 mm de diámetro) y de formas redondas y consistencia cremosa mientras que las de las cepas 6 y 9 son medianas (8 mm), irregulares y mucoides. Microscópicamente los bacilos de este estudio se encuentran en el promedio de lo registrado para *B. subtilis* (3,8 μ m y 3,1 μ m). Las esporas de las cepas 6 y 9 son alimonadas mientras que las de *B. subtilis* son redondas. En este sentido *B.*

subtilis comparte con las cepas aquí aisladas el ser endosporado, Gram Positivo, aerobio, su capacidad de hemolizar la sangre e hidrolizar la gelatina, de igual manera la producción de acetoina y la capacidad de reducir nitratos, pero existen diferencias ampliamente marcadas pues las bacterias 6 y 9 no sintetizan catalasas, no oxidan ni fermentan la rabinosa y xilosa, no hidrolizan el almidón, no utilizan el citrato, entre otros, lo que las distancia bioquímicamente (Cuervo Lozada, 2010).

Los espectros de FTIR –ATR permitieron encontrar el del ácido dipicolínico en las cepas 6 y 9, componente característico de las endosporas del género *Bacillus* spp., en estos espectros se evidencian vibraciones del anillo de piridina entre 1470 y 1435 cm^{-1} más altas que las evidenciadas por *B. subtilis* (Figura 58). Cabe aclarar que los espectros generados por células vegetativas y esporas muestran ligeras variaciones, todo lo anterior puede constituirse en un biomarcador importante para la clasificación quimiométrica de las diferentes especies de *Bacillus* (Goodacre et al., 2000).

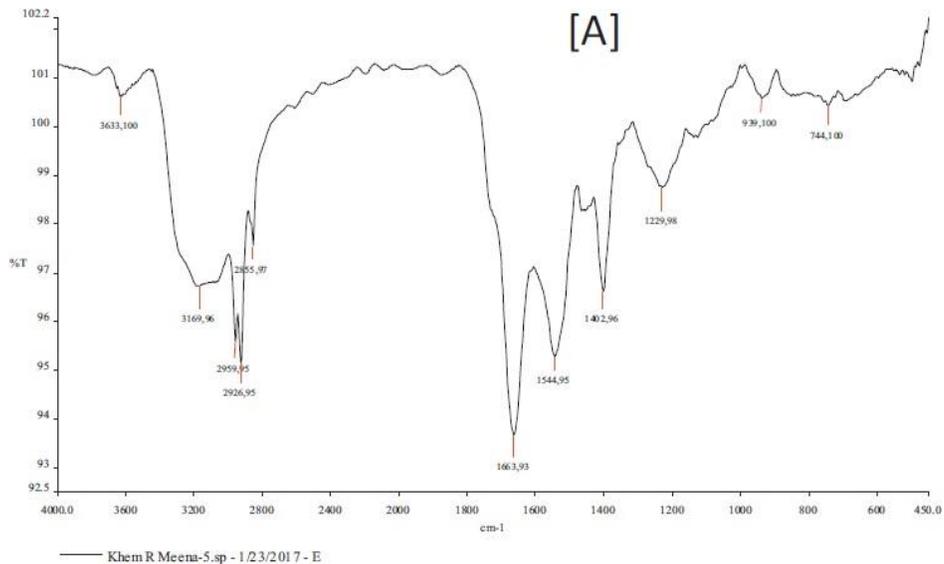
Figura No. 59. Espectro de ácido dipicolínico en *Bacillus subtilis*



Fuente: Goodacre et al., (2000)

En lo referente a los espectros de la Iturina A cabe mencionar que la capacidad antagónica de *B. subtilis* radica principalmente en su habilidad para sintetizar diferentes metabolitos con capacidad antibiótica, dentro del grupo de metabolitos antifúngicos se encuentran las surfactinas, fengicinas e iturinas y que éstas últimas poseen unos picos que indican la presencia de lipopéptidos, cadenas de ácidos alifáticos, cadenas de alquilo, anillos de lactona, entre otros, que por sus vibraciones evidencian claras diferencias entre las cepas del presente estudio y *B. subtilis* (Meena et al., 2020).

Figura No. 60. Espectro de la Iturina A en *Bacillus subtilis*



Fuente: Meena et al., (2020)

Finalmente, los resultados del análisis taxonómico de las secuencias problema ensambladas de 1479 pb y 1467 pb, contra la base de datos ref_seq del NCBI, indican que tienen, en promedio, un 99% de identidad en el 99% de su longitud, con secuencias del gen ribosomal 16S pertenecientes a la especie *Bacillus velezensis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus subtilis*, y se pudo concluir que las muestras pertenecen al grupo *Bacillus subtilis* filogenéticamente hablando, pero para determinar la especie exacta o si se trata de una nueva, se deben cotejar las características morfológicas, microscópicas, bioquímicas y de FTIR – ATR con

pruebas moleculares complementarias más específicas.

Cabe anotar que estas especies se constituyen ya en valiosos descubrimientos biotecnológicos para el departamento Norte de Santander y que estudios posteriores que validen su uso podrían optimizar la cadena productiva del durazno mediante el aprovechamiento de la biodiversidad nativa para las labores culturales del cultivo, demostrando que la Ciencia, la Tecnología y la Innovación pueden constituirse en eslabones de unión entre la academia, las empresas, el estado y las comunidades como ejemplo de una verdadera gobernanza del territorio.

CONCLUSIONES

- Se estandarizaron metodologías para el aislamiento de bacterias de suelos con potencial antagonico contra hongos fitopatógenos teniendo en cuenta la fácil reproducibilidad, los menores índices de contaminación y el aseguramiento de la calidad de los resultados. De igual manera se estandarizaron las metodologías para el aislamiento del hongo causante de la podredumbre morena de los frutales de hueso.

- Se aislaron 23 cepas nativas de bacterias con las características del género *Bacillus* spp. ampliamente referenciado como antagonista de fitopatógenos demostrando 2 de ellas porcentajes de inhibición del crecimiento del patógeno *Monilinia fruticola* por encima del 88% en pruebas *in vitro* e *in vivo* que las convierte en cepas de gran interés biotecnológico para la región.

- La caracterización morfológica, microscópica, bioquímica, espectroscópica y molecular de los bacilos aislados permitió clasificarlos dentro del grupo de *Bacillus subtilis* pero sus características morfológicas y moleculares no corresponden a ninguna especie conocida, por lo anterior deben realizarse pruebas adicionales para establecer si se trata de nuevas especies.

- El gran potencial de las cepas de antagonistas aisladas permite en futuros estudios utilizar la biodiversidad nativa como herramienta de optimización de las prácticas agrícolas para otorgarle valor agregado a la cadena productiva del durazno en el departamento a la par que se impacta positivamente en la competitividad y productividad de la región a través de la sinergia entre los diferentes actores del territorio en torno a la Ciencia, la Tecnología y la Innovación como mecanismo de gobernanza.

RECOMENDACIONES

Continuar las evaluaciones de las cepas antagonistas aisladas en este estudio con el objetivo de patentar un controlador biológico nativo del Norte de Santander que no introduzca microorganismos exógenos a los suelos de la región pues podrían alterar los equilibrios ecológicos de los ecosistemas.

Realizar las pruebas restantes para la determinación taxonómica de las cepas antagonistas con el objetivo de determinar si se trata de nuevas especies para la ciencia.

Escalar las evaluaciones in vivo a invernaderos en articulación con los cultivadores de durazno de la región para determinar el comportamiento de las cepas evaluadas en el presente estudio a esa escala.

Es importante que se realice un acompañamiento mayor a este tipo de proyectos de investigación en ciencias biológicas para garantizar espacios de trabajo en buenas condiciones, equipos, servicios como agua, luz y gas constantes, ingreso a las instalaciones, entre otros requerimientos que permitan asegurar la calidad de los resultados a la vez que disminuyan el desgaste físico, emocional y monetario de los investigadores.

Se socialicen los resultados a los entes gubernamentales para que desde la academia se apoye económicamente este tipo de proyectos con el fin de lograr la precisión requerida y avanzar la aplicación de estas tecnologías no solo en el durazno sino en otros cultivos líderes en la región.

BIBLIOGRAFÍA

Alcaraz LD, Moreno-Hagelsieb G, Eguiarte LE, Souza V, Herrera-Estrella L and Olmedo G. 2010. Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics. BMC Genomics. 11:332. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-11-332>

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402.

APIWEB™, 2022. Tomado de: <https://www.biomerieux.es/diagnostico-clinico/productos/apiwebtm> consultado julio 2022

Ariza, Y., Y Sánchez, L. 2012. Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. Nova, 10(18), 149-155.

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of pharmaceutical analysis, 6(2), 71-79.

Baños Guevara, P. E., Zavaleta Mejía, E., Colinas León, M. T., Luna Romero, I., & Gutiérrez Alonso, J. G. 2004. Control biológico de *Colletotrichum gloeosporioides* [(Penz.) Penz. y Sacc.] en papaya maradol roja (*Carica papaya* L.) y fisiología postcosecha de frutos infectados. Revista mexicana de fitopatología, 22(2).

Bashan, Y., Holguin, G., Y Ferrera Cerrato, R. 1996. Interactions between plants and beneficial microorganisms II. Associative rhizosphere bacteria. *Terra (Mexico)*.

Bassi, D. y R. Monet. 2008. Botany and taxonomy. pp. 1-36. En: Layne, D.R. y D. Bassi (eds.). The peach: botany, production and uses. CABI, Wallingford, UK.

Baker, K. F. 1987. Evolving concepts of biological control of plant pathogens. Annual Review of Phytopathology, 25, 67-85. doi:10.1146/annurev.py.25.090187.000435.

Becerra, P., y Patricia, D. (2010). La globalización y el crecimiento empresarial a través de estrategias de internacionalización. Pensamiento & gestión, (28), 171-195.

Bruker. Guía de espectroscopía infrarroja.

En:<https://www.bruker.com/es/about.html> consultado julio 2022.

Calvo, H., Mendiara, I., Arias, E., Blanco, D., Y Venturini, M. E. 2019. The role of iturin A from *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 in the inhibition of the most common postharvest fruit rots. Food microbiology, 82, 62-69.

Campos, T. 2013. Especies y variedades de hoja caduca en Colombia. En: Fischer y Carranza (Eds), Los frutales caducifolios en Colombia: Situación actual, sistemas de cultivo y plan de desarrollo (47-65). Bogotá, D.C.: SCCH.

Cancino, S. E., Escalante, G. O. C., & García, E. Q. 2018. Modelo explicativo de la rentabilidad económica del cultivo de durazno en la provincia de Pamplona, Colombia. *ECONÓMICAS CUC*, 39(2), 63-76.

Carlina, S., Zúñiga, R., Inés, C., & Aristizábal, G. 2021. Manual práctico de microbiología básica. Editorial Universidad del Cauca.

Casals, C., Segarra, J., De Cal, A., Lamarca, N., and Usall, J. 2015. Overwintering of *Monilinia* spp. on Mummified Stone Fruit. *Journal of Phytopathology*, 163(3), 160-167.

Cook, R. J. 1988. Biological control and holistic plant-health care in agriculture. *American Journal of Alternative Agriculture*, 3(2-3), 51-62. doi:10.1017/S0889189300002186.

Corrales, L., Sánchez, L., Cuervo, J., Joya, J., Y Marquez, K. 2012. Efecto biocontrolador de *Bacillus* spp., frente a *Fusarium* sp., bajo condiciones de invernadero en plantas de tomillo (*Thymus vulgaris* L.). *Nova. Publicación científica en ciencias biomédicas issn 1794 - 2470 vol. 10 no. 17 enero - junio de 2012*

Cotes, A. M., Fargetton, X., Y Köhl, J. 2018. Diseño conceptual, selección y prueba de concepto de microorganismos biocontroladores. In *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros* (pp. 594-627). Agrosavia.

Cuellar Gil, J. A., Coronado Rios, S. M., y ARRUBLA QCO, R. C. 2011. Diferenciación de especie micobacteriana por FT-IR (espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier). *Acta Biológica Colombiana*, 16(2), 109-120.

Cuervo Lozada, J. P. 2010. Aislamiento y Caracterización de *Bacillus* spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales.

DANE. 2018. Medida de Pobreza Multidimensional Municipal - Censo Nacional De Población y Vivienda. Bogotá: Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). Disponible en: <https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/pobreza-y-condiciones-de-vida/pobreza-y-desigualdad/medida-de-pobreza-multidimensional-de-fuente-censal>. Consultado: julio de 2022.

De Santander, G.D.N. 2020. Plan Departamental de Desarrollo “Más oportunidades para todos (2020 - 2023)” Silvano Serrano.

Recuperado de http://www.nortedesantander.gov.co/portals/0/PDD_2020_2023_Plan_de_desarrollo.pdf

Eraso, B. 1988. El cultivo del durazno en Colombia. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/20.500.12324/30479>.

Estrada-Vélez, M. N., Vélez-Arango, P. E., Montoya-Restrepo, E. C., Y Bustillo-Pardey, A. E. 1999. Esporulación, germinación y patogenicidad de aislamientos monoespóricos de *Beauveria bassiana*. *Cenicafé*, 50(1), 49-65.

Fachinello, J.C., M.d.S. Pasa, J.D. Schmitz y D.L. Betemps. 2011. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. *Rev. Bras. Frutic.* 33, No. especial, 109-120.

Falardeau, J., Wise, C., Novitsky, L., & Avis, T. J. 2013. Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens. *Journal of chemical ecology*, 39(7), 869-878.

FAOSTAT. 2012. FAO statistics database on the world wide web. Consultada el 05 de julio de 2016, de FAOSTAT database, <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=567&lang=es#ancor>

FAOSTAT. 2020. FAO statistics database on the world wide web. Consultada el 12 de julio de 2022, de FAOSTAT database, <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=567&lang=es#ancor>

Fernández, 2012. Ruta del Durazno y del Agua, Universidad de Pamplona. 2022. Tomado

de:

https://www.unipamplona.edu.co/unipamplona/portaIG/home_174/publicacion/publicado/index.htm. Consultado: julio 2022.

Fernández, 2014. Ruta del Durazno y del Agua, Universidad de Pamplona. 2022. Tomado

de:

https://www.unipamplona.edu.co/unipamplona/portaIG/home_174/publicacion/publicado/index.htm. Consultado: julio 2022.

Gajbhiye, A., Rai, A. R., Meshram, S. U., Y Dongre, A. B. 2010. Isolation, evaluation and characterization of *Bacillus subtilis* from cotton rhizospheric soil with biocontrol activity against *Fusarium oxysporum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(7), 1187-1194.

García-Martínez, D. C., Vázquez-López, A., Ayala-Escobar, V., Nava-Díaz, C., Y Aranda-Ocampo, S. 2022. *Bacillus* y *Pseudomonas* fluorescentes de la rizosfera de agaves silvestres antagonistas contra bacterias pectinolíticas. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 9(1).

Gell Silvente, I. 2007. Podredumbre parda del melocotonero (*Monilinia* spp.): detección, identificación de especies y contribución a la epidemiología de la enfermedad (Doctoral dissertation, Agronomos).

George, A.P., R.J. Nissen y B.W. Sherman. 1988. Overlapping and early single cropping of low chill peaches in Australia. *Fruit Var. J.* 42(3), 91-95.

Goodacre, R., Shann, B., Gilbert, R. J., Timmins, E. M., McGovern, A. C., Alsberg,

B. K., Y Logan, N. A. 2000. Detection of the dipicolinic acid biomarker in *Bacillus* spores using Curie-point pyrolysis mass spectrometry and Fourier transform infrared spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 72(1), 119-127.

Guédez, C., Castillo, C., Cañizales, L., & Olivar, R. 2008. Control biológico: una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. *Academia*, 7(13), 50-74.

Guillem-Cruz, R.; Hernández-Castillo, F. D.; Gallegos-Morales, G.; Rodríguez-Herrera, R.; Aguilar-González, C. N.; Padrón Corral, E. y Reyes-Valdés, M. H. 2006. *Bacillus* spp. como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). *Rev. Mex. Fitopatol.* 24:105-114.

Gutierrez, A. C., Tornesello-Galván, J., Manfrino, R. G., Hipperdinger, M., Falvo, M., D'Alessandro, C., & López Lastra, C. C. 2017. Organización y conservación de la colección de hongos patógenos y simbioses de insectos y otros artrópodos del CEPAVE (CONICET-UNLP), La Plata, Argentina. *Revista argentina de microbiología*, 49(2), 183-188.

Gutiérrez-Acosta, F., Padilla-Ramírez, J. S., Y Reyes-Muro, L. 2008. Fenología, producción y características de fruto de selecciones de durazno (*Prunus persica* L. Batsch.) Ana en Aguascalientes. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 14(1), 23-32.

Herbario Virtual. 2022. Cátedra de Fitopatología. Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires

https://herbariofitopatologia.agro.uba.ar/?page_id=3371 Consultado en julio de 2022.

Hindle, A., Y Hall, E. H. 1999. Dipicolinic acid (DPA) assay revisited and appraised for spore detection. *Analyst*, 124(11), 1599-1604.

Ibarra, J. E., Del Rincón, M. C., Galindo, E., Patiño, M., Serrano, L., García, R., ... y Bravo, A. 2006. Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. *Revista latinoamericana de microbiología*, 48(2), 113-120.

Instituto Colombiano Agropecuario ICA (2009). Resolución 4174 de Buenas Prácticas Agrícolas. 6 de noviembre.

Instituto Colombiano Agropecuario ICA. 2015. Manual para elaboración de protocolos para ensayos de eficacia con PQUA.

- Ioos, R., Y Frey, P. 2000. Genomic variation within *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*, and application to species identification by PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 106(4), 373-378.
- Jackson, D., Looney, N. E., & Morley-Bunker, M. (Eds.). 2011. Temperate and subtropical fruit production. CABI.
- Janga, M. R., Raouf, M. A., & Ulaganathan, K. (2017). Effective biocontrol of Fusarium wilt in castor (*Ricinus communis* L.) with *Bacillus* sp. in pot experiments. *Rhizosphere*, 3, 50-52
- Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, Park SC, Jeon YS, Lee JH, Yi H, Won S, Chun J. 2012. Introducing EzTaxon: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol*. 62, 716-721.
- Llamas, J., Avelar, J., Lara, A., Rumayor, F., Cortés, J y Salas, M. 2006. Diseño y establecimiento de modelos para la producción competitiva de durazno en Zacatecas. En: Clientes, A.C. (ed). *Memorias II Congreso. Consejo de Productores de Durazno de Aguas*, Universidad Autónoma de Zacatecas, México DF
- Malvárez, G., A. Rodríguez, C. Aguilar, E. Silvera, y P. Mondino. 2001. Identificación de especies de *Monilinia* spp en aislamientos obtenidos de *Prunus* spp por PCR con primers específicos. *Agrociencia* V(1): 48-53.
- Márquez, M., Martínez, M. M., Y Franco, M. 2002. Aislamiento de *Trichoderma* sp. Y Actinomycetes a partir de suelos de clavel (*Dianthus caryophyllus*) y evaluación de su capacidad antagonica in vitro sobre *Fusarium oxysporum*. f. sp. *Dianthi*. *Agronomía Colombiana*, 19(1-2), 81-87.
- Mastrapa, E., Rodríguez, E., y Rodríguez, O. 2004. Uniformidad Genética. Causas y Riesgos En los Cultivos de Yuca y Boniato. *Revista trimestral Ciencias Holguín*, 10(4), 1-12
- Meena, K. R., Sharma, A., Kumar, R., & Kanwar, S. S. 2020. Two factor at a time approach by response surface methodology to aggrandize the *Bacillus subtilis* KLP2015 surfactin lipopeptide to use as antifungal agent. *Journal of King Saud University-Science*, 32(1), 337-348.
- Miranda, D.; Fischer, G.; Carranza, C. (eds). 2013. Los frutales caducifolios en Colombia: Situación actual, sistemas de cultivo y plan de desarrollo. *Soc. Col. Cienc.Hort.* p.47-66.
- Misión para la Transformación del Campo. 2014. Propuesta para desarrollar un modelo eficiente de Comercialización y Distribución de Productos (Documento técnico para la Misión para la Transformación del Campo). Bogotá D.C

Mohammadi P., Tozlu E., Kotan R., Kotan Şenol M. 2017. Potential of some bacteria for biological control of postharvest citrus green mould caused by *Penicillium digitatum*. Plant Protect. Sci., 53

Mondino, P. 2002. Enfermedades fúngicas del duraznero. Podredumbre morena. Facultad de Agronomía. Universidad de la República. Montevideo Uruguay.

Consultada el 05 de julio de 2016

en:<http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/enfermedades/Monilinia.htm>

Montoya Muñoz, A. F., López Velasco, G. V., Y Cruz Estrada, V. 2022. Aislamiento de bacterias a partir de suelos antrópicos afectados por pesticidas. Journal of Research of the University of Quindío, 34.

Muñoz, Z., Moret, A., y Bech, J., 2008. Caracterización morfológica y molecular de aislados de *Monilinia* spp. y pruebas de patogenicidad sobre manzana. Agrociencia, 42(1), 119-128.

Nápoles, M. C., Martínez, J., Costales, D., Gómez, G., Y Somers, E. 2006. Efecto de diferentes medios de cultivo en la multiplicación celular de *Bradyrhizobium elkanii*. Cultivos Tropicales, 27(1), 35-38.

Navas-Cataño, J. A., Bello-Dotor, J. P., Y Contreras-Bonilla, L. V. 2021. Oportunidad comercial frutas exóticas colombianas.

NCBI "*Bacillus subtilis*". Consultado en agosto de 2022.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=653685>

Ñacato Suntaxi, C. A., Y Valencia Gordón, M. F. 2016. Aislamiento, identificación y pruebas in vitro de cepas autóctonas de *Bacillus subtilis* como agente de biocontrol de *Alternaria* spp en *Brassica oleracea* var. italica (Bachelor's thesis).

Oana Alina, Siciua., Constantinescu, Florica Y Cornea, Calina Petruta. 2015. Biodiversity of *Bacillus subtilis* group and beneficial traits of *Bacillus* species useful in plant protection. Romanian Biotechnological Letters. 20. 10737-10750.

Orozco, A. Z., Cruz, M. V. O., Y González, A. C. 2022. Ensayos in vitro para cuantificar la actividad biológica de citocinas. Tecnología en Marcha, 35(2), 152- 166.

Patel S, Gupta RS. 2020 "A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and *Alkalihalobacillus* gen. nov." *Int J Syst Evol Microbiol*;70(1):406-438.

Pedraza, L. A., López, C. E., Y Uribe-Vélez, D. 2020. Mecanismos de acción de *Bacillus* spp.(Bacillaceae) contra microorganismos fitopatógenos durante su interacción con plantas. *Acta biológica colombiana*, 25(1), 112-125.

Pedraza, R. O., Teixeira, K. R., Scavino, A. F., de Salamone, I. G., Baca, B. E., Azcón, R., Y Bonilla, R. 2010. Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. *Revisión. Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 11(2), 155-164.

Peñaranda, G. 2012. Análisis de costos de la producción de durazno (*Prunus persica*) en la provincia de Pamplona (Norte de Santander). *Revista de la Facultad de Ciencias Económicas y Empresariales FACE*, 145-162.

Perfetti, J., Balcázar, A., Hernández, A., Leibovich, J. 2013. Políticas para el desarrollo de la agricultura en Colombia. Bogotá, D.C.: La Imprenta Editores S.A.

Petróczy, M., Szigethy, A., & Palkovics, L. 2012. *Monilinia* species in Hungary: morphology, culture characteristics, and molecular analysis. *Trees*, 26(1), 153-164.

Pinzón, E.H.; Cruz Morillo, A.; Fischer, G. 2014. Aspectos fisiológicos del duraznero(*Prunus persica* [L.] Batsch) en el trópico alto. Una revisión. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.* 17(2): 401-411.

Puentes, G., L.F. Rodríguez y L. Bermúdez. 2008. Análisis de grupo de las empresas productoras de frutales caducifolios del departamento de Boyacá. *Agron.Colomb.* 26(1), 146-154.

Pullés, M. R., Navarro, R. M., Y Morales, V. M. 2006. Criterios para la acreditación de laboratorios que realizan ensayos microbiológicos según NC-ISO/IEC 17025: 00. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 37(1), 32-36.

Ruiz-Sánchez, E., Mejía-Bautista, M. Á., Cristóbal-Alejo, J., Valencia-Botín, A., Y

Ramírez, A. G., Ramírez, A. R., Sánchez, E. R., Y Ibarra, J. E. 2018. Aislados nativos de *Bacillus thuringiensis* del sureste de México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 9(3), 539-551.

Rebuffo-Scheer, C. A., Kirschner, C., Staemmler, M., y Naumann, D. 2007. Rapid species and strain differentiation of non-tuberculous mycobacteria by Fourier- Transform Infrared microspectroscopy. *Journal of microbiological methods*, 68(2), 282-290.

Reyes-Ramírez, A. 2014. Actividad antagónica de filtrados de *Bacillus subtilis* contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). *Revista mexicana de ciencias agrícolas*,

5(7), 1325-1332.

Rosas-Guevara, V., M. Hernández-Arenas, R. Miranda-Marini, E. Bravo-Mosqueda, A. Berriozabal-Onofre. 2014. Identificación y variabilidad morfológica de pokkahboeng (*Fusarium* spp) en caña de azúcar. Investigación Agropecuaria 11(2): 119-

126. Jul-Dic 2014. ISBN: 2007-1353. www.investigacionagropecuaria.com.mx

Rojas Badía, M. M., Sánchez Castro, D., Rosales Perdomo, K., Y Lugo Moya, D. 2017. Antagonismo de *Bacillus* frente a hongos fitopatógenos de cultivos hortícolas. Revista de Protección Vegetal, 32(2), 00-00.

Rosso, M. L. and Delécluse, A. 1997. Distribution of the insertion element IS240 among *Bacillus thuringiensis* strains. Curr. Microbiol. 34(6):348-353.

Ruta del Durazno y del Agua, Universidad de Pamplona. 2022. Tomado de: https://www.unipamplona.edu.co/unipamplona/portalIG/home_174/recursos/genera1/19042015/introduccion_al_programa.jsp. Consultado: julio 2022.

Ryugo, K. 1993. Fruticultura: ciencia y arte. AGT Editor, México, DF.

Saldivia Alvarez, M. J., Y Tisnao, R. 2021. Aislamiento, Caracterización e Identificación de *Bacillus* sp. 2 asociados a la rizósfera de Gevuina avellana Mol. en la zona 3 Centro Sur de Chile.

Salinas-García, J. R., Díaz-Franco, A., Garza-Cano, E., Y Garza-Cano, I. 2005. Effects of tillage and biofertilization on the soil properties affecting sustainability of the dry bean. cyta-Journal of Food, 5(1), 30-34.

Sanchez, A. 2020. Biocontrol de *Phytophthora* spp. con aislados regionales de *Trichoderma* spp. del Alto Valle de Río Negro en plantaciones de pera comercial.

Shafi Jamil, Hui Tian y Mingshan Ji. 2017: *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review, Biotechnology & Biotechnological Equipment, DOI:10.1080/13102818.2017.1286950

Suárez Contreras, L. Y., y Rangel Riaño, A. L. 2013. Aislamiento de microorganismos para control biológico de *Moniliophthora roreri*. Acta Agronómica, 62(4), 370-378.

Tejera-Hernández, B., Rojas-Badía, M. M., & Heydrich-Pérez, M. 2011. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. Revista CENIC. Ciencias Biológicas, 42(3), 131-138.

Tejera, B., Heydrich, M., Y Rojas, M. M. 2012. Antagonismo de *Bacillus* spp. frente a hongos fitopatógenos del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Revista de Protección Vegetal, 27(2), 117-122.

Tibaduiza Castañeda, L. P., Ovalle Másmela, J. C., Y Botero Rute, L. M. (Eds.). (2021). Conservación y manejo de la diversidad microbiana en los Bancos de Germoplasma para la Alimentación y la Agricultura en Colombia. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA).

Torres Guarín, Y, Patiño Pacheco, M Y Martínez, J. 2019. Identificación del agente causal de la pudrición parda en frutos de duraznero (*Prunus pérsica*, L. Batsch) en Boyacá. En: Entramado. Enero - Junio, 2019. vol. 15, no. 1, p. 298-309 <http://dx.doi.org/10.18041/1900-3803/entramado.1.5418>

Tuset, J. J., Hinarejos, C., y Mira, J. L. 2007. La “podredumbre marrón”(*Monilinia* spp.) de los frutales de hueso. *Phytoma España*, (191), 17-25.

Vaca Guerrero, B. A. 2022. Evaluación de *Bacillus subtilis* cohn. para el control de

Botrytis fabae s. en *Vicia faba* l., Quiroga, Imbabura (Bachelor's thesis).

Vasić, M., Vico, I., Jurick, W. M., & Duduk, N. 2018. Distribution and characterization of *Monilinia* spp. causing apple fruit decay in Serbia. *Plant disease*, 102(2), 359-369.

Villamil, J., J. Blanco y S. Viteri. 2012. Evaluación in vitro de microorganismos nativos por su antagonismo contra *Moniliophthora roreri* Cif & Par en cacao (*Theobroma cacao* L.). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 65(1): 6305-6315.

Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & Santos-Villalobos, S. D. L. 2018. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista mexicana de fitopatología*, 36(1), 95-130.

Vinchira-Villarraga, D. M., y Moreno-Sarmiento, N. 2019. Control biológico: Camino a la agricultura moderna. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21(1), 2-5.

Wang, A. and G.J. Ash. 2015. Whole Genome Phylogeny of *Bacillus* by Feature Frequency Profiles (FFP). *Scientific Reports*. 5: p. 13644.

Wee Fan, Ben et al. 2017. “*Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* Form an "Operational Group *B. amyloliquefaciens*" within the *B. subtilis* Species Complex.” *Frontiers in microbiology* vol. 8 22. 20.

Zhang, W. 2018. Uso global de plaguicidas: perfil, tendencia, costo/beneficio y más. *Actas de la Academia Internacional de Ecología y Ciencias Ambientales*, 8 (1), 1.