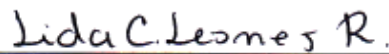


NOTA DE ACEPTACIÓN:



Diana Carolina Pabón Baquero Ing. Agrónoma, MSc

Jurado



Lida Carolina Lesmes Rodríguez Bióloga, MSc

Jurado



Dra. Martha Lucia Ortiz Moreno Bióloga, MSc, PhD

Director

Villavicencio, 15 de Junio de 2018



**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE CEPAS DE LEVADURAS CON ACTIVIDAD
ANTAGONISTA FRENTE A *Colletotrichum* sp.**

YULIETH YESENIA NAVARRO HERRERA

**UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y QUÍMICA
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
VILLAVICENCIO, COLOMBIA
2018**

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE CEPAS DE LEVADURAS CON ACTIVIDAD
ANTAGONISTA FRENTE A *Colletotrichum* sp.**

YULIETH YESENIA NAVARRO HERRERA

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Biólogo (a)

Director (a):

Ph.D. M.Sc., Bióloga. Martha Lucia Ortiz Moreno

**UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS E INGENIERIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y QUÍMICA
PROGRAMA DE BIOLOGIA
VILLAVICENCIO, COLOMBIA
2018**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente a Harold Bastidas, director del Laboratorio de Microbiología y Fitopatología Vegetal por permitir el desarrollo de mi pasantía. Así como también a la auxiliar, Dalila Franco por su conocimiento y consejos.

Agradezco a la docente M.sc Angela Mogollon por ser parte de este proceso y guiarme en la etapa inicial.

Agradezco al Laboratorio de Biología y Química por el uso de equipos y el insumo de reactivos, de igual forma la colaboración de los auxiliares asociados al laboratorio.

Mi más sincero agradecimiento a mi tutora la Dra. Martha Lucia Ortiz Moreno por su apoyo, consejos y paciencia durante mi proceso de pasantía encaminado a optar mi título universitario.

Agradezco a los jurados Prof. M.sc Lida Lesmes y la I.A. M.sc Diana Pabón, por sus aportes y correcciones de la propuesta e informe final de pasantía.

Agradezco al director Prof. M.sc Jorge Pachón García y los integrantes del comité de programa por la atención de las solicitudes presentadas.

Agradezco a los docentes asociados al programa que fueron parte del proceso de formación.

Agradezco a mis amigos y compañeros que contribuyeron de forma directa e indirecta en mi formación académica, además de su apoyo y consejos.

Resumen

El hongo *Colletotrichum* sp., agente causal de la antracnosis en cultivos inclusive del maracuyá, afecta tanto el follaje como los frutos, dando lugar a reducciones en el rendimiento del cultivo y por consiguiente pérdidas económicas. El uso de fungicidas para mitigar la enfermedad es una práctica común en los cultivos, sin embargo, estos productos están provocando resistencia en el patógeno, además de afectar la salud humana y al medio ambiente. Una alternativa al uso de fungicidas, es el control biológico con microorganismos antagonistas que ha mostrado alta eficiencia. Por consiguiente, el objetivo de este trabajo fue seleccionar y caracterizar fenotípicamente (morfología y fisiología) tres levaduras (morfotipos M7, M2 y M5) aisladas de frutos y hojas de maracuyá con actividad antifúngica sobre *Colletotrichum* sp., las cuales en pruebas levadura-patógeno a nivel *in vitro* por confrontación en placa inhibieron en un 37-58% el crecimiento radial del fitopatógeno. Estas tres levaduras fueron caracterizadas fisiológicamente con pruebas de tolerancia a pH, condiciones de temperatura, osmotolerancia y asimilación de diferentes fuentes de carbono, entre otras. Los crecimientos óptimos de las levaduras M7, M2 y M5 en las pruebas fisiológicas fueron: valores de pH entre 3-5, temperatura de 30°C y osmotolerancia hasta del 1% de NaCl. Las levaduras asimilaron todas las fuentes de carbono, con preferencia por sacarosa, maltosa y lactosa, además de fermentar la glucosa, fructosa, xilosa, sacarosa y maltosa. También presentaron mayor asimilación de fuentes orgánicas de nitrógeno como la peptona. Y por último su baja actividad enzimática sobre polímeros derivados de tejidos vegetales. Debido a su eficaz desarrollo en las pruebas fisiológicas e inocuidad, la levadura M2, es un agente promisorio de biocontrol a nivel de campo y poscosecha.

Palabras clave: antagonista; biofungicidad; *Colletotrichum*; fisiología; levaduras.

Abstract

The fungus *Colletotrichum* sp., the causal agent of anthracnose in the inclusive crop of the passion fruit, affects both foliage and fruits, leading to reductions in crop yield and consequently economic losses. The use of fungicides to mitigate the disease is a common practice in crops, however, these products are causing resistance in the pathogen, in addition to affecting human health and the environment. An alternative to the use of fungicides, is the biological control with antagonistic microorganisms that has shown high efficiency. Therefore, the objective of this work was to select and phenotypically characterize (morphology and physiology) three yeasts (M7, M2 and M5) isolated from the fruit and passion fruit with antifungal activity on *Colletotrichum* sp., Which in yeast tests -pathogenic in vitro level by plaque confrontation inhibited the radial growth of the phytopathogen in 37-58%. These three yeasts were characterized physiologically with analysis of tolerance to pH, temperature conditions, osmotolerance and assimilation of different carbon sources, among others. The optimal growths of the yeasts M7, M2 and M5 in the physiological tests were: values of pH between 3-5, temperature of 30 ° C and osmotolerance up to 1% of NaCl. The yeasts assimilated all carbon sources, preferably sucrose, maltose and lactose, in addition to fermenting glucose, fructose, xylose, sucrose and maltose. They also showed greater assimilation of organic nitrogen sources such as peptone. And finally its low enzymatic activity on polymers derived from plant tissues. Due to its effective development in physiological tests and safety, the M2 yeast is a promising biocontrol agent at the field and post-harvest levels.

Key words: antagonistic; biofungicided; *Colletotrichum*; physiology; yeasts.

Tabla de contenido

Resumen	1
Abstract	2
Lista de figuras	5
Lista de tablas.....	6
Lista de símbolos y abreviaturas.....	7
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
JUSTIFICACIÓN.....	10
OBJETIVOS	12
Objetivo general.....	12
Objetivos específicos	12
MARCO TEÓRICO	13
Características generales de las levaduras:.....	13
Métodos convencionales de caracterización de levaduras:.....	13
Aplicación biotecnológica de las levaduras: Las levaduras	13
Control biológico:	14
Generalidades del Maracuyá:	14
Enfermedades del maracuyá:	15
<i>Collectotrichum spp.</i> (Antracnosis):.....	15
METODOLOGÍA	17
Área de estudio:.....	17
Aislamiento de levaduras:	17
Caracterización morfológica macroscópica y microscópica de levaduras:.....	17
Prueba de antagonismo levadura-patógeno <i>in vitro</i> :	17
Diseño experimental y análisis estadístico:	18
CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA	18
Curvas de crecimiento:	18
Prueba de pH:.....	18
Prueba de termotolerancia:.....	19
Prueba de tolerancia a soluciones de NaCl (Osmotolerancia):.....	19
Prueba de crecimiento en diferentes fuentes de carbono y compuestos nitrogenados:	19
Prueba de capacidad fermentativa:.....	19

Prueba de exoglucanasas y endoglucanasas:	20
Prueba de peroxidasas:	20
Diseño experimental y análisis estadístico:	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DE LEVADURAS	22
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGONISTA FRENTE A <i>Colletotrichum sp.</i>	24
Prueba de antagonismo levadura-patógeno <i>in vitro</i>	24
CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LEVADURAS ANTAGONISTAS FRENTE A <i>Colletotrichum sp.</i>	26
Curvas de crecimiento	27
Caracterización fisiológica	28
Prueba de pH.....	28
Prueba de termotolerancia	30
Prueba de tolerancia a NaCl (Osmotolerancia)	31
Prueba de asimilación de fuentes de carbono, capacidad fermentativa y compuestos nitrogenados	32
Asimilación de fuentes de carbono	32
Capacidad fermentativa	33
Asimilación de compuestos nitrogenados	34
Prueba de exoglucanasas, endoglucanasas y peroxidasas	35
CONCLUSIONES	39
BIBLIOGRAFÍA.....	40
ANEXOS.....	48

Lista de figuras

Figura 1. Resultados de la actividad antagonista <i>in vitro</i> de aislamientos de levaduras antagonistas frente a <i>Colletotrichum sp.</i>	24
Figura 2. Antagonismo <i>in vitro</i> contra <i>Colletotrichum sp.</i> en medio de cultivo PDA. a-b) Crecimiento micelial hasta el límite de las estrías de la levadura c) Inhibición del hongo levaduriforme frente <i>Colletotrichum sp.</i> Fuente: Autora, 2018.....	25
Figura 3. Curvas de crecimiento de las levaduras antagonistas analizadas en función del tiempo (horas) durante 28 horas de incubación.	27
Figura 4. Comportamiento general del crecimiento de los morfotipos de levaduras antagonistas M7, M2 y M5 sometidos a diferentes rangos de pH.	29
Figura 5. Comportamiento general del crecimiento de los morfotipos M7, M2 y M5 sometidas a diferentes condiciones de temperatura.	30
Figura 6. Comportamiento general del crecimiento de los morfotipos M7, M2 y M5 sometidos a diferentes concentraciones de NaCl.	31
Figura 7. Comportamiento general del crecimiento de los morfotipos M7, M2 y M5 sometidas a diferentes fuentes de Carbono.	33
Figura 8. Capacidad fermentativa del morfotipo M2: fermentación positiva, coloración roja y negativa, coloración amarilla.....	34
Figura 9. Comportamiento general del crecimiento de los morfotipos M7, M2 y M5 sometidas a diferentes fuentes de Nitrógeno.	35
Figura 10. Resultados de las prueba de exoglucanasas, endoglucanasas y peroxidadas de los morfotipos M7, M2 y M5 de levaduras antagonistas.	36

Lista de tablas

Tabla 1. Valores de los rangos evaluados en las pruebas de pH, termotolerancia (T°C) y osmotolerancia (NaCl %).	19
Tabla 2. Fuentes de carbono y nitrógeno que fueron evaluadas para el crecimiento de las cepas de levaduras antagonistas en asimilación aeróbica y fermentación.....	20
Tabla 3. Caracterización macroscópica y microscópica de cepas de levaduras, aisladas de frutos y follaje de maracuyá evaluadas después de cinco días de incubación.	22
Tabla 4. Caracterización macroscópica y microscópica de las levaduras antagonistas contra <i>Colletotrichum</i> sp.	26
Tabla 5. Perfil de fermentación de los morfotipos M7, M2 y M5 en diferentes fuentes de carbono.....	34
Tabla 6. Perfil de las prueba de exoglucanasas, endoglucanasas y peroxidases de los morfotipos M7, M2 y M5.	36

Lista de símbolos y abreviaturas

Símbolo	Término
HCl	Ácido clorhídrico
ASB	Absorbancia
ADE	Agua destilada estéril
°C	Grados centígrados
cm	Centímetros
NaCl	Cloruro de sodio
g	Gramos
NaOH	Hidróxido de sodio
ha	Hectáreas
h	Hora
l	Litro
µl	Microlitos (1 x 10 litros)
µm	Micrómetro (0,01mm)
min	Minutos
ml	Mililitros (1 x 10 ⁻³ litros)
mm	Milímetros
nm	Nanómetros
N	Normal
PDA	Papa dextrosa agar
ha/ton	Producción
rpm	Revoluciones por minuto
sp.	Especie
ton	Tonelada
YGC	Yeast extract glucose chloramphenicol agar
YPD	Yeast extract peptone dextrose

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los hongos fitopatógenos son considerados la mayor causa de pérdidas de frutales y vegetales a niveles de campo y postcosecha (Carris *et al.*, 2012). La antracnosis es una enfermedad fúngica que afecta una gran variedad de frutales tropicales y frutos en precosecha y postcosecha (Júnior *et al.*, 2010; Hernández *et al.*, 2015; Bi *et al.*, 2017). El agente causal de la enfermedad consiste en las especies de hongos del género *Colletotrichum* (Than *et al.*, 2008; Hyde *et al.* 2009; Pardo-De la Hoz *et al.*, 2016), patógeno cuyo desarrollo se ve favorecido por temperaturas cálidas y alta humedad relativa, condiciones que prevalecen en regiones tropicales (Velho *et al.*, 2014; Sharma y Kulshrestha, 2015). Las pérdidas causadas por el patógeno se deben a lesiones que consisten en manchas oscuras que después se necrosan. Dependiendo del patosistema, el patógeno puede infectar diferentes partes de las plantas como tallos, hojas, flores y frutos (Sharma y Kulshrestha, 2015).

En el cultivo de maracuyá los reportes de incidencia de la enfermedad han alcanzado un 50% en el departamento de Cauca (Torres *et al.*, 1999), de manera que se deben tomar medidas de manejo, las cuales actualmente se basan en el control químico, es decir la aplicación de fungicidas en campo y postcosecha (El Ghaouth *et al.*, 2004), sin embargo, los fungicidas sintéticos ocasionan efectos negativos en la salud humana y en el medio ambiente (Aktar *et al.*, 2010; Alavanja *et al.*, 2013), así como también, inducen resistencia a especies de *Colletotrichum* (Ramdial *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2016; Vieira *et al.*, 2017).

En vista a estas problemáticas, se han promovido medidas alternativas en las prácticas agrícolas de los cultivos afectados, por lo que en los últimos años el control biológico ha sido objeto de estudio encontrándose resultados efectivos y potenciales en el control de enfermedades fúngicas (Sharma *et al.*, 2009). Entre las opciones estudiadas, está el control biológico con microorganismos, este consta en el manejo y uso de antagonistas presentes en la superficie del fruto (Hernández *et al.*, 2007; Preto *et al.*, 2013). Los microorganismos antagonistas potenciales, como las levaduras, han sido utilizados contra diferentes patógenos poscosecha analizando su efecto antifúngico (Spadaro y Droby, 2015; Ruiz *et al.*, 2016). Esta actividad biocontrol se debe a mecanismos de acción como la antibiosis, producción de enzimas líticas, parasitismo, competencia por espacio y nutrientes, e inducción de resistencia (Rosa *et al.*, 2010; Lutz *et al.*, 2013; Nally *et al.*, 2015; Pesce *et al.*, 2017).

Con base en lo anterior, el estudio de la diversidad de cepas de levaduras antagonistas es fundamental para la selección de posibles agentes de biocontrol, de esta manera se planteó la siguiente pregunta de investigación ¿existen levaduras en hojas y frutos de maracuyá con actividad antagonista a nivel *in vitro* y que además presenten capacidad de adaptación a condiciones tropicales, para mejorar la calidad y producción del cultivo maracuyá?

JUSTIFICACIÓN

El maracuyá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deneger), es cultivado actualmente en zonas tropicales (Ocampo *et al.* 2012). Su producción mundial es de aproximadamente 640.000 ton/año, siendo Brasil, Ecuador, Colombia, China y Perú los principales productores mundiales (CCI, 2004). En Colombia, el cultivo de maracuyá ha mostrado una dinámica de constante crecimiento, donde el área sembrada era de 2.643 ha en 1996 pasando a 5.800 ha en el año 2013 con una producción de 94.217 ton/año (CCI, 2004; tomado de Ocampo *et al.*, 2012). Es de destacar que el departamento del Meta con 800 ha y una producción de 28.858 ton, es el segundo productor, inclusive con un rendimiento superior al departamento del Huila, siendo este el primer productor a nivel nacional.

Debido a que el maracuyá se exporta como fruta fresca y productos procesados, el 65% de la producción se destina al comercio internacional en forma de jugo o concentrado, convirtiéndose en el tercer jugo exótico de mayor importancia en el mercado después de los jugos de mango y piña (CCI, 2004; Ocampo *et al.*, 2012.; Miranda *et al.*, 2009). Sin embargo, en condiciones de cosecha y poscosecha existen problemas fitosanitarios debido a microorganismos, entre los que se destaca *Colletotrichum* spp., agente causal de la antracnosis, el cual afecta las apariencia y propiedades organolépticas de los frutos.

Actualmente ha surgido un nuevo panorama donde los consumidores no sólo contemplan la estética del fruto, sino que también buscan que estén libres de residuos tóxicos y producidos bajo buenas prácticas de producción, sustentables y amigables con el medio ambiente (Garmendia *et al.*, 2015). Por ello recientemente, el control biológico de problemas fitosanitarios se ha posicionado como una estrategia favorable para reducir las enfermedades en la agricultura sostenible (Janisiewicz y Korsten, 2002; Bale *et al.*, 2007; Bettioli *et al.*, 2014).

Debido a sus características ecofisiológicas, las levaduras presentan control biológico sobre especies de *Colletotrichum*, y esto ha sido reportado por varios autores (Lima *et al.*, 2012). Entre los mecanismos de acción de las levaduras, se incluye la competencia por espacio y nutrientes, además de la inducción de la actividad quitinasa y glucanasa en frutos de mango, al igual que la capacidad micoparásita frente a *Colletotrichum gloeosporioides* (Bautista *et al.*, 2013; Bautista *et al.*, 2014).

Otros reportes referentes al biocontrol de la antracnosis, se destacan los de: Bautista *et al.*, (2013) donde evaluaron a *Meyerozyma caribbica* contra *Colletotrichum gloeosporoides*, mostrando un 86.7% de inhibición *in vivo* de la antracnosis en frutos de Mango (*Mangifera indica* L.). Y a partir de aislamientos de levaduras antagonistas obtenidas de frutos y hojas de aguacate, Campos-Martínez *et al.*, (2016), demostraron que *Candida intermedia* y *Wickerhamomyces anomalus*, redujeron significativamente la incidencia y severidad de la antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum acutatum*.

Por consiguiente, es importante caracterizar las levaduras antagonistas desde sus aspectos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos, ya que permite comprender como interactuaran con su entorno, sus condiciones fisiológicas óptimas y su potencial como agente de biocontrol de hongos fitopatógenos en campo, así como analizar su inocuidad frente a las plantas o humanos. A su vez, la caracterización fenotípica permite comprender sus mecanismos de interacción con el fitopatógeno a nivel clínico-epidemiológico, y aproximarse a su identificación taxonómica (Vaughan-Martini, 2003; Mendoza, 2005). Los resultados de esta investigación aportaran información acerca de levaduras con actividad antagonista frente a *Colletotrichum* sp., agente causal de la antracnosis en frutos de maracuyá. Además este trabajo servirá de base a futuras investigaciones enfocadas en el control biológico de patógenos de importancia en cultivos de la Orinoquía.

OBJETIVOS

Objetivo general

Aislar y caracterizar fenotípicamente (morfología y fisiología) cepas de levaduras con actividad antagonista frente al hongo fitopatógeno *Colletotrichum sp.* que ataca al maracuyá.

Objetivos específicos

- Aislar levaduras del filoplano y fructoplano del maracuyá de un agroecosistema del Departamento del Meta.
- Evaluar la capacidad antagonista de levaduras sobre el desarrollo de *Colletotrichum sp.* a nivel *in vitro*.
- Caracterizar morfológica y fisiológicamente las cepas de levadura con actividad antagonista, como contribución al desarrollo de una alternativa de control biológico.

MARCO TEÓRICO

Características generales de las levaduras: Las levaduras son microorganismos fúngicos unicelulares que pueden estar presentes en un amplio rango de hábitats marinos, acuáticos, aéreos y terrestres, en algunas excepciones forman hifas y/o pseudohifas (Kurtzman *et al.*, 2011). Tienen una fase sexual (teleomorfo) y una fase asexual (anamorfa) (Fell *et al.*, 2000). Las levaduras se encuentran clasificadas dentro de los grupos Ascomycetos y Basidiomicetos, en tanto que en algunos casos debido a que su fase sexual es desconocida o no ha sido descrita, son clasificadas dentro de las levaduras imperfectas o Deuteromycota (Kurtzman *et al.*, 2011).

Métodos convencionales de caracterización de levaduras: Parten desde el estudio morfológico básico, el cual permite establecer diferencias fenotípicas entre las levaduras. La evaluación macroscópica o características visibles de las colonias y la evaluación microscópica o características celulares, permiten la descripción de las colonias, además de la forma y dimensiones celulares, formación de pseudohifas y/o hifas verdaderas, formación y estructuras de esporas asexuales, entre otras (Mendoza, 2005; Kurtzman *et al.*, 2011). Sin embargo, debido a la variación de la morfología en las fases sexuales y asexuales de las levaduras es necesario realizar pruebas fisiológicas y bioquímicas para su descripción e identificación (Vaughan-Martini, 2003). Las pruebas fisiológicas, facilitan en gran medida la identificación hasta género de algunos grupos de levaduras de interés industrial, además de establecer las condiciones para la producción de biomasa celular en el laboratorio y su tolerancia a las variables ambientales en los cultivos comerciales donde se pretende aplicarlas. Entre las pruebas fisiológicas, se encuentra la asimilación de diferentes fuentes de carbono, fermentación, asimilación de compuestos nitrogenados, crecimiento en diferentes rangos de pH y temperatura, así como la catálisis de sustratos (Kurtzman *et al.*, 2011).

Aplicación biotecnológica de las levaduras: Las levaduras han beneficiado a la humanidad por miles de años, actualmente son organismos importantes debido a que son fuentes de innovación biotecnológica encontrándose involucradas en una variedad de procesos industriales (producción de alimentos, bebidas, enzimas y pigmentos), producción de metabolitos de interés farmacéutico y como agentes de biocontrol (Kurtzman *et al.*, 2011; Hatoum *et al.*, 2012). Actualmente se consideran microorganismos antagonistas promisorios por qué presentan las características ideales de un agente de control biológico, como lo son: estabilidad genética, requerimientos nutricionales simples,

sobrevivencia bajo condiciones adversas, resistencia a agroquímicos, no producen metabolitos tóxicos en humanos, además de poseer distintos mecanismos antagonistas contra los fitopatógenos que no inducen resistencia a diferencia de los fungicidas químicos (Liu *et al.*, 2013; Spadaro y Droby, 2015; Ruiz *et al.*, 2016). Hasta el momento, los mecanismos antagonistas mejor descritos en las levaduras son: la competencia por espacio y nutrientes, toxinas *killer*, producción de enzimas líticas, parasitismo y la inducción de resistencia en el hospedero (Saligkarias *et al.*, 2002; Quin *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013). Entre las diferentes especies de levaduras empleadas con éxito en el control biológico de enfermedades se destacan *Candida oleophila*, *Rhodotorula glutinis*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia membranaefaciens* y *Cryptococcus albidus*, (Liu *et al.*, 2013; Spadaro y Droby, 2015).

Control biológico: Se define como el uso de poblaciones de enemigos naturales para mitigar la actividad productora de enfermedad de un patógeno, ya sea temporal o permanentemente (Bale *et al.*, 2007; Van Driesche *et al.*, 2007). El control biológico ha sido una opción exitosa para combatir plagas y enfermedades, siendo objeto de estudio los microorganismos como las levaduras, hongos y bacterias con actividad antagonista (Korsten, 2006; Sharma *et al.*, 2009). Actualmente existen dos enfoques para el uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades poscosecha en frutos y verduras, ya que la superficie de los frutos o fructoplano es una fuente natural de microorganismos, 1) estos son aislados para luego ser manipulados; 2) los microorganismos pueden ser introducidos artificialmente en contra de los agentes patógenos (Korsten, 2006; Hernández *et al.*, 2007). En la revisión de Sharma *et al.*, (2009), recopilan una lista de microorganismos antagonistas utilizados en el control biológico de diferentes enfermedades entre ellas, la antracnosis, estos son algunos de estos microorganismos: *Bacillus licheniformis*, *Burkholderia cepacia*, *Brevundimonas diminuta*, *Candida membranifacies* y *Trichoderma harziaum*.

Generalidades del Maracuyá: La familia Passifloraceae, comprende cerca de 500 especies de *Passiflora*. Sólo *Passiflora edulis* Sims, es conocida como fruta de la pasión, de la cual se distinguen dos formas, la purpura y la amarilla, esta última denominada *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg., o también conocida como maracuyá. El maracuyá es nativo de la región amazónica del Brasil (Morton, 1987). Es una planta que crece en forma de enredadera, leñosa, perenne, con ramas de aproximadamente 20m de largo; presenta tallos verdes, glabros, acanalados en la

parte superior y zarcillos axilares; las hojas son alternas, palmeadas con tres lóbulos y finamente dentadas de color verde lustroso; las flores son solitarias y vistosas, presentan cinco pétalos y una corona de filamentos de color púrpura en la base y blanca en el ápice; posee cinco estambres y tres estigmas. El fruto, es en forma de baya ovoide casi redonda de color rojo a amarillo claro en su madurez, la pulpa es blanca amarillenta y con múltiples semillas de color negro (Morton, 1987; Miranda *et al.*, 2009). Por sus propiedades nutricionales y funcionales, el maracuyá ofrece al organismo una fuente importante de proteínas, carbohidratos, minerales y vitaminas; además de usos medicinales como tranquilizante natural y desinflamatorios a partir de preparaciones de sus hojas (Carvajal *et al.*, 2014). Debido a sus características organolépticas es uno de los frutos más apetecidos a nivel mundial, y Colombia se destaca como uno de los principales productores mundiales. A nivel nacional existe 5.500 ha sembradas, concentradas en los departamentos del Huila, Valle del Cauca, Meta, Córdoba, Cesar, Santander y Magdalena con una productividad promedio entre 19 y 20ton/ha y un volumen anual entre 75.000 a 96.623ton/año (Miranda *et al.*, 2009).

Enfermedades del maracuyá: Torres *et al.*, (1999) reportaron que tanto las raíces, tallos, hojas, flores y frutos del maracuyá son susceptibles al ataque de patógenos que provocan pudriciones, muerte de los tejidos, manchas cloróticas y necróticas, entre otras. El cultivo de maracuyá se ve afectado por insectos, bacterias, hongos y virus. Sin embargo las enfermedades en el cultivo son uno de los factores más limitantes que causan pérdidas significativas. Estas son las principales enfermedades asociadas al cultivo del maracuyá en Colombia: virosis o virus del mosaico de la soya (Soybean Mosaic Potyvirus, SMV-PF), secadera o fusariosis (*Fusarium solani*), Roña (*Cladosporium cladosporioides*), antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*), bacteriosis o mancha de aceite (*Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*) (Ocampo *et al.*, 2012).

***Colletotrichum* spp. (Antracnosis):** Es una enfermedad caracterizada por la aparición de lesiones necróticas en tallos, hojas y frutos de las plantas afectadas (Jeffries *et al.*, 1990; Hyde *et al.*, 2009). Es causada por especies del género *Colletotrichum*, su distribución es cosmopolita y prevalece especialmente en el trópico y subtrópico, afectando una amplia gama de cultivos, así como frutales (Júnior *et al.*, 2010; Hernández *et al.*, 2015; Bi *et al.*, 2017). El proceso de infección de las especies de *Colletotrichum*

comprende una secuencia de etapas como la adhesión y germinación de los conidios sobre la superficie de la planta, producción del tubo germinativo, formación de un apresorio, penetración de la epidermis de la planta, crecimiento y colonización de las hifas en los tejidos de la planta y por último producción de acérvulos y esporulación (Jeffries *et al.*, 1990; Moraes *et al.*, 2013). El género *Colletotrichum* fue establecido por Corda en 1831 para hongos caracterizados por presentar los conidios fusiformes, curvos e hialinos y acérvulos con setas (Jeffries *et al.*, 1990). Actualmente se reconocen 39 especies basadas en características morfológicas como tamaño, forma de los conidios, presencia o ausencia de setas y su telemorfo *Glomerella cingulata* (Sutton, 1992; Freeman *et al.*, 1998).

METODOLOGÍA

Área de estudio: El trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología Vegetal y Fitopatología, ubicado en la Universidad de los Llanos, sede Barcelona. Se realizó un muestreo y colecta de frutos sanos y enfermos de maracuyá en un agroecosistema (Finca La Veremos) del municipio de Villavicencio. Presenta un clima cálido con temperatura media de 25.5°C, precipitación anual de 4384 mm y humedad relativa entre 67- 83% (IDEAM). Agregado a la dominancia de suelos con pastos naturales y un pH < 4,5 (tomado de Orozco *et al.*, 2015).

Aislamiento de levaduras: El aislamiento de levaduras se realizó siguiendo la metodología empleada por Castell *et al.*, (2009) usando frutos y hojas de maracuyá sanos. La recolección de material biológico se realizó en un cultivo ubicado en la vereda Zulia, Municipio de Villavicencio. Una vez las muestras fueron llevadas al laboratorio, se lavaron de manera individual con hipoclorito de sodio al 0,2% durante 2 min, luego dos ADE (agua destilada estéril), después en etanol al 70% durante 1 min y finalmente tres lavados con ADE. Se realizó cortes de tejido vegetal que fueron vertidos en un erlenmeyer de 250 ml con una solución estéril de Tween 80 al 0.5% (50 ml de Tween por cada 2.5 g de muestra). La solución se dejó en agitación orbital a 150 rpm durante 90 min. El agua de lavado resultante fue centrifugada a 5500 rpm durante 10 min. El pellet resultante se suspendió en 1 ml de ADE y de allí se tomaron alícuotas de 0.3 ml para sembrar en agar extracto de levadura.

Caracterización morfológica macroscópica y microscópica de levaduras: Se realizó la descripción macroscópica de las colonias como color, superficie, forma, elevación y tipo de borde con el manual de prácticas de microbiología básica (Valencia, 2004). A nivel microscópico, se describió la forma de la célula y sus dimensiones, a través de un microscopio óptico marca Olympus CX22 con el objetivo de 40X (Kurtzman *et al.*, 2011).

Prueba de antagonismo levadura-patógeno *in vitro*: Los ensayos se realizaron en el laboratorio de Microbiología y Fitopatología vegetal de la Universidad de los Llanos. Siguiendo la metodología empleada por Castell *et al.*, (2009), donde se utilizaron cajas de Petri con PDA (papa dextrosa agar). En cada placa se trazaron dos estrías paralelas a 3 cm del centro de la caja y en cada estría se inoculó con un asa impregnada con cada una de las levaduras aisladas.

Posteriormente se colocó en el centro de cada caja un disco de 0.3 cm de diámetro de inóculo del hongo fitopatógeno, que provinieron de cajas de PDA previamente sembradas.

Tamaño de colonias (mm): esta variable se midió a los siete días, colocando una regla en la base de cada caja Petri.

Porcentaje de inhibición: Se calculó mediante la ecuación (Okigbo y Emeca, 2010):

$$\%Ihb = [(B-Z) / B] \times 100$$

% Ihb: Porcentaje de inhibición

B: Diámetro de la zona de crecimiento del control

Z: Diámetro de la zona de crecimiento con el tratamiento

Diseño experimental y análisis estadístico: Se desarrolló un diseño completamente aleatorizado con tres repeticiones por tratamiento. Cada levadura aislada constituyó un tratamiento. Se incluyó un control negativo, el cual consistió en la inoculación del patógeno solo en caja Petri. Se realizó el análisis estadístico con el software SPSS Statistics® versión 25 de prueba libre, con el cual se aplicó un ANOVA de un factor y una Prueba de Tukey (95%) de comparaciones pareadas para determinar diferencias significativas entre los tratamientos.

CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA

Para las pruebas fisiológicas, el medio de cultivo base fue YPD (extracto de levadura 10g/l, peptona 20g/l y dextrosa 20g/l).

Curvas de crecimiento: A partir de cultivos de 24 h, se sembró 10 µL del cultivo en tubos con 5 ml de medio YPD, luego se incubaron a 30°C y se dejó un tubo control sin inocular para ajustar el espectrofotómetro. A partir de las cero horas (t=0) hasta las 28 h, se tomó de cada tubo una muestra de 3 ml y se realizó lecturas de crecimiento con base en la densidad óptica (Absorbancia 540nm).

Prueba de pH: Para evaluar los diferentes rangos de pH, el medio YPD se ajustó con HCl 0.1N y/o NaOH 0.1N, de acuerdo al pH inicial del medio. Los tratamientos consistieron en tubos con 5 ml de medio líquido por triplicado. Luego se incubaron a temperatura ambiente durante 48h y se observó el crecimiento con base en la densidad óptica (ASB 540nm).

Prueba de termotolerancia: Se evaluaron tratamientos de temperatura (Tabla 1) en tubos con 5 ml de medio líquido (por triplicado). Se dejó incubar durante 48h y posteriormente se observó el crecimiento, se consideró negativo la ausencia de crecimiento celular y dado el caso para positivo se procedió a medir la densidad óptica (ASB 540nm).

Prueba de tolerancia a soluciones de NaCl (Osmotolerancia): Se ajustaron distintas concentraciones de NaCl (Tabla 1), la cuales se agregaron al medio líquido YPD. Las levaduras fueron sembradas en tubos con 5 ml de medio (por triplicado) a temperatura ambiente por 48h. Se consideró prueba negativa la ausencia de crecimiento celular y dado el caso, para positivo se procedió a medir la densidad óptica-ASB 540nm (Uribe, 2007; Medina *et al.*, 2009; Sanclemente, 2015).

Tabla 1. Valores de los rangos evaluados en las pruebas de pH, termotolerancia (T°C) y osmotolerancia (NaCl %).

pH	Termotolerancia (T °C)	Tolerancia NaCl (%)
3	5 °C	Control (0%)
4	Control (30°C)	1%
5	40°C	5%
6	45°C	10%
Control (7)	—	15%

Prueba de crecimiento en diferentes fuentes de carbono y compuestos nitrogenados: Se realizó en medio enriquecido YPD con variación del azúcar a evaluar (Tabla 2); se inocularon en tubos con 5 ml de medio líquido y posteriormente se incubaron a 30°C durante 48h. Se consideró negativo la ausencia de crecimiento celular y dado el caso, para prueba positiva se procedió a medir la densidad óptica-ASB a 540nm.

Prueba de capacidad fermentativa: Se realizó en tubos con 5 ml de medio que contenía YPD con variación del azúcar a evaluar (por triplicado) (Tabla 2); los tubos con inóculo se incubaron a 30°C durante 48h. Los resultados fueron evidenciados agregando al medio 1.6 ml de la solución de rojo de metilo a una concentración de 0,1 %. Siendo la coloración roja, positiva para fermentación y la coloración amarilla negativa (Sanclemente, 2015).

Tabla 2. Fuentes de carbono y nitrógeno que fueron evaluadas para el crecimiento de las cepas de levaduras antagonistas en asimilación aeróbica y fermentación.

Asimilación de Carbono	Capacidad fermentativa	Asimilación de Nitrógeno
Glucosa	Glucosa	Peptona
Fructosa	Fructosa	Nitrato de potasio
Galactosa	Galactosa	
Xilosa	Xilosa	
Sacarosa	Sacarosa	
Lactosa	Lactosa	
Maltosa	Maltosa	

Prueba de exoglucanasas y endoglucanasas: Se evaluó en medio de cultivo líquido con 0,8 % de carboximetilcelulosa (CMC) para las endoglucanasas y 1g/L de papel filtro para las exoglucanasas. Las cepas crecieron por 8 días a temperatura ambiente. Estas fueron inoculadas en 5 ml de medio por triplicado, al igual se empleó un control con medio sin levadura y se incubaron por 6 días a 30°C. El crecimiento de las levaduras se reveló con 1ml de colorante rojo Congo al 0,2% por 15 min y posteriormente se centrifugo por 10 min. En los casos donde hubo decoloración del revelador, se midieron las absorbancias tomando una muestra de 3 ml a una longitud de onda de 488 nm. (Ortiz y Uribe, 2011; Sanchez *et al.*, 2014).

Prueba de peroxidadas: El inóculo tuvo 8 días de crecimiento a temperatura ambiente. En la determinación de la producción de peroxidadas, se utilizó como medio aserrín para reemplazar la lignina alcalina. Las levaduras fueron inoculadas en 5ml de medio por triplicado, al igual se empleó un control con medio sin levadura y se incubaron por 6 días a 30°C. Para las lecturas se agregó 0.4 ml de guayacol al medio y posteriormente se centrifugo por 10 min. Se realizó la medición de absorbancia (488 nm), en aquellos tubos donde hubo cambio de color del revelador (Ortiz y Uribe, 2010).

Diseño experimental y análisis estadístico: En las pruebas de caracterización fisiológica, se usó un diseño experimental completamente aleatorizado con tres repeticiones por tratamiento. Para estimar el crecimiento de cada cepa de levadura se promedió las absorbancias de las réplicas por tratamiento y a este valor se le restó los promedios de los tubos blanco del medio. El análisis estadístico, se realizó con el software SPSS Statistics® versión 25 de prueba libre, el cual consistió en un ANOVA y una Prueba de Tukey (95 %) para comparaciones pareadas, las cuales determinaron las diferencias significativas que se produjeron entre tratamientos en cada una de las pruebas fisiológicas sobre el crecimiento de las levaduras antagonistas (Gorgas *et al.*, 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DE LEVADURAS

A partir de los aislamientos obtenidos de frutos y hojas de maracuyá, se sembró en total 24 cajas de Petri, después de 5 días de incubación fueron observadas, y se realizó una selección inicial de colonias respecto a su forma, coloración y morfología celular. Posteriormente se logró obtener 8 cepas puras de levaduras que crecieron de manera óptima en medio agar YGC a 27°C.

De estas, 5 cepas fueron obtenidas de frutos (M1-M5), y 3 de follaje (M6-M8). Del total de las levaduras aisladas de acuerdo a sus características a nivel macroscópico, las levaduras exhibieron rasgos similares en la forma, elevación, superficie, aspecto y color, y forma del margen de las colonias. A nivel microscópico, se observó formas de las células esféricas, oblongas y rectangulares (Tabla 3). Además se evidenció que la forma de reproducción asexual fue principalmente gemación simple, a excepción del M5 presento artroconidias, las cuales se forman por fragmentación de sus hifas verdaderas y estas se ven reflejadas en la morfología de su colonia, margen filamentososa y superficie rugosa, descripción de una especie posiblemente del genero *Geotrichum* (Tabla 3).

Tabla 3. Caracterización macroscópica y microscópica de cepas de levaduras, aisladas de frutos y follaje de maracuyá evaluadas después de cinco días de incubación.

MF	Forma	Margen	Elevación	Superficie	Aspecto	Color	Forma de la célula
M1	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Brillante	Blanca/Crema	Esférica
M2	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Brillante	Blanca	Esférica
M3	Circular	Lobulado	Convexa	Lisa	Brillante	Blanca/ Crema	Oblonga
M4	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Brillante	Blanca/Crema	Oblonga
M5	Circular	Filamentosa	Plana	Rugosa	Opaca	Blanca	Rectangular
M6	Irregular	Ondulado	Plana	Lisa	Opaca	Blanca/Crema	Esférica
M7	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Brillante	Beige	Oblonga
M8	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Opaca	Blanca/Crema	Esférica

Los resultados obtenidos en este estudio tienen similitud a los reportados por Uribe *et al.*, 2007, los cuales caracterizaron las levaduras nativas en cultivos de mora de Castilla en la Provincia del Tequendama-Cundinamarca, donde seleccionaron 47 aislamientos de morfotipos diferentes y estos presentaron colonias de color blanco, crema, rosadas, con forma regular, redondeadas, aspectos opacos y brillantes, así como también de elevación convexa o umbilicada.

Trujillo & Echeverry (2015), en la ciudad de Neiva, aislaron y caracterizaron levaduras presentes en el fruto de pomarrosa durante las dos épocas de alta producción del año. En las cuales identificaron 20 morfotipos con formas de colonias circular e irregular, borde entero u ondulado, elevación con variación (convexa, cóncava y plana), y donde 13 de los aislamientos presentaron coloración blanca. A nivel de morfología celular, reportaron levaduras elípticas, u ovoides, en estado de gemación con un solo brote en el ápice, así como también formación de pseudohifas.

De igual manera Gaviria & Osorio (2012), al estudiar la diversidad de levaduras asociadas a inflorescencias de Mango y Flores de Lulo, obtuvieron 96 aislados, y del total de levaduras, el morfotipo dominante presento rasgos como colonias de color blanco, circulares, margen entero y de elevación convexa. Liu *et al.*, (2013), señala que las levaduras se establecen de una forma natural y endémica en el filoplano de los frutos, así como también se pueden aislar de hojas, flores y de la superficie del suelo.

Por otro lado, aunque las características macroscópicas y microscópicas descritas de las levaduras aisladas en este estudio, no son base suficiente para identificarlas a nivel de especie, se puede inferir que posiblemente pertenezcan a los géneros de levaduras reportadas en los trabajos anteriores como: *Candida*, *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Pseudozyma*, *Rhodotorula*, *Geotrichum*, entre otras.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGONISTA FRENTE A *Colletotrichum sp.*

Prueba de antagonismo levadura-patógeno *in vitro*

En la prueba de antagonismo *in vitro*, se evaluó 8 cepas de levaduras, cada una de ellas consistió en un tratamiento independiente. Como se observa en la figura 1, los tratamientos inhibieron el crecimiento micelial de *Colletotrichum sp.*, en un rango de 27-54,8 %.

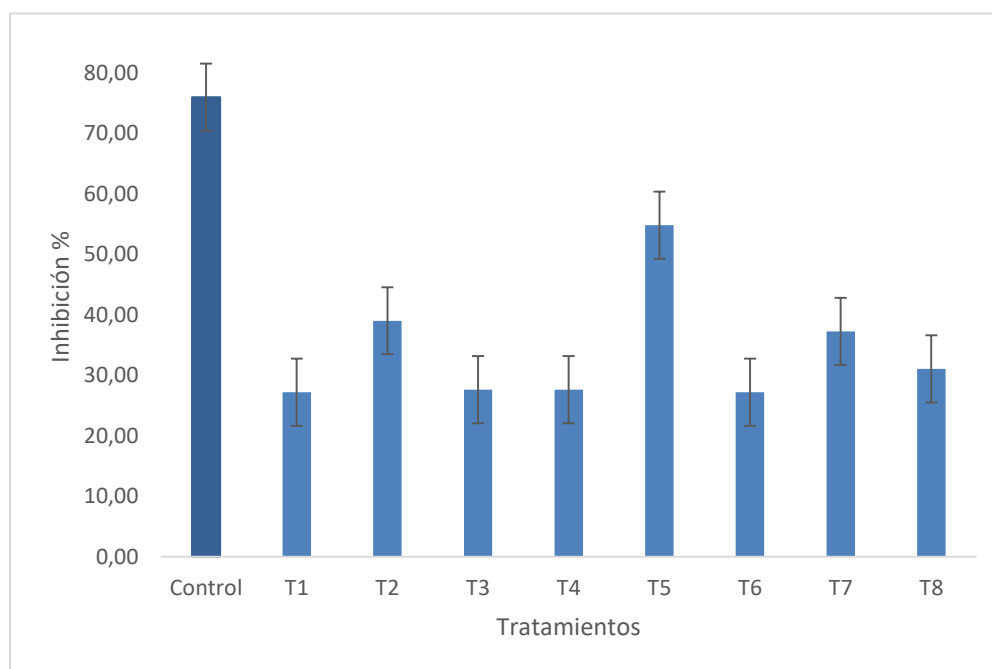


Figura 1. Resultados de la actividad antagonista *in vitro* de aislamientos de levaduras antagonistas frente a *Colletotrichum sp.* En el ANOVA ($F= 10,599$; $gl=8,18$), la mayoría de los tratamientos, a excepción del tratamiento 5, mostraron diferencias significativas ($P<0,05$) con el control, mientras que el T5 las presentó con T1, T3, T4, T6 y T7.

Según Okigbo y Emeka (2010), los tratamientos T1 a T8 (inhibición del 27-39%) presentaron antagonismo moderadamente efectivo (>20-50 % inhibición), a excepción del tratamiento T5, se consideró antagonismo efectivo (>50-<100 % inhibición) con una reducción del crecimiento micelial en un 54,8 %.

Aunque se desconoce los mecanismos de acción de las levaduras antagonistas evaluadas, en los resultados de la prueba *in vitro* no se detectó algún tipo de compuesto difusible o volátil en el medio, por lo que se descarta la antibiosis y se sugiere otros

mecanismos utilizados por las levaduras antagonistas: como se observa en la figura 2, el tratamiento T5, posee un crecimiento filamentososo lo que posiblemente provoco reducción del área disponible y derivado de ello menor disponibilidad de nutrientes para el crecimiento del hongo fitopatógeno, lo cual se constituye en una interacción por competencia. En el caso de los tratamientos T2 y T7, el hongo patógeno se expandió casi cerca del límite externo de las estrías de crecimiento de las levaduras, por lo que probablemente existió una interacción micoparasitaria o fungistática frente a *Colletotrichum* sp.

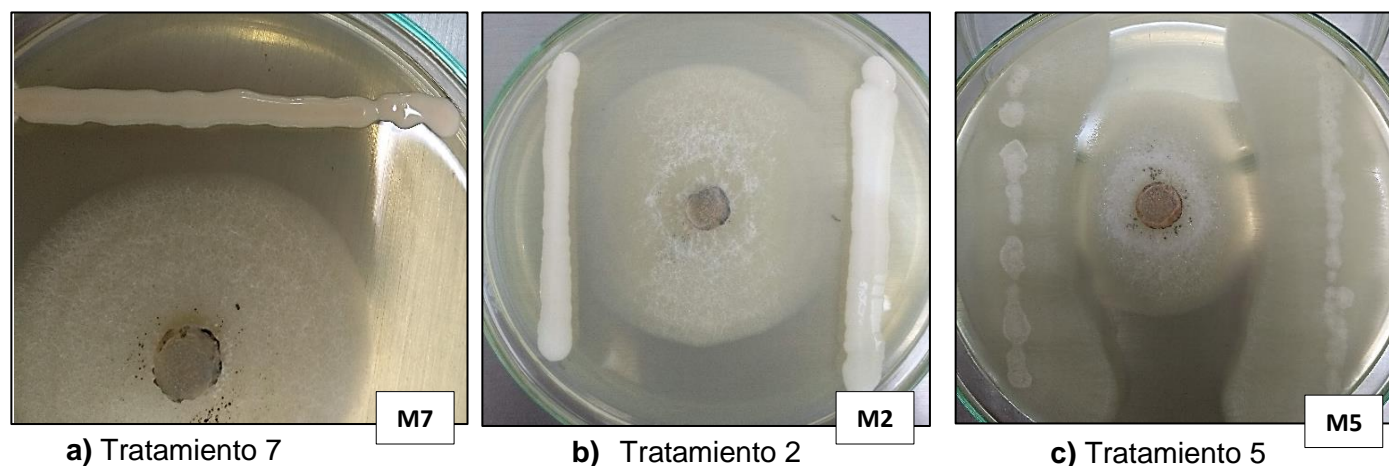


Figura 2. Antagonismo *in vitro* contra *Colletotrichum* sp. en medio de cultivo PDA. a-b) Crecimiento micelial hasta el límite de las estrías de la levadura c) Inhibición del hongo levaduriforme frente *Colletotrichum* sp. Fuente: Autora, 2018.

A partir de los porcentajes de inhibición obtenidos se seleccionaron los tratamientos T7, T2 y T5 (figura 1) por presentar mayor actividad antagonista, lo cual concuerda con lo reportado por Campos-Martinez *et al.*, (2016) donde a partir de frutos y hojas de aguacate (*Persea americana* Mill.) aislaron *Candida intermedia* y *Wickerhamomyces anomalus*, y siendo ésta, la mejor antagonista con un porcentaje entre el 22-35% de reducción en el crecimiento micelial de *Colletotrichum gloesporoides*. De igual manera se obtuvieron resultados similares por Cifuentes *et al.*, (2016), reportando tres especies de levaduras con morfología similar al género *Candida* sp., aisladas de diferentes superficies de frutos cultivados en Ecuador (mora, banano, piña y pitahaya amarilla), y estas presentaron un rango de inhibición del 50-58 % contra *Colletotrichum* sp.

Al estudiar los mecanismos empleados por *Debaryomyces hansenii*, en el control biológico de antracnosis en frutos de papaya (*Carica papaya* L.), se evidencio que el porcentaje de inhibición a nivel *in vitro* fue del 16 al 36% (Hernandez-Montiel *et al.*, 2018).

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LEVADURAS ANTAGONISTAS FRENTE A *Colletotrichum* sp.

En la tabla 4, se pueden observar las descripciones macroscópica y microscópicas de las levaduras M7, M2 y M5 que demostraron en condiciones *In vitro* capacidad antagonista hacia *Colletotrichum* sp. Aunque las descripciones no son suficientes para identificar a nivel de especie las levaduras, se encontraron algunos rasgos distintivos en cuanto a morfología de colonia y forma celular.

Tabla 4. Caracterización macroscópica y microscópica de las levaduras antagonistas contra *Colletotrichum* sp.

Morfotipo	Descripción de la colonia	Morfología celular
M 7	Colonia circular, borde entero, elevación convexa, superficie lisa brillante, consistencia cremosa, color blanco beige y olor característico a fermentación.	Levadura oblonga, algunas de gran tamaño y con gemación simple.
M 2	Colonia circular con crecimiento concéntrico, borde entero y traslucido, elevación convexa, superficie lisa brillante, consistencia cerosa, color blanco y olor característico a fermentación.	Levadura esférica, con gemación simple.
M 5	Colonia irregular, borde filamentosa, elevación plana, superficie rugosa y opaca, color blanco y olor característico de fermentación. Hongo levaduriforme posiblemente del género <i>Geotrichum</i> .	Hongo levaduriforme con micelio verdadero y arthroconidias rectangulares.

Curvas de crecimiento

En la figura 3, se presentan las curvas de crecimiento de los morfotipos M7, M2 y M5 que presentaron mayor actividad antagonista frente a *Colletotrichum* sp. A partir de un inoculo inicial de 24 h, se realizó el seguimiento de las curvas de crecimiento cuantificando el incremento celular por absorbancia a 540 nm hasta las 28 horas.

En vista de que el inoculo inicial se tomó en un estado de alta actividad metabólica se pudo reducir la fase de latencia. El crecimiento en las primeras horas varió debido a la heterogeneidad de las condiciones fisiológicas de las células, provenientes de este periodo, característico por la adaptación de las células al medio y un bajo incremento en el número de sus células (Tortora *et al.*, 2007).

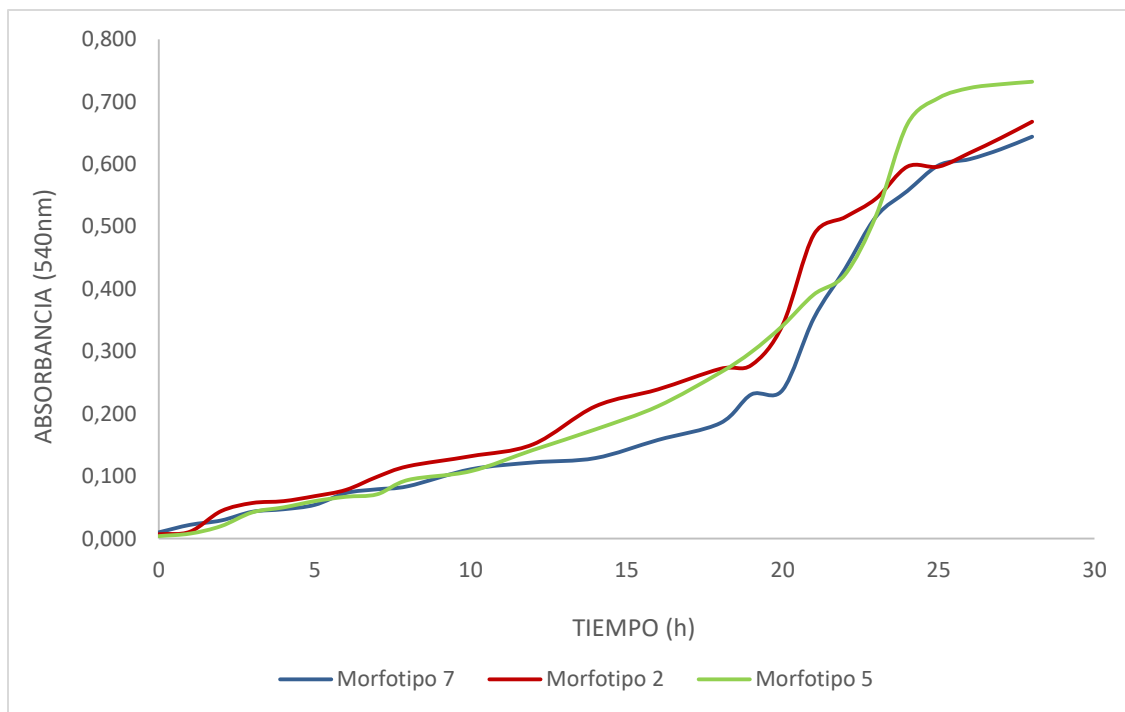


Figura 3. Curvas de crecimiento de las levaduras antagonistas analizadas en función del tiempo (horas) durante 28 horas de incubación.

La fase exponencial, inició cerca desde la hora 10 hasta la hora 22 (figura 4), con tasas de crecimiento para los morfotipos M5 y M7 de $0,15 \text{ h}^{-1}$ y morfotipo M2 de $0,16 \text{ h}^{-1}$. El mayor crecimiento se observó a la hora 24 para M5 y en el caso de M2 y M7 a la hora 28.

Por otro lado, al comparar los resultados obtenidos con microorganismos de referencia en este caso *Saccharomyces cerevisiae*, se encontró que Aguilar *et al.*, (2015) reportan la fase de latencia de aproximadamente 4 horas, y señala cambios en el crecimiento respecto al tiempo a partir de las 17 horas, donde ya no se evidencia el aumento celular (periodo estacionario). Pero Buitrago y Tenjo (2007), observaron que desde la hora 16 *Saccharomyces cerevisiae* entra en fase estacionaria, además mencionan que desde las cero horas hasta las 8 horas, la fuente de carbono inmediata en el medio se agota, explicando la declinación en el crecimiento y los tiempos que se toma en alcanzar la fase estacionaria.

Caracterización fisiológica

Las levaduras más promisorias con actividad antagonista (M7, M2 y M5) frente a *Colletotrichum* sp, fueron sometidas a pruebas fisiológicas tales como diferentes rangos de pH (3 a 7), temperaturas entre 5-45 °C y diferentes concentraciones de NaCl (1%, 5%, 10% y 15%).

Prueba de pH

El efecto del pH en el crecimiento de las levaduras se puede observar en la figura 4, encontrando que al comparar los valores de crecimiento de los tres morfotipos M7, M2 y M5, difieren en su pH óptimo de crecimiento, el cual se registró en un rango de pH entre 3 a 5, y que además los tres morfotipos fueron tolerantes a todos los valores de pHs evaluados, lo cual concuerda con el análisis de varianza, al no existir diferencias significativas entre los tratamientos, y tampoco suficiente evidencia, para afirmar que alguno de los valores de pH tiene mayor efecto sobre el crecimiento.

De acuerdo a la figura 4, el morfotipo M7, exhibió su máximo crecimiento con un valor de absorbancia de 0,133 en el pH 5, siendo este su óptimo de crecimiento. A comparación del morfotipo M2, su máximo crecimiento fue en pH 3 con un valor de absorbancia de 0,891, por lo tanto, su óptimo de crecimiento. Sin embargo el crecimiento de esta levadura fue inversamente proporcional al aumento del pH, así al aumentar el valor de pH disminuyo el crecimiento, obteniéndose el valor más bajo de absorbancia de 0, 429 en pH 7 o neutro (Figura 4).

El máximo crecimiento para el morfotipo M5 se evidencio en pH 4 con un valor de absorbancia de 0,981, sin embargo no hubo restricción de su crecimiento en los rangos de pH 3, 5, 6 y 7, los cuales obtuvieron valores de absorbancia relativamente menores, comparados al de su óptimo de crecimiento (Figura 4).

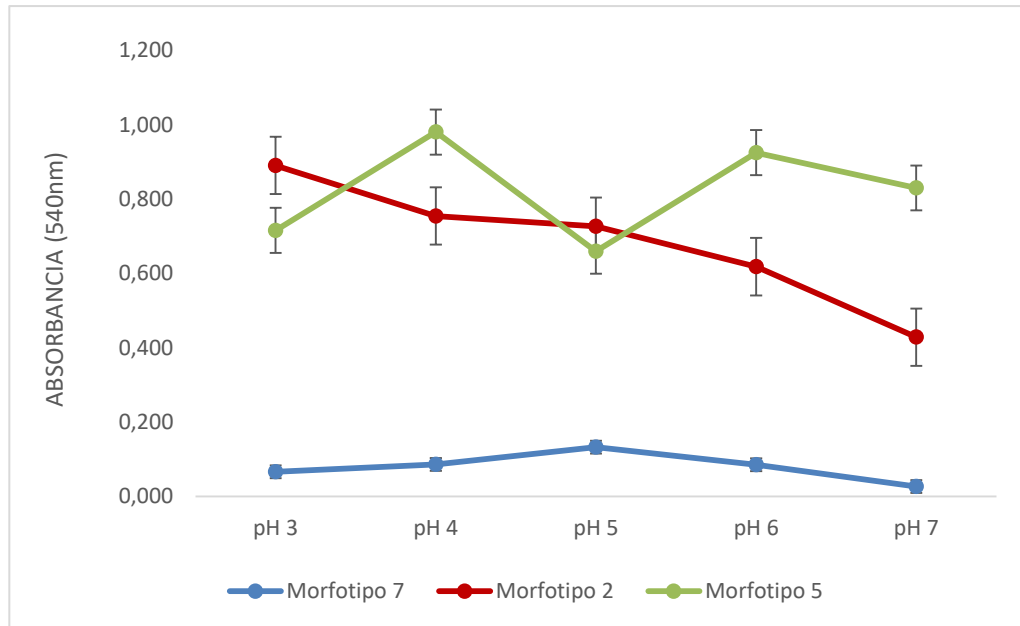


Figura 4. Comportamiento general del crecimiento de los morfotipos de levaduras antagonistas M7, M2 y M5 sometidos a diferentes rangos de pH. En el ANOVA ($F= 0,292$; $gl=4,40$), las medias de los tratamientos no presentaron diferencias significativas ($P>0,05$).

A pesar de que las levaduras prefieren ambientes acidófilos, la capacidad de crecimiento a pH neutro se evidencio en los tres morfotipos, lo cual concuerda con Medina y colaboradores (2009), quienes obtuvieron diez levaduras de cultivos de mora y estas fueron tolerantes en un rango de pH de 3 a 9, prefiriendo como su óptimo el pH 7. Por otro lado, al evaluar cepas de *Pichia onychis* y *Rhodotorula glutinis* se evidencio que el pH entre 3 a 9 no afecto su crecimiento (Zapata *et al.*, 2010).

Para el caso del morfotipo M5 (hongo levaduriforme posiblemente del genero *Geotrichum* sp.) se evidencio su tolerancia a un amplio rango de pH, este comportamiento concuerda con lo investigado en la revisión de Boutrou y Guéguen (2005), donde señalan que este género puede crecer en un rango de pH: entre 3 a 11, y en la fase de latencia entre 3.5 a 9, y con un óptimo de crecimiento entre 5.5-6.0 o 6.0-7.0.

Prueba de termotolerancia

Al evaluar el crecimiento de los tres morfotipos M7, M2 y M5 a diferentes temperaturas, se evidenció, primero que el crecimiento estuvo afectado de forma directa con la disminución o aumento de la temperatura y segundo que las levaduras crecieron desde los 5 a 45°C, con un óptimo de crecimiento a los 30°C (Figura 5).

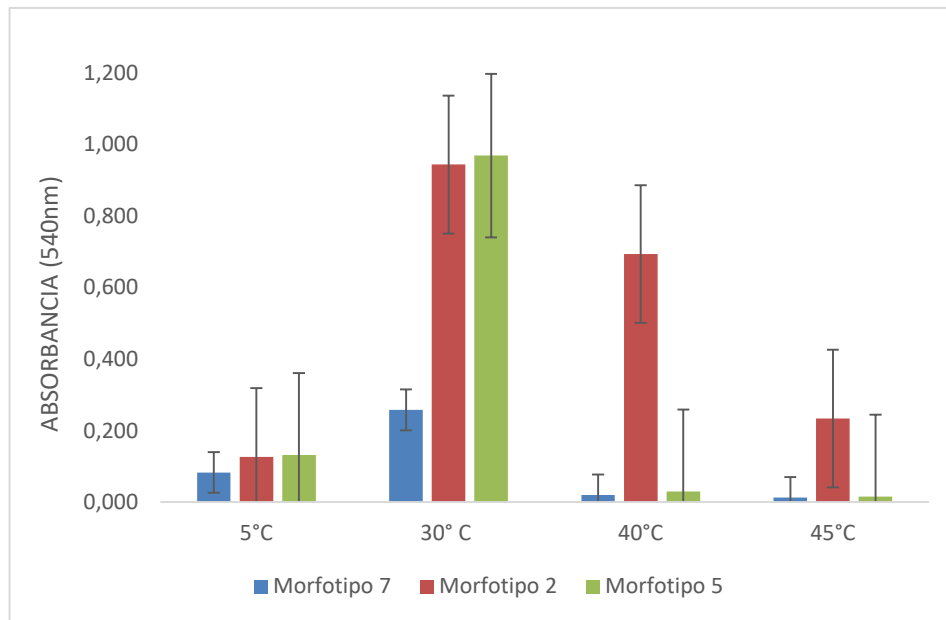


Figura 5. Comportamiento general del crecimiento de los morfotipos M7, M2 y M5 sometidas a diferentes condiciones de temperatura. En el ANOVA ($F= 11,417$; $gl=3,3$), las medias de los tratamientos presentaron diferencias significativas ($P<0,05$), entre la temperatura de 30°C y las temperaturas 5, 40 y 45 °C.

A 5°C, los morfotipos M2 y M5 con valores de absorbancia de 0,126 y 0,132 se desarrollaron mejor que el morfotipo M7 con un valor de absorbancia de 0,083. En las temperaturas de 40 y 45°C, el morfotipo M2 se destacó con el mejor crecimiento, obteniendo valores de absorbancia para 40°C de 0,694 y para 45°C de 0,234 a diferencia de lo ocurrido con los morfotipos M7 y M5 que obtuvieron valores más bajos, donde los valores máximos de absorbancia fueron 0,020 para 40°C y 0,030 para 45°C (Figura 5). Es necesario aclarar que la interrupción constante de energía eléctrica en el laboratorio y por ende, el cambio de las condiciones de los tratamientos, favorecieron el crecimiento en las temperaturas 5, 40 y 45°C, lo que llevaría a que estos datos no sean concluyentes.

De acuerdo a los resultados los morfotipos M7, M2 y M5 exhibieron su óptimo de crecimiento a 30 °C (Figura 5), concuerda con los reportado por Zapata et al., (2011) quienes evidenciaron el crecimiento optimo entre 25°C a 30°C de *Pichia onychis* y *Rhodotorula glutinis*, y Rodriguez (2006), encontró que más del 50% de las levaduras aisladas tuvieron un óptimo de crecimiento entre 28 a 30°C.

La tolerancia del morfotipo M2 a 40 y 45 °C, indican su alta tolerancia térmica, y es similar a lo reportado por Uribe (2007), donde la levadura CTS022A creció a 40 y 45 °C con valores de absorbancia respectivamente de 0,565 y 0,399. Boutrou y Guéguen (2005), respaldan el amplio rango de tolerancia del Morfotipo M5 (*Geotrichum* sp.) de 5° a 38°C con un óptimo de crecimiento alrededor de 25° C.

Prueba de tolerancia a NaCl (Osmotolerancia)

Al evaluar el crecimiento de los tres morfotipos M7, M2 y M5 a diferentes concentraciones de sal, se evidencio, primero que las concentraciones 10% y 15%, afectaron en gran medida el crecimiento comparado con el control, y segundo que el mejor desarrollo de las cepas se observó en los tratamientos 1% y 5 %, donde se destacó el morfotipo M2 con una absorbancia de 1,013 a 1% y 0,301 para 5%, seguido del morfotipo M5 y M7 para ambas concentraciones (Figura 6).

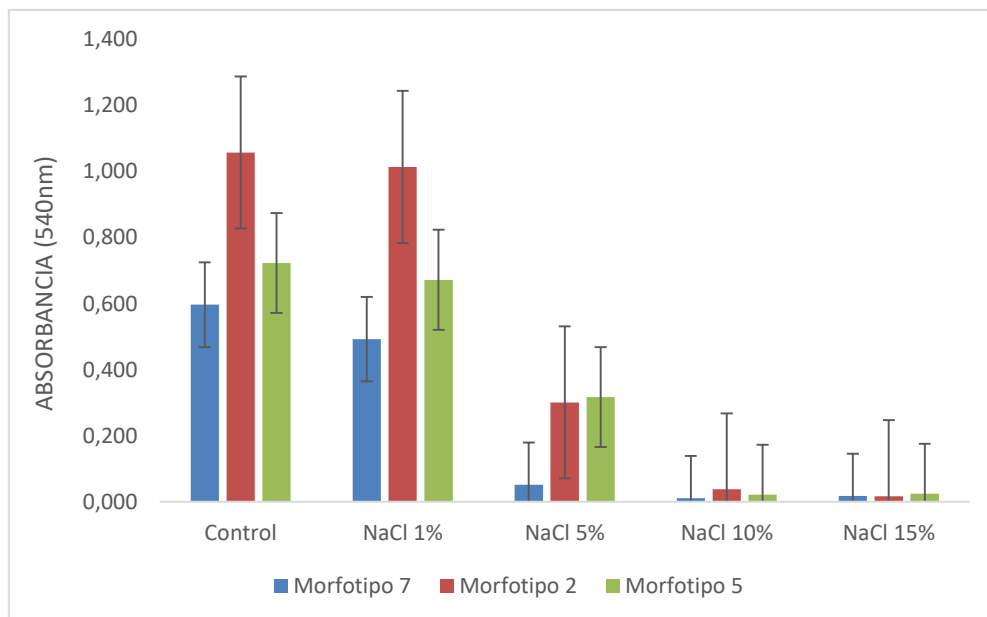


Figura 6. Comportamiento general del crecimiento de los morfotipos M7, M2 y M5 sometidos a diferentes concentraciones de NaCl. En el ANOVA ($F= 42,316$; $gl=4,40$), las

medias de los tratamientos mostraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre el Control y las concentraciones 5%, 10% y 15%, a excepción del tratamiento al 1 %, el cual se agrupo con las otras concentraciones.

Fue evidente que la disminución del crecimiento de los morfotipos M7, M2 y M5, estuvo relacionada a las elevadas concentraciones de sal en el medio, y condujeron al estrés osmótico por pérdida de agua. Esta respuesta fue similar a lo observado por Sanclemente (2015) donde el 42 y el 88 % de los aislamientos provenientes de frutos de Lulo y Borojón, no presentaron tolerancia a concentraciones de NaCl al 10 y 15 %.

Es de destacar que el morfotipo M2, presento, en general, el mejor desarrollo frente al control y las concentraciones de NaCl al 1 y 5%, posiblemente por 1) la relación de sal intracelular de las levaduras, donde se asume la concentración de 0,9 % de forma que las células estuvieron en un medio relativamente idóneo (isotónico), y por ende no hubo estrés osmótico. 2) mecanismos utilizados en la mitigación de pérdida de agua y la estimulación de rutas de señalización que tienen como fin, abastecer y compensar la célula con agua proveniente de las vacuolas (Mager y Siderius, 2002).

Boutrou y Guéguen (2005), indican que el género *Geotrichum*, es sensible a la sal y su rango máximo es de 1 y 2.5%, aunque señala que cepas aisladas de quesos a base de leche de cabra, tienen un buen crecimiento al 5% de NaCl, comportamiento similar del morfotipo M5 donde obtuvo el segundo mejor crecimiento al 1% y tolero el NaCl al 5%.

Prueba de asimilación de fuentes de carbono, capacidad fermentativa y compuestos nitrogenados

Asimilación de fuentes de carbono

En la figura 7, se puede observar que los tres morfotipos tuvieron capacidad de crecer en todas las fuentes de carbono, con preferencia por carbohidratos tipo disacáridos, en especial por sacarosa, maltosa y lactosa. Mientras que en monosacáridos el crecimiento se evidencio en glucosa, fructosa, galactosa y por ultimo xilosa, los cuales son azúcares frecuentes en las frutas (Coquet *et al.*, 1994; Cataldi *et al.*, 1998).

El morfotipo M2, obtuvo mejor crecimiento en sacarosa, maltosa y lactosa con valores de absorbancia de 1,005, 0,532 y 0,209. Mientras que el desarrollo menos eficaz, se evidencio en los monosacáridos como xilosa, fructosa, galactosa y glucosa, donde el caso del crecimiento en xilosa fue casi nulo con un valor de absorbancia de 0,005.

En cuanto al morfotipo M7, se observó el mejor crecimiento en los disacáridos: sacarosa, maltosa y lactosa con valores de absorbancia respectivamente de 1,224, 0,904 y 0,747. A comparación de los monosacáridos donde el crecimiento en fructosa y glucosa tuvieron valores superiores a 0,4 y menor a este valor, galactosa y xilosa con valores de absorbancia de 0,098 y 0,038.

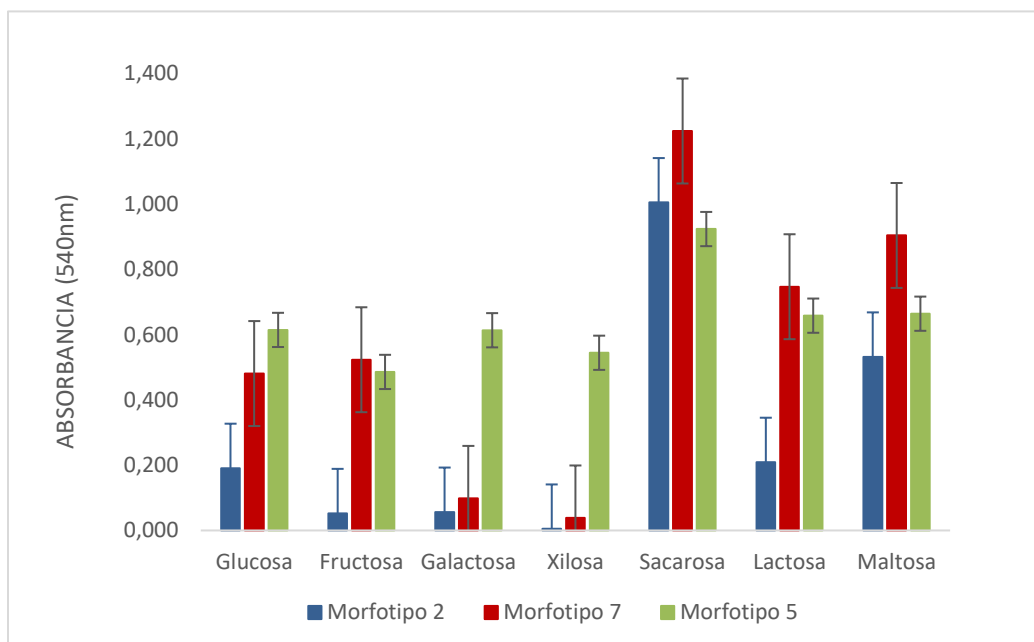


Figura 7. Comportamiento general del crecimiento de los morfotipos M7, M2 y M5 sometidas a diferentes fuentes de Carbono. En el ANOVA ($F=8,397$; $gl=4,40$), las medias de los tratamientos presentaron diferencias significativas ($P<0,05$)

De los tres morfotipos, el M5 se destaca por su asimilación eficiente en todas las fuentes de carbono evaluadas, donde el comportamiento de acuerdo al mejor crecimiento lo obtuvo en los disacáridos y especialmente sacarosa, seguido de maltosa y lactosa. En general obtuvo valores de absorbancia superiores a 0,5 para el crecimiento en monosacáridos, resaltando glucosa y galactosa.

Capacidad fermentativa

En la tabla 5, se puede evidenciar que los tres morfotipos M7, M2 y M5 tienen capacidad fermentativa. El morfotipo M2, dio positivo para glucosa y sacarosa, sin embargo en xilosa no se pudo determinar la fermentación. Mientras que el morfotipo M7, presentó fermentación para glucosa, fructosa, xilosa, sacarosa y maltosa. Por último el morfotipo M3, indicó positivo para glucosa, fructosa y sacarosa.

Tabla 5. Perfil de fermentación de los morfotipos M7, M2 y M5 en diferentes fuentes de carbono.

PRUEBA	Morfotipo 7	Morfotipo 2	Morfotipo 5
Capacidad Fermentativa			
Glucosa	+	+	+
Fructosa	-	+	+
Galactosa	-	-	-
Xilosa	NO	+	-
Sacarosa	+	+	+
Lactosa	-	-	-
Maltosa	-	+	-

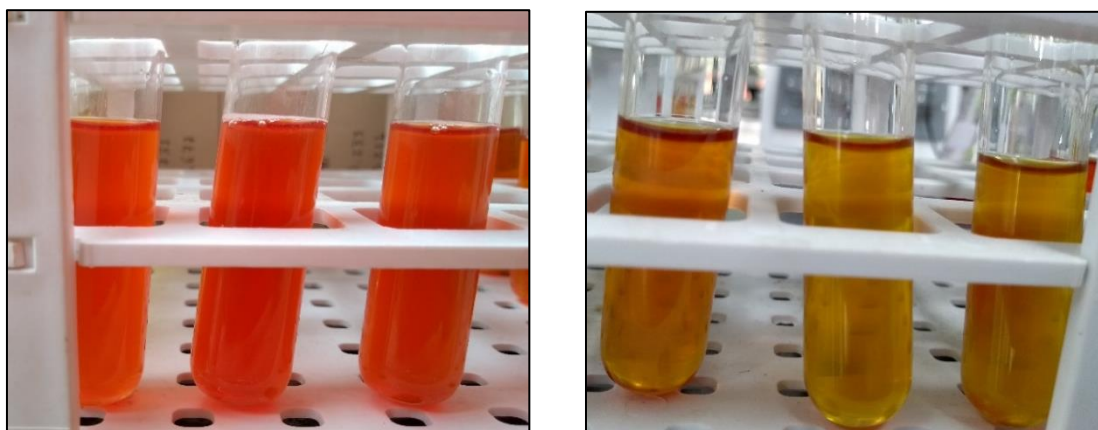


Figura 8. Capacidad fermentativa del morfotipo M2: fermentación positiva, coloración roja y negativa, coloración amarilla.

Asimilación de compuestos nitrogenados

Se pudo observar que las levaduras crecieron en las dos fuentes de nitrógeno, presentando mejor crecimiento en Peptona que en Nitrato de potasio (KNO_3). Sin embargo, el morfotipo M7, no presentó un buen desarrollo en ninguno de los compuestos nitrogenados, obteniendo su máximo de crecimiento en medio con Nitrato de potasio y de luego, peptona, con valores de absorbancia respectivamente de 0,076 y 0,106.

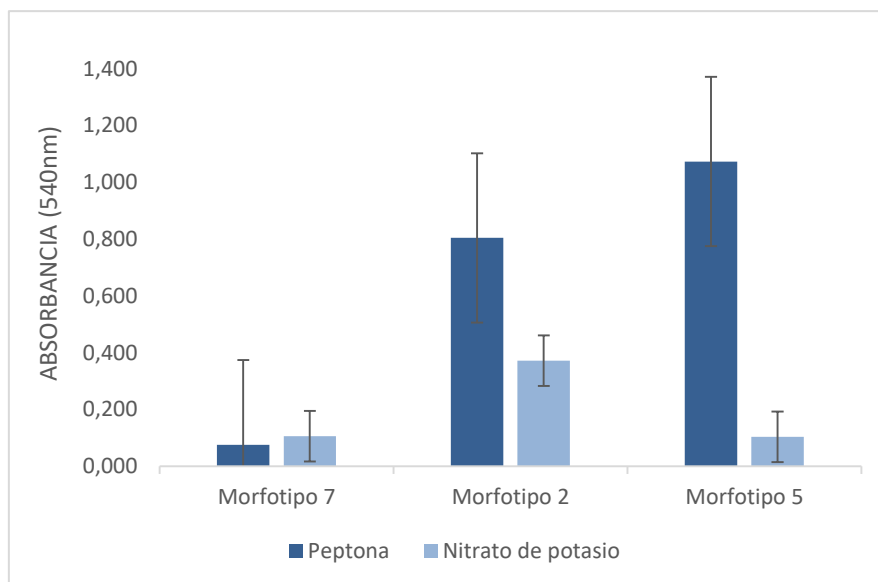


Figura 9. Comportamiento general del crecimiento de los morfotipos M7, M2 y M5 sometidas a diferentes fuentes de Nitrógeno.

Por otro parte, los morfotipos M2 y M5, crecieron eficazmente en medio con peptona presentando los valores más altos de absorbancia de 0,805 y 1,074. A comparación del crecimiento en Nitrato de potasio con valores de absorbancia respectivamente 0,372 y 0,104. Guerrero *et al.*, (2004) encontró que después de diez días de inoculación *Candida oleophila* y *Rhodotorula muculaginoso* presentaron un ligero crecimiento en KNO_3 utilizándolo como fuente de nitrógeno y señala que las levaduras prefieren fuentes orgánicas de nitrógeno como peptona, caseína y extracto de levadura, lo cual indica que no afectan la incorporación de fertilizantes nitrogenados por parte de la planta.

Prueba de exoglucanasas, endoglucanasas y peroxidasas

En la tabla 6, se puede observar los resultados de las pruebas en la detección de la actividad enzimática, donde los tres morfotipos crecieron en los medios para exo y endoglucanasas, pero no se evidenció crecimiento en el medio para peroxidasas. Respecto a la actividad, no se presentó una hidrólisis completa del indicador sobre la carboximetilcelulosa y papel filtro, lo cual se consideró una respuesta positiva leve. De igual manera, esta baja actividad enzimática sobre sustratos lignocelulósicos, no indica que puedan causar daños y ser inocuas para las plantas.

Tabla 6. Perfil de las prueba de exoglucanasas, endoglucanasas y peroxidadas de los morfotipos M7, M2 y M5.

PRUEBA	Morfotipo 7	Morfotipo 2	Morfotipo 5
Exoglucanasas	+L	+L	+L
Endoglucanasas	+L	+L	+L
Peroxidasas	-	-	-



Figura 10. Resultados de las pruebas de exoglucanasas, endoglucanasas y peroxidadas de los morfotipos M7, M2 y M5 de levaduras antagonistas.

En los últimos veinte años, el control biológico ha sido una alternativa para el tratamiento de enfermedades causadas por patógenos en cultivos y frutales de interés económico. Parte de su esencia es buscar y estudiar microorganismos potenciales como bacterias, levaduras y hongos con la capacidad de biocontrolar enfermedades en campo y postcosecha, sin el manejo de productos químicos, los cuales acarrear actualmente una serie de causas negativas en la salud humana y en la resistencia del patógeno (Droby *et.*, 2009, Alavanja *et al.*, 2013).

En vista a lo anterior, este trabajo tuvo como objetivo, la caracterización fenotípica de levaduras epifitas con potencial de inhibir a *Colletotrichum* sp en pruebas *in vitro*. Entre los resultados obtenidos, se evidencio la reducción del crecimiento micelial de *Colletotrichum* sp. en un 37 al 54,8 % a nivel *in vitro* por tres morfotipos de levaduras (M7, M2 y M5) donde según Okigbo y Emeka (2010) se considera antagonismo moderadamente efectivo (>20-50 % inhibición). La similitud de estos resultados concuerda con Castro & Franco (2017), quienes comprobaron la actividad antagonista *in vitro*, frente

a *Colletotrichum asianum*, *Colletotrichum theotrombicola* y *Colletotrichum tamarilloi*, por acción de tres levaduras, dos de las cuales fueron aisladas de tomate de árbol (*Galactomyces candidum* y *Meyerozyma guilliermondii*), y la tercera cepa proveniente de uchuva, donde estas presentaron compuestos difusibles en el medio, causando la reducción del crecimiento de los hongos fitopatógenos en un 30 al 40%.

Aunque se desconoce los mecanismos de acción utilizados por los tres morfotipos (M2, M7 y M5), posiblemente existió competencia por espacio y nutrientes, y micoparasitismo. Sin embargo, han reportado que *Candida oleophila*, *Rhodotorula glutinis*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia membranaefaciens* y *Cryptococcus albidus* presentan compuestos volátiles en el medio, producción de enzimas líticas, parasitismo, competencia por espacio y nutrientes, y recientemente toxinas *killer*, frente al control *in vitro* como *in vivo* de *Colletotrichum* ssp (Saligkarias *et al.*, 2002; Quin *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013).

De los tres morfotipos (M7, M2 y M5), se desconoce la especie, sin embargo, el morfotipo M5, posiblemente pertenece al género *Geotrichum*. Una de las especies de este género, *Geotrichum citri-aurantii*, causa pudrición ácida, enfermedad muy común en los cultivos de cítricos (Hernández *et al.*, 2011). De forma que esta sería una desventaja al momento de selección de un agente de biocontrol, no obstante, Castro & Franco (2017), reportaron que *Galactomyces candidum*, teleomorfo de *Geotrichum candidum*, funciona como un agente antagonista frente a *C. gloeosporioides*.

Es necesario que el agente de biocontrol tenga la capacidad de desarrollarse en las mismas condiciones del patógeno como en la superficie de hojas y frutos. En este sentido, los parámetros como la actividad de agua (A_w), temperatura, pH y tolerancia a UV, son al fin de cuentas los que determinan el crecimiento y la colonización de los microorganismos en sus ambientes. Para analizar la potencial eficacia de estos tres morfotipos como agentes de biocontrol en campo y poscosecha, se realizó la caracterización fisiológica usando criterios de tolerancia a pH, temperatura, osmotolerancia, crecimiento y capacidad fermentativa en compuestos carbonados y por último actividad de peroxidasas, exo y endoglucanasas.

A partir de estas pruebas, se encontró que los tres morfotipos (M7, M2 y M5) tuvieron la capacidad de crecer desde pH 3 a hasta pH 7, con su óptimo de crecimiento en un rango de pH de 3-5, con preferencia a los ambientes acidófilos. Distintivo para un agente de

biocontrol a nivel de cosecha y post-cosecha, ya que se ha evidenciado que una gran variedad de frutas tienden acidificarse al ocurrir algún daño en los tejidos superficiales (Teixido *et al.*, 1998), además las condiciones de producción del maracuyá y su jugo son ácidos (Cruz *et al.*, 2010; Sindoni *et al.*, 2012; Bentancurt *et al.*, 2014).

En cuanto a la termotolerancia, los morfotipos M7, M2 y M5, tuvieron su óptimo de crecimiento a 30°C, y se destaca el moderado desarrollo a 40 y 45°C del morfotipo M2. Swan *et al.*, (1997), señala que los microorganismos incluyendo las levaduras, regulan la composición de ácidos grasos en respuesta a las altas temperaturas, con el fin de obtener una fluidez óptima entre el interior y el exterior de las célula. Lo que indica que el morfotipo M2 estaría mejor adaptada a temperaturas altas, el cual juega un papel importante en su uso como agente de biocontrol (Guerrero *et al.*, 2004).

La osmotolerancia, fue un factor clave en el crecimiento de las levaduras, debido a que las altas concentraciones de sal limitaron el crecimiento. Siendo únicamente tolerantes a concentraciones de sal al 1 y 5%, en este sentido, es necesario seleccionar levaduras con buena repuesta al estrés osmótico como por ejemplo el M2, ya que las plantas, presentan ambientes cambiantes en términos de disponibilidad de agua, y esto determina su potencial en campo (Medina *et al.*, 2009). Por otra parte, el hecho que las levaduras no puedan crecer en concentraciones elevadas de sal, indica que no pueden contaminar de manera secundaria los productos industriales derivados del maracuyá en la planta de procesamiento, lo cual es una ventaja para el manejo poscosecha de los frutos (Sanclemente, 2015).

Los tres morfotipos (M7, M2 y M5), crecieron en todas las fuentes de carbono evaluadas con mayor asimilación de disacáridos que monosacáridos. Lo que señala una característica importante para el desempeño como antagonista, frente a la competencia por sustratos (Elad *et al.*, 1994). Bautista *et al.*, (2013), observaron que *Meyerozyma caribbica*, manifestó diferentes niveles de competencia por nutrientes, con mejor asimilación por sacarosa y fructosa, utilizando esta ventaja en la reducción del crecimiento hacía *C. gloeosporioides*. Es de resaltar que los tres morfotipos de levaduras antagonistas, se desarrollaron mejor en fuentes orgánicas de nitrógeno como la peptona por su alto contenido de aminoácidos libres, esenciales para su crecimiento y que no compiten con los requerimientos nutricionales de las plantas.

CONCLUSIONES

Los resultados indican que la levadura **M2** es un agente biocontrolador promisorio para la prevención de la antracnosis en maracuyá cultivado en agro ecosistemas de la Orinoquía por presentar: capacidad antagonista *in vitro* frente a *Colletrotrichum sp.*, crecimiento en pH ácidos, altas temperaturas y estrés osmótico, desarrollo aeróbico y anaeróbico en diferentes carbohidratos simples, además de baja actividad enzimática sobre sustratos lignocelulósicos, lo cual indica que posiblemente es inocua para las plantas, esto será confirmado con su identificación taxonómica molecular por medio de secuenciación de regiones ITS en Corpogen.

BIBLIOGRAFÍA

- Aktar, W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary toxicology*, 2(1), 1-12.
- Alavanja, M. C., Ross, M. K., & Bonner, M. R. (2013). Increased cancer burden among pesticide applicators and others due to pesticide exposure. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 63(2), 120-142.
- Álvarez-Martín, P., Flórez, A. B., López-Díaz, T. M., & Mayo, B. 2007. Phenotypic and molecular identification of yeast species associated with Spanish blue-veined Cabrales cheese. *International dairy journal*, 17(8), 961-967.
- Aguilar, J., Espinoza, M., & Cabanilla, J. (2015). Evaluación de la cinética de crecimiento de *saccharomyces cerevisiae* utilizando un medio de cultivo a base de melaza de caña y suero lácteo. *Agroindustrial Science*, 5(1), 37-47.
- Aquihuatl Ramos, M. A., y Pérez Chabela, M. L. 2004. Manual de prácticas del Laboratorio de Microbiología General. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México. Departamento de Biotecnología. 116 p.
- Bautista, P., Calderon, M., Servin, R., Ochoa, A., Vazquez, R., Ragazzo, J. (2014). Biocontrol action mechanisms of *Cryptococcus laurentii* on *Colletotrichum gloeosporioides* of mango. *Crop protection* 65: 194-201.
- Bautista, P. U., Calderon, M., Servín, R., Ochoa, N. A., & Ragazzo, J. A. (2013). Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. *Biological control*, 65(3), 293-301.
- Bi, Y., Guo, W., Zhang, G. J., Liu, S. C., & Chen, Y. (2017). First Report of *Colletotrichum truncatum* Causing Anthracnose of Strawberry in China. *Plant Disease*, 101(5), 832-832.
- Bale, J. S., Van Lenteren, J. C., & Bigler, F. (2007). Biological control and sustainable food production. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1492), 761-776.
- Betancurt, E., García, E., Giraldo, M., Quejada, O., Rodríguez, H., & Arroyave, I. (2014). Manual técnico del cultivo de maracuyá bajo buenas prácticas agrícolas. *Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA). Medellín-Colombia*.
- Bettiol, W., Rivera, M. C., Mondino, P., Montealegre, A. J. R., & Colmenárez, Y. C. (2014). Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe. *Facultad de Agricultura, Universidad de la República, Montevideo*.
- Boutrou, R., & Guéguen, M. (2005). Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *International journal of food microbiology*, 102(1), 1-20.

- Buitrago, J.; Tenjo, D. 2007. Evaluación de un sustrato vegetal obtenido a partir de residuos vegetales de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) con un consorcio celulítico. Trabajo de grado como requisito para optar el título de Microbiólogo. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia, p 120.
- Carris, L. M., Christopher, R. L & Carol, M. S. 2012. Introduction to Fungi. The *Plant Health Instructor*. [10 Octubre 2016] <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/pathogengroups/pages/introfungi.aspx>
- Castell, M., Escallon, M., Jimenez, P. 2009. Evaluación in vitro del efecto biocontrolador de levaduras aisladas de filoplano de *Physalis peruviana* Linneaus, 1783, (uchuva) sobre el hongo fitopatógeno *Alternaria* sp. Trabajo de grado como requisito para optar el título de Biólogo. Universidad Militar Nueva granada. Bogotá, Colombia. 63 p.
- Castro García, J. E., Defelipe, F., & Milena, J. (2017). Evaluación del potencial biocontrol de levaduras filósfericas en el crecimiento in vitro y desarrollo in planta del hongo fitopatógeno *colletotrichum* spp.(antracnosis) en *Solanum betaceum* (tomate de árbol) Trabajo de grado como requisito para optar el título Tecnólogo en Horticultura. Universidad Militar Nueva Granada. Cundinamarca, p 16.
- Cataldi, T. R., Margiotta, G., & Zambonin, C. G. (1998). Determination of sugars and alditols in food samples by HPAEC with integrated pulsed amperometric detection using alkaline eluents containing barium or strontium ions. *Food Chemistry*, 62(1), 109-115.
- CCI-Corporación Colombiana Internacional. 2004. Inteligencia de mercados: maracuyá. Bogotá, Colombia.
- Cifuentes, C., Vilaplana, R., & Valencia-Chamorro, S. (2016). Actividad antagonista in vitro de diferentes agentes de control biológico contra *Alternaria* spp. y *Colletotrichum* spp. *Agronomía Colombiana*, 34(1Supl), S933-S936.
- Coquet, A., Haerdi, W., Degli Agosti, R., & Veuthey, J. L. (1994). Determination of sugars by liquid chromatography with post-column catalytic derivatization and fluorescence detection. *Chromatographia*, 38(1-2), 12-16.
- Cruz, J. D. L., Vargas, M., Angel, O. D., & Garcia, H. S. (2010). Estudio de las características sensoriales, fisicoquímicas y fisiológicas en fresco y durante el almacenamiento refrigerado de maracuyá amarillo (*Passiflora edulis* sims var. flavicarpa. degener), para tres cultivares de Veracruz México. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 11(2).

- Droby, S., Wisniewski, M., Macarasin, D., & Wilson, C. (2009). Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm?. *Postharvest biology and technology*, 52(2), 137-145.
- Elad, Y., Köhl, J., & Fokkema, N. J. (1994). Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic yeasts. *Phytopathology*, 84(10), 1193-1200.
- El-Ghaouth, A. (2004). Biologically-based alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19(3), 160-162.
- Fell, J. W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G., & Statzell-Tallman, A. 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50(3), 1351-1371.
- Freeman, S., Katan, T., & Shabi, E. (1998). Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant disease*, 82(6), 596-605.
- Fredlund, E., Druvefors, U., Boysen, M. E., Lingsten, K. J., & Schnürer, J. (2002). Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. *FEMS Yeast Research*, 2(3), 395-402.
- Garmendia, G., Garat, F., Silvera, E., de Aurrecoechea, I., & Vero, S. (2005). Levaduras nativas como controladores de enfermedades postcosecha de frutas en Uruguay. *Agrociencia*, 9(1-2), 327-335.
- Gaviria, J., & Osorio, E. (2012). Diversidad de levaduras asociadas a inflorescencias de mango y flores de "Lulo Arbóreo". *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10(2), 160-169.
- Guerrero Prieto, V. M., Trevizo Enriquez, M. G., Gardea Béjar, A. A., Figueroa Valenzuela, C., Romo Chacón, A., Blanco Pérez, A. C., & Curry, E. A. (2004). Identificación de levaduras epifitas obtenidas de manzana [*Malus sylvestris* (L.) Mill. var. domestica (Borkh.) Mansf.] para control biológico poscosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(2).
- Gorgas García, J., Cardiel López, N., & Zamorano Calvo, J. 2011. ESTADÍSTICA BASICA para estudiantes de Ciencias. *Madrid-España: Universidad Complutense*.
- Hatoum, R., Labrie, S., & Fliss, I. 2012. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Frontiers in microbiology*, 3.
- Hernández, A. N., Bautista, S., Velázquez, M. G., & Hernández, A. (2007). Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. *Revista mexicana de fitopatología*, 25(1), 66-74.

- Hernández-Montiel, L. G., Holguín-Peña, J., López-Aburto, M. G., & Troyo-Diéguez, E. (2011). Control poscosecha de *Geotrichum citri-aurantii* en el limón mexicano (*Citrus aurantifolia* [Christm.] Swingle) mediante levaduras marinas y epífitas. *Universidad y ciencia*, 27(2), 191-198.
- Hernandez-Lauzardo, A. N., Campos-Martínez, A., Velazquez-Del Valle, M. G., Flores-Moctezuma, H. E., Suárez-Rodríguez, R., & Ramírez-Trujillo, J. A. (2015). First report of *Colletotrichum godetiae* causing anthracnose on avocado in Mexico. *Plant Disease*, 99(4), 555-555.
- Hyde, K. D., Cai, L., McKenzie, E. H. C., Yang, Y. L., Zhang, J. Z., & Prihastuti, H. (2009). *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal Diversity*, 39 (117).
- IDEAM. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales [27 Mayo 2018]
URL: <http://www.ideam.gov.co/documents/21021/21789/1Sitios+turisticos2.pdf/cd4106e9-d608-4c29-91cc-16bee9151ddd>.
- Janisiewicz, W. J., & Korsten, L. (2002). Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual review of phytopathology*, 40(1), 411-441.
- Jeffries, P., Dodd, J. C., Jeger, M. J., & Plumbley, R. A. (1990). The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. *Plant pathology*, 39(3), 343-366.
- Júnior, H. T., Fischer, I. H., Camara, M. P. S., & Júnior, N. M. (2010). First report of *Colletotrichum boninense* infecting yellow passion fruit (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*, 5(1), 70-72.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T., Robert, V. 2011. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. *The yeasts, a taxonomic study*, 1, 87-110.
- Korsten, L. (2006). Advances in control of postharvest diseases in tropical fresh produce. *International Journal of Postharvest Technology and Innovation*, 1(1), 48-61.
- Lara Rodríguez, E. (2006). Aislamiento y caracterización de levaduras antagonistas de hongos fitopatógenos post-cosecha de cítricos. Trabajo de grado como requisito para optar el título de Maestro en Ciencias en Biotecnología Genómica .Instituto Politécnico Nacional. Reynosa Tamps, p 78.
- Lin, T., Xu, X. F., Dai, D. J., Shi, H. J., Wang, H. D., & Zhang, C. Q. (2016). Differentiation in development of benzimidazole resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* complex populations from strawberry and grape hosts. *Australasian Plant Pathology*, 45(3), 241-249.

- Lima, J. R., Gonçalves, L. R. B., Brandão, L. R., Rosa, C. A., & Viana, F. M. P. (2013). Isolation, identification, and activity in vitro of killer yeasts against *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from tropical fruits. *Journal of basic microbiology*, 53(7), 590-599.
- Lima, J. R., Gondim, D. M. F., Oliveira, J. T. A., Oliveira, F. S. A., Gonçalves, L. R. B., & Viana, F. M. P. (2013). Use of killer yeast in the management of postharvest papaya anthracnose. *Postharvest Biology and Technology*, 83, 58-64.
- Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., & Liu, Y. 2013. Review: utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International journal of food microbiology*, 167(2), 153-160.
- Mager, W. H., & Siderius, M. (2002). Novel insights into the osmotic stress response of yeast. *FEMS yeast research*, 2(3), 251-257.
- Martinez E, Hio J, Osorio J, Torres M. (2009). Identification of *Colletotrichum* species causing anthracnose on Tahiti lime, tree tomato and mango. *Agronomía Colombiana*, 27(2): 211-218.
- Medina, C. M., Cristancho, D., Uribe, D. 2009. Respuesta fisiológica y capacidad antagonista de aislamientos filoféricos de levaduras obtenidos en cultivos de mora (*Rubus glaucus*). *Acta Biológica Colombiana*, 14(3).
- Mendoza, M. 2005. Importancia de la identificación de levaduras. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25(1).
- Miranda, D., Fischer, G., Carranza, C., Magnitskiy, S., Casierra, F., Piedrahíta, W., & Flórez, L. E. (2009). Cultivo, poscosecha y comercialización de las pasifloráceas en Colombia: maracuyá, granadilla, gulupa y curuba. *Bogotá: Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas*.
- Moraes, S. R. G., Tanaka, F. A. O., & Massola Júnior, N. S. (2013). Histopathology of *Colletotrichum gloeosporioides* on guava fruits (*Psidium guajava* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 35(2), 657-664.
- Moreno, M. L. O., y Uribe Vélez, D. 2010. Determinación de la actividad lignocelulolítica en sustrato natural de aislamientos fúngicos obtenidos de sabana de pastoreo y de bosque secundario de sabana inundable tropical. *Ciencia del suelo*, 28(2), 169-180.
- Moreno, M. L. O., y Uribe-Vélez, D. 2011. Nuevo método para la cuantificación de la actividad endoglucanasa basado en el complejo celulosa-rojo congo. *Orinoquia*, 15(1), 7-15.


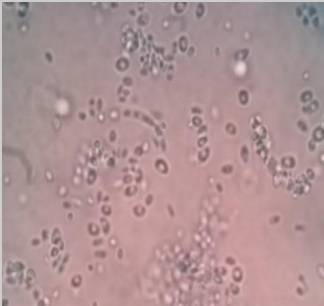

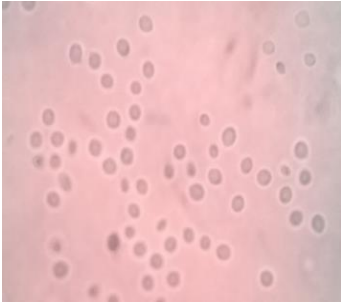
- Nally, M. C., Pesce, V. M., Maturano, Y. P., Assaf, L. R., Toro, M. E., de Figueroa, L. C., & Vazquez, F. (2015). Antifungal modes of action of *Saccharomyces* and other biocontrol yeasts against fungi isolated from sour and grey rots. *International journal of food microbiology*, 204, 91-100.
- Ocampo, J., Arias, J.C., Bonilla, M., Moreno, C.A., Molina, S., Manzano, M.R., Hernandez, L.M. (2013). Cartillas frutales - Maracuyá / Lulo.1 ed. Universidad Nacional Sede Palmira, Palmira, p.37.
- Okigbo, R. N., & Emeka, A. N. (2010). Biological control of rot-inducing fungi of water yam (*Dioscorea alata*) with *Trichoderma harzianum*, *Pseudomonas syringae* and *Pseudomonas chlororaphis*. *Journal of Stored Products and Postharvest Research*, 1(2), 18-23.
- Orozco, D. D. J., Flores, J. C. M., & Sanabria, Y. R. (2015). Indicadores químicos de calidad de suelos en sistemas productivos del Piedemonte de los Llanos Orientales de Colombia. *Acta Agronómica*, 64(4), 302-307.
- Pesce, V. M., Nally, M. C., Carrizo, G. P., Rojo, C., Pérez, B. A., Toro, M. E., & Vazquez, F. (2017). Antifungal activity of native yeasts from different microenvironments against *Colletotrichum gloeosporioides* on ripe olive fruits. *Biological Control*.
- Pardo-De la Hoz, C.J., Calderón, C., Rincón, A. M., Cárdenas, M., Danies, G., López-Kleine, L., Restrepo, S., & Jiménez, P. (2016). Species from the *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum boninense* and *Colletotrichum gloeosporioides* species complexes associated with tree tomato and mango crops in Colombia. *Plant Pathology*, 65(2), 227-237.
- Preto, G., Martins, F., Pereira, J. A., & Baptista, P. (2017). Fungal community in olive fruits of cultivars with different susceptibilities to anthracnose and selection of isolates to be used as biocontrol agents. *Biological Control*, 110, 1-9.
- Qin, G., Tian, S., & Xu, Y. 2004. Biocontrol of postharvest diseases on sweet cherries by four antagonistic yeasts in different storage conditions. *Postharvest biology and technology*, 31(1), 51-58.
- Ramdial, H., Hosein, F. N., & Rampersad, S. N. (2016). Detection and molecular characterization of benzimidazole resistance among *Colletotrichum truncatum* isolates infecting bell pepper in Trinidad. *Plant Disease*, 100(6), 1146-1152.
- Rosa, M. M., Tauk-Tornisielo, S. M., Rampazzo, P. E., & Ceccato-Antonini, S. R. (2010). Evaluation of the biological control by the yeast *Torulaspota globosa* against

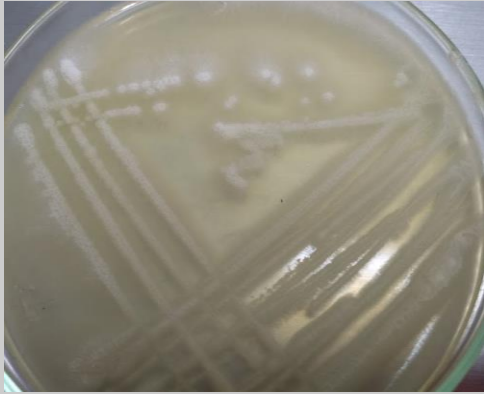
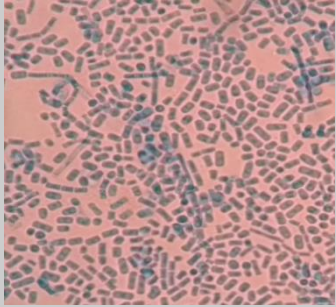
- Colletotrichum sublineolum* in sorghum. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(8), 1491-1502.
- Ruiz, S., Martín, A., Villalobos, M. C., Calle, A., Serradilla, M. J., Córdoba, M. G., & Hernández, A. 2016. Yeasts isolated from figs (*Ficus carica* L.) as biocontrol agents of postharvest fruit diseases. *Food microbiology*, 57, 45-53.
- Saligkarias, I. D., Gravanis, F. T., & Epton, H. A. 2002. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I-182: II. A study on mode of action. *Biological Control*, 25(2), 151-161.
- Sanclemente, Juan M. 2015. Aislamiento y caracterización morfológica y bioquímica de la microflora levaduriforme de interés agroindustrial para la producción de bioetanol asociada a borojó (*Borojoa patinoi*) y lulo (*Solanum tojiro*). Trabajo de grado como requisito para optar el título de Ingeniero agroindustrial. Universidad de San Buenaventura. Cali, p 68.
- Sanchez, O. J., & Montoya, S. 2014. Evaluación de actividades endoglucanasa, exoglucanasa, lacasa y lignina peroxidasa en diez hongos de pudrición blanca. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 12(2).
- Senses-Ergul, S., Ágoston, R., Belák, Á., & Deák, T. 2006. Characterization of some yeasts isolated from foods by traditional and molecular tests. *International journal of food microbiology*, 108(1), 120-124.
- Sharma, R. R., Singh, D., & Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological control*, 50(3), 205-221.
- Sharma, M., & Kulshrestha, S. (2015). *Colletotrichum gloeosporioides*: An anthracnose causing pathogen of fruits and vegetables. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 12(2), 1233-1246.
- Sindoni, M., Loggiodice, P. R. H., Castellanos, G., & Marín, C. (2012). Parámetros de calidad de 19 cultivares de parchita (*Passiflora* sp.) al sur del estado Anzoátegui, Venezuela. *Revista Científica UDO Agrícola*, 12(2), 245-252.
- Spadaro, D., & Droby, S. 2015. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science & Technology*, 47, 39-49.
- Sutton, B. C., Bailey, J. A., & Jeger, M. J. (1992). The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. *Colletotrichum: biology, pathology and control.*, 1-26.

- Teixidó, N., Vinas, I., Usall, J., Sanchis, V., & Magan, N. (1998). Ecophysiological responses of the biocontrol yeast *Candida sake* to water, temperature and pH stress. *Journal of Applied Microbiology*, *84*(2), 192-200.
- Than, P. P., Jeewon, R., Hyde, K. D., Pongsupasamit, S., Mongkolporn, O., & Taylor, P. W. J. (2008). Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. *Plant Pathology*, *57*(3), 562-572.
- Torres, G., Celina, S. D. P., Marina, B. O., Nelson, M. D. L. T., & Fernando, G. L. (1999). Enfermedades fungosas y bacterianas en el cultivo del maracuyá, *Passiflora edulis* Sims var. *flavicarpa*. *Cartilla divulgativa*, (1).
- Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L., & Johnson, T. R. (2004). *Microbiology: an introduction* (Vol. 9). San Francisco, CA: Benjamin Cummings.
- Trujillo, L. C., & Hernández, S. E. (2015). Aislamiento y caracterización de levaduras presentes en el fruto del *Syzygium malaccense* (L.) Merr. & L. M Perry (pomorroso) en la comuna 1 de la ciudad de Neiva-Huila. *Ingeniería y Región*, *13*(1), 37-45.
- Uribe, G Liz A. 2007. Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de mora. Trabajo de grado como requisito para optar el título de Microbióloga industrial. Universidad javeriana. Bogotá, p 154.
- Van Driesche RG, Hoddle MS, Center TD, Ruíz CE, Coronada BJ, Manuel AJ. Control de plagas y malezas por enemigos. Washington. U. S. D. A.2007: 3-46.
- Valencia Z. Hernando A. 2004. Notas de Clase. Manual de prácticas de microbiología básica. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, p 140.
- Vaughan-Martini A. Reflections on the classification of yeasts for different end-users in biotechnology, ecology and medicine. *Int Microbiol* 2003; 6: 175–82.
- Velho, A. C., Stadnik, M. J., Casanova, L., Mondino, P., & Alaniz, S. (2014). First report of *Colletotrichum nymphaeae* causing apple bitter rot in southern Brazil. *Plant Disease*, *98*(4), 567-567.
- Vieira, W. A. D. S., Lima, W. G., Nascimento, E. S., Michereff, S. J., Reis, A., Doyle, V. P., & Câmara, M. P. S. (2017). Thiophanate-Methyl Resistance and Fitness Components of *Colletotrichum musae* Isolates from Banana in Brazil. *Plant Disease*, *101*(9), 1659-1665.
- Zapata, J., Acosta, C., Díaz, A., Villamizar, L., & Cotes, A. M. (2010, October). Characterization of *Rhodotorula glutinis* and *Pichia onychis* Isolates with Potential as Biopesticides for Controlling *Botrytis cinerea*. In *International Symposium on Biological Control of Postharvest Diseases: Challenges and Opportunities* 905 (pp. 155-160).

ANEXOS

Anexo 1. Caracterización macroscópica y microscópica de los morfotipos con actividad antagonista frente a *Colletotrichum* sp., evaluación realizada después de cinco días de incubación en agar YGC.

Morfotipo	Descripción de la colonia	Morfología celular
<p>M 7</p>	 <p>Colonia circular, borde entero, elevación convexa, superficie lisa brillante, consistencia cremosa, color blanco beige y olor característico a fermentación.</p>	 <p>Levadura oblonga, algunas de gran tamaño y con gemación simple.</p>
<p>M 2</p>	 <p>Colonia circular, crecimiento concéntrico, borde entero y traslucido, elevación convexa, superficie lisa brillante, consistencia cerosa, color blanco y olor característico a fermentación.</p>	 <p>Levadura esférica, con gemación simple.</p>

<p>M 5</p>	 <p>Colonia irregular, borde filamentosos, elevación plana, superficie rugosa y opaca, color blanco y olor característico de fermentación.</p>	 <p>Hongo levaduriforme con micelio verdadero y arthroconidias rectangulares.</p>
-------------------	---	--

Anexo 2. Porcentaje de inhibición en los 8 tratamientos en la prueba *in vitro* levadura-patógeno.

Tratamientos	(%) Inhibición
Control	76,0
T1	27,2
T2	39,0
T3	27,6
T4	27,6
T5	54,8
T6	27,2
T7	37,3
T8	31,1

Anexo 3. Crecimiento promedio en unidades de densidad óptica a 540nm de los morfotipos M7, M2 y M5 durante las 28 horas de incubación.

Tiempo (h)	Morfotipo 7	Morfotipo 2	Morfotipo 5
0	0,010	0,007	0,004
1	0,022	0,011	0,008
2	0,029	0,044	0,02
3	0,043	0,057	0,042
4	0,047	0,06	0,05
5	0,054	0,068	0,06
6	0,073	0,078	0,067
7	0,079	0,099	0,071
8	0,084	0,116	0,094
10	0,111	0,132	0,108
12	0,122	0,151	0,142
14	0,129	0,212	0,175
16	0,158	0,239	0,212
18	0,185	0,272	0,266
19	0,231	0,278	0,299
20	0,238	0,342	0,341
21	0,353	0,487	0,391
22	0,432	0,515	0,423
23	0,516	0,545	0,518
24	0,557	0,596	0,664
25	0,598	0,596	0,706
26	0,608	0,618	0,722
27	0,624	0,642	0,728
28	0,644	0,668	0,732

Anexo 4. Crecimiento promedio de los morfotipos M7, M2 y M5 en la prueba de pH, evaluando la densidad óptica a 540nm.

	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
Morfotipo 7	0,066	0,086	0,133	0,085	0,027
Morfotipo 2	0,891	0,755	0,727	0,618	0,429
Morfotipo 5	0,716	0,981	0,660	0,925	0,830

Anexo 5. Crecimiento promedio de los morfotipos M7, M2 y M5 en la prueba de termotolerancia, evaluando densidad óptica a 540nm.

	5°C	30° C	40°C	45°C
Morfotipo 7	0,083	0,258	0,020	0,013
Morfotipo 2	0,126	0,944	0,694	0,234
Morfotipo 5	0,132	0,969	0,030	0,015

Anexo 6. Crecimiento promedio de los morfotipos M7, M2 y M5 en las pruebas de Osmotolerancia, evaluando densidad óptica a 540nm.

	Control	NaCl 1%	NaCl 5%	NaCl 10%	NaCl 15%
Morfotipo 7	0,597	0,492	0,052	0,011	0,018
Morfotipo 2	1,057	1,013	0,301	0,038	0,017
Morfotipo 5	0,723	0,672	0,317	0,021	0,025

Anexo 7. Crecimiento promedio de los morfotipos M7, M2 y M5 en las diferentes fuentes de carbono, evaluando densidad óptica a 540nm.

	Morfotipo 1	Morfotipo 2	Morfotipo 3
Glucosa	0,191	0,481	0,614
Fructosa	0,053	0,523	0,486
Galactosa	0,057	0,098	0,613
Xilosa	0,005	0,038	0,544
Sacarosa	1,005	1,224	0,923
Lactosa	0,209	0,747	0,658
Maltosa	0,532	0,904	0,664

Anexo 8. Crecimiento promedio de los morfotipos M7, M2 y M5 en las diferentes fuentes de nitrógeno, evaluando densidad óptica a 540nm.

	Peptona	Nitrato de potasio
Morfotipo 7	0,076	0,106
Morfotipo 2	0,805	0,372
Morfotipo 5	1,074	0,104

Anexo 9. Análisis de varianza de un factor ($p < 0.05$) y prueba de comparaciones pareadas de Tukey (95%) de la prueba *in vitro* de antagonismo levadura –patógeno.

ANOVA					
Porcentaje de Inhibición					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	6666,003	8	833,250	10,599	,000
Dentro de grupos	1415,057	18	78,614		
Total	8081,060	26			

Porcentaje de Inhibición				
HSD Tukey ^a				
Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
T6	3	27,1833		
T1	3	27,2000		
T4	3	27,6233		
T3	3	27,6300		
T8	3	31,0600	31,0600	
T7	3	37,2600	37,2600	
T2	3	39,0233	39,0233	
T5	3		54,8267	54,8267
Control	3			76,0000
Sig.		,775	,076	,147
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.				
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.				

Anexo 10. Análisis de varianza de un factor ($p>0.05$) y prueba de comparaciones pareadas de Tukey (95%) de la prueba de pH.

ANOVA					
Prueba pH					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	0,160	4	0,040	0,292	0,881
Dentro de grupos	5,465	40	0,137		
Total	5,624	44			

Prueba pH		
HSD Tukey ^a		
Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
PH7	9	0,42856
PH5	9	0,50667
PH6	9	0,54289
PH3	9	0,55778
PH4	9	0,60722
Sig.		0,842
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.		
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 9,000.		

Anexo 11. Análisis de varianza de un factor ($p < 0.05$) y prueba de comparaciones pareadas de Tukey (95%) de la prueba de termotolerancia.

ANOVA					
Prueba de Termotolerancia					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2,358	3	0,786	11,417	0,000
Dentro de grupos	2,203	32	0,069		
Total	4,561	35			

HSD Tukey ^a			
Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
45°	9	0,08722	
5°	9	0,11367	
40°	9	0,24789	
30°	9		0,72367
Sig.		0,570	1,000
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.			
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 9,000.			

Anexo 12. Análisis de varianza de un factor ($p < 0.05$) y prueba de comparaciones pareadas de Tukey (95%) de la prueba de osmotolerancia.


ANOVA					
Prueba osmotolerancia					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4,816	4	1,204	42,316	0,000
Dentro de grupos	1,138	40	0,028		
Total	5,954	44			

Prueba de osmotolerancia			
HSD Tukey ^a			
Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
10%	9	0,02356	
15%	9	0,07233	
5%	9	0,22322	
1%	9		0,72589
CONTROL	9		0,79222
Sig.		0,108	0,918
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.			
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 9,000.			

Anexo 13. Análisis de varianza de un factor ($p < 0.05$) y prueba de comparaciones pareadas de Tukey (95%) de la prueba de asimilación de fuentes de carbono.

ANOVA					
Fuentes de carbono					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4,466	6	0,744	8,397	0,000
Dentro de grupos	4,964	56	0,089		
Total	9,430	62			

Fuentes de carbono				
HSD Tukey^a				
Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Xil	9	0,24667		
Gal	9	0,25033		
Fru	9	0,35378	0,35378	
Glu	9	0,42867	0,42867	
Lac	9	0,53800	0,53800	
Mal	9		0,69833	0,69833
Sac	9			1,05056
Sig.		0,381	0,196	0,176
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.				
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 9,000.				

	UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS	CÓDIGO: FO-DOC-97	
	PROCESO DOCENCIA	VERSIÓN: 02	PÁGINA: 1 de 1
	FORMATO AUTORIZACION DE DERECHOS	FECHA: 02/09/2016	
		VIGENCIA: 2016	

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

AUTORIZACIÓN

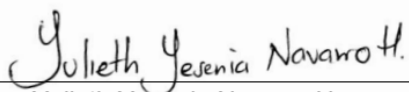
Yo Yulieth Yesenia Navarro Herrera mayor de edad, vecino de la ciudad de Villavicencio, identificado con la Cédula de Ciudadanía No. 1.121.911.808 de Villavicencio, actuando en nombre propio en mi calidad de autor del trabajo de tesis, monografía o trabajo de grado denominado, CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE CEPAS DE LEVADURAS CON ACTIVIDAD ANTAGONISTA FRENTE A *Colletotrichum sp.*, hago entrega del ejemplar y de sus anexos de ser el caso, en formato digital o electrónico (CD-ROM) y autorizo a la **UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS**, para que en los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia, con la finalidad de que se utilice y use en todas sus formas, realice la reproducción, comunicación pública, edición y distribución, en formato impreso y digital, o formato conocido o por conocer de manera total y parcial de mi trabajo de grado o tesis.

EL AUTOR – ESTUDIANTE, Como autor, manifiesto que el trabajo de grado o tesis objeto de la presente autorización, es original y se realizó sin violar o usurpar derechos de autor de terceros; por tanto, la obra es de mi exclusiva autoría y poseo la titularidad sobre la misma; en caso de presentarse cualquier reclamación o acción por parte de un tercero en cuanto a los derechos de autor sobre la obra en cuestión, como autor, asumiré toda la responsabilidad, y saldré en defensa de los derechos aquí autorizados, para todos los efectos la Universidad actúa como un tercero de buena fe.

Para constancia, se firma el presente documento en dos (2) ejemplares del mismo valor y tenor en Villavicencio - Meta, a los 25 días del mes de Julio de dos mil dieciocho (2018).

EL AUTOR – ESTUDIANTE

Firma



Nombre:

Yulieth Yesenia Navarro Herrera

C.C. No.

1.121.911.808

de

Villavicencio