

**DETECCIÓN DE FITOALEXINAS EN PLANTAS DE FRÍJOL (*Phaseolus vulgaris*)
EN RESPUESTA A INOCULACIÓN CON AISLAMIENTOS DE
ACTINOMICETOS.**



LUCY DAYANA TORRES DIAZ

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
Para optar el título de
MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL
BOGOTÁ, D.C.
JULIO DE 2010**

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo valerá por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ella el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

1.	INTRODUCCION	5
2.	JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA	6
3.	MARCO TERORICO	7
	3.1 Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR)	7
	3.2 Mecanismos de defensa de las planta	7
	3.2.1 Fitoalexinas: barreras químicas	8
	3.3 Generalidades del fríjol	10
4.	OBJETIVOS	11
	4.1 Objetivo general	11
	4.2 Objetivos específicos	11
5.	METODOLOGIA	12
	5.1 Preparación de inoculación de actinomicetos	12
	5.2 Preparación, inoculación y desarrollo de material vegetal	12
	5.3 Extracción de fitoalexinas	13
	5.4 Evaluación de actividad antimicrobiana de los extractos vegetales	14
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
	6.1 Recuperación y caracterización morfológica de actinomicetos	16
	6.2 Preparación de siembra y seguimiento de desarrollo de plantas fríjol	16
	6.3 Extracción de fitoalexinas	18
	6.4 Evaluación de actividad antimicrobiana de extractos	20
7.	CONCLUSIONES	28
8.	RECOMENDACIONES	29
9.	BIBLIOGRAFIA	30
10.	ANEXOS	33
	10.1 Convención de tratamientos para cada extractos	33
	10.2 Tabla con Rf de MCR24 y NPK ensayo preliminar en CCD	35
	10.3 Pesos y Concentraciones de los extractos obtenidos	39
	10.4 Medios de cultivo	41

TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Rutas metabólicas en plantas.....	9
Figura 2. Estadios de desarrollo del frijol.	10
Figura 3. Morfología microscópica y macroscópica de los actinomicetos de estudio. A microscopía cepa MCR9, MCR 24, MCR 26. B Macroscopía cepas MCR 9, MCR 24, MCR 26 en agar avena	16
Figura 4. Cromatografía de capa delgada de extractos en diferentes solventes. Los óvalos en rojo muestran los extractos en acetato de etilo. Placas visualizadas con: A: luz blanca, B: luz UV onda larga, C: luz UV onda corta, D: luz blanca revelado con vanillina	19
Figura 5. Comparación de corridas Cromatograficas con diferentes combinaciones de solventes.....	20
Figura 6. Caracterización morfológica microscópica de aislamientos fúngicos (tinción con azul de lactofenol). A. <i>Phaeoisariopsis griseola</i> , B. <i>Rhizoctonia solani</i> , C. <i>Fusarium oxysporium</i> , D. <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> 56, E. <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> 86.	21
Figura 7. Prueba de crecimiento de <i>Phaeoisiaopsis griseola</i> en diferentes medios de cultivo para inducir mayor tasa de crecimiento y producción de conidios.....	22
Figura 8. Pruebas preliminares de actividad del antifúngico comercial Terbinafina para los fitopatógenos <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> y <i>Rhizoctonia solani</i>	23
Figura 9. Discos de papel filtro impregnados con los 60 extractos	24
Figura 10. Comparación del efecto en la inhibición de melanina provocado por extractos de frijol frente <i>R.solani</i>	25
Figura 11. Efecto de esporulación ocasionado por extractos de frijol en <i>C. lindemuthianum</i> 86	26

1. INTRODUCCION

Las fitoalexinas son metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, sintetizados *de novo* en plantas en respuesta a la acción de elicitores o inductores tanto, exógenos, producidos por patógenos, agentes químicos y daños mecánicos, como endógenos, producidos por las plantas en respuestas a determinadas situaciones de estrés. Las fitoalexinas son metabolitos de bajo peso molecular de naturaleza química diversa, terpenoides, alcaloides, glucósidos y flavonoides, entre otros. Se conoce su inducción por interacciones compatibles y no compatibles con patógenos y bacterias promotoras de crecimiento vegetal, pero no se ha estudiado el efecto de microorganismos como los actinomicetos. La función de las fitoalexinas radica en la protección de la planta frente a patógenos, afectando la integridad de su pared y membrana celular, interrumpiendo su metabolismo o evitando su reproducción. El interés de algunos grupos de investigación ha sido el de reconocer la existencia e importancia de las fitoalexinas y su aplicación en el campo agrícola ya que contribuyen directamente en el control y manejo de bacterias y hongos fitopatógenos. Adicionalmente en el campo de la ingeniería genética, los avances pueden llegar a incidir en la maquinaria biosintética de estos metabolitos, contribuyendo al mejoramiento de cultivos por resistencia a múltiples patógena.

El presente estudio busca evaluar la producción de fitoalexinas en respuesta a la interacción de planta-actinomicetos, con el objetivo de caracterizar estos microorganismos como rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR, por su sigla en inglés "plant growth promoting rhizobacteria").

2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La utilización de pesticidas químicos, durante décadas, para el control de enfermedades en cultivos agrícolas ha hecho inminente la búsqueda de alternativas amigables, que contribuyan a minimizar el impacto negativo sobre el medio ambiente. Este deterioro ambiental en el tiempo ha llevado a buscar metodologías de control, que contribuyan en la prevención o reducción de los efectos de los pesticidas de síntesis química a corto y mediano plazo frente al daño ambiental.

El desarrollo basado en la conservación de recursos naturales, debe proteger la estructura, función y la diversidad biológica de los sistemas agrícolas, buscando mantener un equilibrio y un control del medio ambiente y los recursos naturales. Uno de estos recursos es el suelo, que se constituye en el principal soporte de la agricultura. El manejo biológico y controlado de los cultivos, se presenta como una alternativa ecológica y eficaz frente a los numerosos y crecientes problemas causados por microorganismos patógenos presentes en nuestro agroecosistema.

En los últimos años se han descrito una gama de sustancias llamadas fitoalexinas, que tienen gran importancia como mecanismo defensivo de las plantas. Las fitoalexinas son sustancias producidas por la planta, que inhiben el crecimiento de agentes infecciosos como hongos y bacterias. Aparentemente todas las especies de plantas pueden producir fitoalexinas al ser infectadas por agentes patógenos o en respuesta a estrés abiótico, químico o mecánico. Se ha determinado cierta correlación entre el grado de resistencia de algunas plantas a determinados patógenos y la cantidad de fitoalexinas producidas. En las variedades resistentes, la planta responde a la infección con niveles altos de fitoalexinas, que son tóxicos al patógeno, mientras que en las que son susceptibles, la concentración de fitoalexinas producida es insuficiente para inactivar al patógeno. La biosíntesis de fitoalexinas también puede ser inducida por bacterias promotoras de crecimiento vegetal, gracias a su capacidad de inducción de respuestas de defensa en plantas (resistencia sistémica inducida).

Es por esta razón, que utilizando un modelo biológico (planta de fríjol) se evaluará la producción de fitoalexinas, en respuesta a inoculación con actinomicetos para ser caracterizados como rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal. Se espera que los resultados obtenidos sean un punto de partida para investigaciones futuras, enfocadas a generar alternativas de protección de cultivos libres de contaminantes químicos.

3. MARCO TEORICO

3.1 Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria)

Las bacterias que colonizan la raíz (suelo rizosférico) son denominadas “rizobacterias” (Franco 2008). Las rizobacterias no patógenas pueden promover el crecimiento de las plantas, por estimulación hormonal o mejorar la obtención de nutrientes (mecanismos directos), así como evitar algunas enfermedades por medio de antagonismo o inducción de resistencia en la planta (mecanismos indirectos) (Bent 2002, Devendra 2007, Van Loon 2007,). La resistencia sistémica inducida (RSI) en plantas es fenotípicamente similar a la resistencia sistémica adquirida (RSA) estimulada por patógenos. Se ha demostrado contra hongos, bacterias y virus (Kuc 1997), en plantas de frijol, clavel, pepino, rábano, tabaco y tomate, entre otras. La resistencia inducida se manifiesta como una reducción del número de plantas enfermas o en gravedad de la enfermedad, tras la infección por un patógeno. Tal efecto hacia la enfermedad puede ser local o sistémico (Van Loon 1998).

Otras actividades de las PGPR se han descrito, como por ejemplo la fitoestimulación al propiciar la emergencia o el enraizamiento por la síntesis de reguladores de crecimiento como giberelinas, citoquininas y auxinas. Estas sustancias estimulan la densidad y longitud de los pelos radicales, lo que incrementa a su vez la capacidad de absorción de agua y nutrientes y permite que las plantas sean más vigorosas, productivas y tolerantes a condiciones climáticas adversas, como la sequía (Franco, 2008).

Teniendo en cuenta los estudios realizados por Franco-Correa (2008), se ha evidenciado actividad PGPR por parte de las cepas de actinomicetos de este estudio (MCR9, MCR24, MCR26). Las cepas MCR 9 y MCR 26 se identificaron como pertenecientes al género *Streptomyces*, y la cepa MCR 24 se clasificó en el género *Thermobifida*, por caracterización morfológica, bioquímica y molecular.

3.2 Mecanismos de defensa de las plantas

En general, las plantas contrarrestan el ataque de los patógenos (Arauz 1998, Agrios 2004, Agrios 2005), mediante características estructurales que actúan como barreras físicas e impiden que el patógeno penetre y se propague en ellas, incluyendo la deposición de calosa y suberina, reduciendo el posible crecimiento microbiano en la superficie vegetal y la interacción planta-patógeno (Rojas y Vargas 2009). También por medio de reacciones bioquímicas que tienen lugar en las células del hospedero, las cuales producen sustancias tóxicas para el patógeno o crean condiciones que inhiben su desarrollo como la presencia de quitinasas, enzimas

hidrolíticas que degradan la quitina, principal constituyente de la pared celular de los hongos (Krishnaveni 1999).

Otro de los mecanismos para prevenir la dispersión de la infección del patógeno es la respuesta hipersensible (RH). Este mecanismo se basa en la producción de especies reactivas de oxígeno tales como los radicales súper oxido (O_2^-), hidroxilo (OH) y peróxido (H_2O_2) (Granada 2009), generando la muerte rápida de las primeras células infectadas y la restricción de la expansión del patógeno, aislándolo del resto de la planta (Granada 2009).

Por otro lado, las enzimas peroxidasas desempeñan un papel importante en el proceso de resistencia, debido a que se encuentran relacionadas con la síntesis de compuestos fenólicos y la formación de barreras estructurales (Chen *et al.* 2000). Recientes estudios han confirmado la inducción de peroxidasas en plantas de frijol en respuesta a inoculación con actinomicetos (Ferroni 2009).

Existe una gran cantidad de trabajos, realizados a partir de extractos de plantas, en donde se hace alusión a la importancia de los metabolitos secundarios como sustancias tóxicas en el control de patógenos (Domingo y López 2003, Fernández y González 2008, Granada 2009, entre otros). Cuando en una planta se produce un estrés, ya sea por una interacción con agentes bióticos (microorganismos), agentes abióticos (como luz UV) o daños mecánicos (como heridas de insectos), todas estas condiciones se traducen en una respuesta de defensa de la planta, la cual involucra la activación transcripcional de diversos genes que codifican para proteínas necesarias para la cicatrización de la herida y/o la prevención de la invasión de microorganismos patógenos acumulando sustancias que no estaban presentes antes en los tejidos o lo estaban en bajas cantidades, funcionando como agentes antimicrobianos o como agentes reguladores de otros mecanismos. De estas sustancias las más estudiadas son las fitoalexinas (Arauz 1998, Lanot 2005, Granada 2009,). Las fitoalexinas son sustancias tóxicas que las plantas producen en cantidades apreciables solo después de haber sido estimuladas por los diferentes tipos de microorganismos fitopatógenos o bien después de haber sufrido daños causados por agentes químicos o mecánicos (Dey & Harborne 1991, Agrios 2004).

3.2.1 Fitoalexinas: barreras químicas

Las fitoalexinas, metabolitos secundarios de bajo peso molecular con actividad antimicrobiana, son de naturaleza química diversa (Dey & Harborne 1991), principalmente isoflavonoides en leguminosas que se sintetizan en las plantas después de una infección microbiana o estrés abiótico. La síntesis se puede disparar por la acción de factores como elicitores o inductores, tanto exógenos, producidos por patógenos, agentes químicos, daños mecánicos, como endógenos, producidos en respuesta a determinadas situaciones de estrés. Se han identificado principalmente en dicotiledóneas y existen pocos reportes de su presencia en monocotiledóneas y gimnospermas. En leguminosas como el frijol, se han descrito cerca de 16 tipos diferentes, las más conocidas son faseolina, faseolidina, faseolinisoflavona y kievitona. (Universidad Autónoma de Zacatecas 2010) La técnica de cultivo *in vitro* es una de las

alternativas para la producción de fitoalexinas y la investigación de estos metabolitos como una contribución para el control de ciertas plagas (García 2003, Universidad Autonoma de Zacatecas 2010)

En general las fitoalexinas no son potentes antibióticos y son de baja especificidad, muchas son biocidas y otras tienen efectos bioestáticos (Universidad Autonoma de Zacatecas 2010). La resistencia de la planta al patógeno ocurre cuando una o más fitoalexinas alcanzan una concentración suficiente para inhibir el desarrollo del agente infeccioso. Se ha descrito que antes de una infección se encuentran en una concentración casi detectable, después de una infección son sintetizadas rápidamente casi en horas después del ataque del patógeno y son tóxicas para un amplio espectro de hongos y bacterias patógenas (García 2003). La concentración de las fitoalexinas depende de factores como la especificidad del inductor, concentración de elicitador, tiempo de contacto con el inductor, línea celular, estado de desarrollo del hospedero, concentración y combinación de los fitorreguladores y condiciones ambientales y nutricionales del medio en donde se desarrolla la planta. Según Ebel (1986), la dosis efectiva que inhibe el crecimiento de hongos y bacterias parece ser elevada y se calcula en el orden de 1×10^{-5} a 1×10^{-4} M, concentración que se alcanza en el tejido infectado (García 2003).

Los metabolitos secundarios en plantas pueden ser divididos en tres grupos químicos: terpenos, fenólicos y compuestos que contienen nitrógeno. La biosíntesis de estos metabolitos secundarios está interconectada con la síntesis de metabolitos primarios (Figura 1).

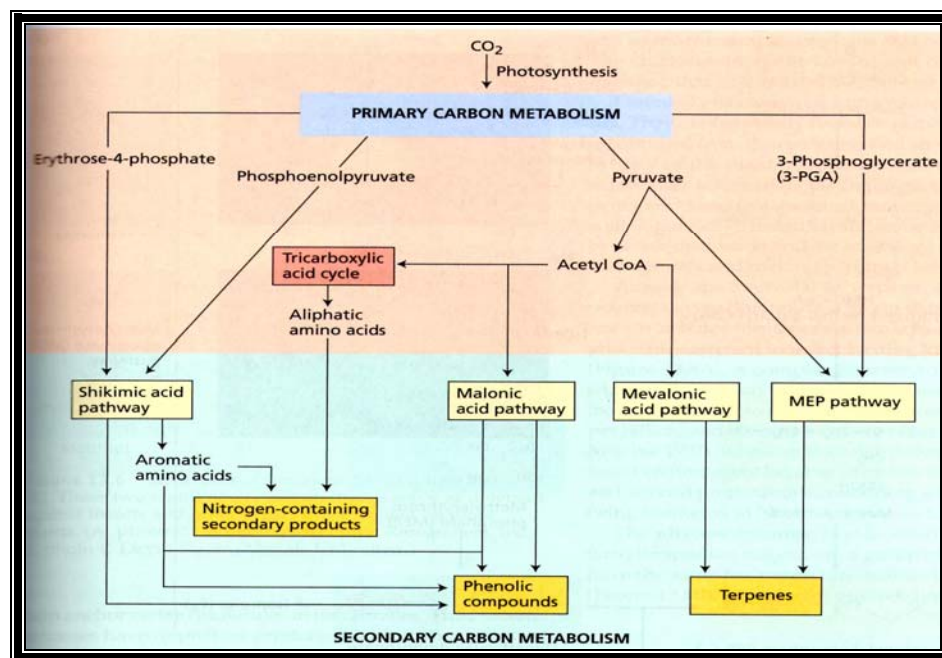


Figura 1. Rutas metabólicas en plantas. Fuente: Agrios 2005.

La mayoría de las fitoalexinas reportadas se encuentran entre los compuestos fenólicos derivados de flavonoides, derivados de la ruta biosintética de los fenilpropanoides, la cual proviene de la ruta de shikimato resultante de la ruta de las pentosas fosfato (Agrios 2005).

3.3 Generalidades del frijol

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*), una leguminosa, fue escogido como planta modelo debido a su rápido crecimiento y a la capacidad para restaurar la fertilidad de suelos agrícolas. En la primera etapa de desarrollo, el sistema radical está formado por la radícula del embrión, la cual se convierte posteriormente en la raíz principal o primaria. A los pocos días de la emergencia de la radícula, es posible ver las raíces secundarias, presenta nódulos distribuidos en las raíces laterales. Estos nódulos son colonizados por bacterias del género *Rhizobium*, las cuales fijan el nitrógeno atmosférico.

El ciclo biológico de la planta de frijol se divide en dos fases sucesivas: la fase vegetativa y la fase reproductiva. La fase vegetativa se inicia cuando se le brinda a la semilla las condiciones para iniciar la germinación y termina cuando aparecen los primeros botones florales. La fase reproductiva comprende desde el desarrollo de los botones florales hasta la madurez de cosecha (Figura 2).

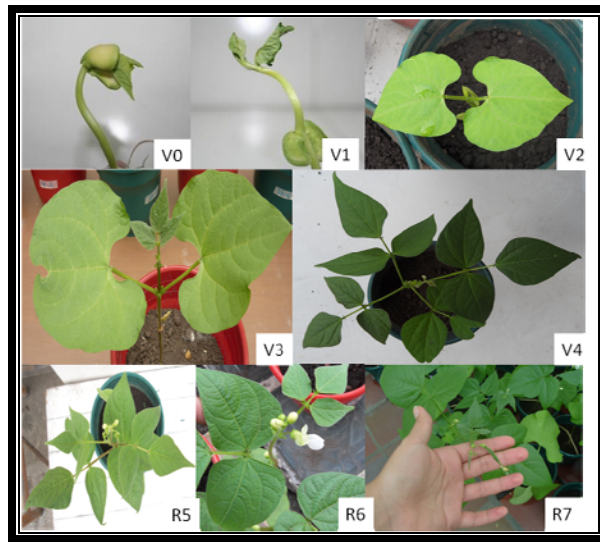


Figura 2. Estadios de desarrollo del frijol.

Los fitopatógenos representan uno de los principales problemas para la producción del frijol. Dentro de las enfermedades limitantes en el cultivo de frijol se encuentran la antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*), mancha anillada (*Phoma exigua* var. *diversispora*), mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*), pudriciones radicales (*Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*, *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* *Pythium* sp. y *Rhizoctonia solani* y) y virus del mosaico común del frijol.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Comprobar la producción de fitoalexinas en plantas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) en respuesta a la inducción biótica por inoculación con actinomicetos.

4.2 Objetivos específicos

- Inducir la síntesis de fitoalexinas en plantas de frijol común por inoculación de actinomicetos.
- Emplear métodos fitoquímicos para la obtención extractos vegetales de las plantas para evaluar la presencia de fitoalexinas.
- Evaluar *in vitro* la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales frente a fitopatógenos foliares y radiculares en frijol.

5. METODOLOGIA

La presente investigación se realizó en las instalaciones del laboratorio de Fitoquímica y Química Microbiológica y el laboratorio UNIDIA (Unidad de Investigaciones Agropecuarias) de la Pontificia Universidad Javeriana.

5.1 Preparación de inóculo de actinomicetos

Para inducir la respuesta sistémica de defensa en las plantas de fríjol se utilizaron tres cepas de actinomicetos, MCR9, MCR24, MCR26 provenientes de la colección de microorganismos del laboratorio UNIDIA, previamente caracterizados como promotores de crecimiento vegetal (Duque y Quintana 2008; Franco-Correa 2008, Bello y Gómez 2009). Estas cepas se conservaron en un banco primario en glicerol al 12% (v/v). Los aislamientos se reconstituyeron en agar avena y se incubaron a 22°C por 10 días (Franco-Correa 1999). A partir de este crecimiento se preparó una suspensión de unidades propagativas en solución salina para llegar a un inóculo de concentración de 10^6 propágulos/g suelo (Franco-Correa 2008).

5.2 Preparación, inoculación y desarrollo de material vegetal

Las semillas de fríjol (fríjol arbustivo variedad ICA - Cerinza) obtenidas de Impulse semillas se sometieron a un proceso de lavado con agua corriente, para eliminar trazas de tratamiento con fungicidas. Posteriormente se realizó una desinfección superficial con etanol al 80% por 30 segundos y NaClO 5% por 6 minutos (Linding 2002) y luego se realizaron nueve lavados con agua estéril. Finalmente se realizó imbibición de las semillas en agua estéril por 24 horas. En bandejas plásticas se inició la etapa de germinación por aproximadamente 10 días en fotoperiodo (12 horas luz / 12 horas oscuridad) a temperatura ambiente. Luego de este periodo, las semillas germinadas se transplantaron en materos con suelo esterilizado, por tres ciclos de autoclave a 121°C y 15 psi por 20 minutos (Gómez y Bello 2009). El suelo esterilizado fue inoculado con una suspensión de propágulos de actinomicetos a una concentración de 10^6 propágulos/g suelo, como se mencionó anteriormente. Se establecieron cinco tratamientos, incluyendo la inoculación con cada una de las cepas de actinomicetos, MCR9, MCR24 y MCR26 y dos controles, uno sin inoculación de actinomicetos (plantas tratadas con agua, testigo absoluto, H₂O) y otro sin inoculación con actinomicetos pero tratado con fertilizante de síntesis química (NPK). El fertilizante fue aplicado al cultivo en dos momentos, el primero al inicio de la siembra y el segundo al momento del desarrollo de la primera hoja trifoliada (estado de desarrollo vegetativo V3).

En cada uno de los materos se adicionó 1 Kg de suelo estéril, inoculado o no, y se sembraron dos semillas germinadas de forma equidistante. Cada uno de los tratamientos incluyó tres grupos de diez materos, que fueron ubicados aleatoriamente en el invernadero. Se evaluó periódicamente el desarrollo de las plantas, basado en las etapas propuestas por el manual técnico: “Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) en la producción de frijol voluble” (Arias 2007).

5.3 Extracción de fitoalexinas

El muestreo de material vegetal para la extracción de fitoalexinas se llevó a cabo en dos etapas de desarrollo de las plantas de frijol, según están definidas en el manual técnico para producción de frijol de Corpoica (2007). El primer muestreo se llevó a cabo en la fase de crecimiento V4, correspondiente a la aparición de la tercera hoja trifoliada, y el segundo muestreo en la fase de crecimiento R5, correspondiente al estado de prefloración identificada por la presencia del botón floral. El tejido vegetal foliar y radicular colectado en fresco a partir de cinco materos por cada tratamiento, se lavó con agua corriente para retirar residuos de suelo, luego se secó en papel absorbente para posteriormente congelarlo con nitrógeno líquido, evitando desencadenar síntesis de fitoalexinas por daños mecánicos. El tejido congelado se almacenó en bolsas selladas al vacío y se almacenó en congelador a -20°C hasta el momento del proceso de liofilización (Lindig 2002), separando las porciones de tejidos foliares y radiculares. Luego de la liofilización se tomaron 2g de cada uno de los tejidos para el proceso de extracción.

Para determinar el solvente y estrategia de extracción más apropiada se llevó a cabo un ensayo preliminar, comparando extractos de plantas inoculadas con la cepa MCR24 y tratadas con fertilizante NPK en estadio reproductivo R5. Se siguieron dos estrategias de extracción y fraccionamiento de extractos. La primera estrategia se basó en una extracción seriada sólido-líquido con tres solventes de diferentes polaridades. La extracción se hizo por medio de agitación del tejido liofilizado por agitación durante 48 horas, luego se hizo filtración y el resto de tejido se sometió nuevamente a extracción por 48 horas. Luego de los dos ciclos de extracción con el primer solvente (Bencina de petróleo), se llevó a cabo el mismo procedimiento con los solventes diclorometano y acetato de etilo, partiendo del solvente con menor grado de polaridad y terminando con el de mayor grado de polaridad. Al final de los tres ciclos de extracción se fusionaron los filtrados del mismo solvente y se concentraron por rotaevaporación. La segunda estrategia de extracción se basó en una extracción de tejido vegetal con etanol absoluto, por dos ciclos de 48 horas tal como se hizo en la primera estrategia, para obtener un extracto crudo etanólico, a partir del cual se hizo un fraccionamiento seriado líquido-líquido con los mismos solventes de la primera estrategia de extracción. Para el fraccionamiento líquido-líquido una porción del extracto crudo se mezcló con un volumen igual de agua para generar la fracción hidroalcohólica, que posteriormente se fraccionó por extracción con bencina de petróleo, diclorometano y acetato de etilo, conservando el orden de polaridad ascendente. El

procedimiento para concentración de extractos y fracciones es el mismo de la primera estrategia. Finalmente para determinar la estrategia de extracción más apropiada se evaluaron los extractos por cromatografía de capa delgada (CCD). Para desarrollar las separaciones cromatográficas se probaron 12 combinaciones de solventes para establecer la fase móvil que permitiera la mejor resolución de compuestos en placas de sílica del 60 (NanoSil G/UV₂₅₄, Macherey-Nagel). En la tabla 1 se muestran las mezclas de solventes evaluadas como fase móvil.

Tabla 1. Solventes evaluados para determinar fases móvil de corrida para cromatografía de capa delgada.

Solventes	Proporción solventes
Cloroformo	---
Diclorometano	---
Diclorometano : Bencina de petróleo	7 : 3
Diclorometano : Bencina de petróleo	8 : 2
Diclorometano : Bencina de petróleo	9 : 1
Diclorometano : Metanol	9,5 : 0,5
Cloroformo : Metanol	3 : 1
Bencina de petróleo : Acetato de etilo	3 : 7
Bencina de petróleo : Acetona	3 : 7
Bencina de petróleo : Acetona	7 : 3
Bencina de petróleo : Acetona	8 : 2
Bencina de petróleo : Acetona	9 : 1

Las cromatografías de ensayo para determinar fase móvil se corrieron con los extractos crudo etanólico y extractos sólido-líquido de bencina de petróleo, diclorometano y acetato de etilo. Posterior a la resolución de los extractos, las placas se visualizaron en luz visible, luz UV (longitud de onda larga y corta) y se revelaron con vanillina.

Los resultados de las pruebas preliminares de extracción determinaron con mejor solvente acetato de etilo, por lo tanto la extracción de los tejidos vegetales se llevó a cabo en 65mL del solvente (Lindig 2002), a temperatura ambiente por 48 horas. Posteriormente se filtró y la biomasa vegetal se sometió nuevamente a extracción bajo las mismas condiciones. Luego del segundo ciclo de extracción las dos fases de solvente se mezclaron concentraron por rotaevaporación a presión reducida de 240 psi a 40°C. Posteriormente estos extractos se usaron para evaluar su actividad antimicrobiana frente a fitopatógenos específicos del frijol (Domingo y López 2003, Fernández y González 2008, Granada 2009).

5.4 Evaluación de actividad antimicrobiana de los extractos vegetales

La actividad biológica de los extractos se evaluó frente a un patógeno foliar como *Colletotrichum lindemuthianum* y dos patógenos radiculares como *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*. Las cepas fueron donadas por el Laboratorio de patología del frijol del CIAT

(Centro Internacional de Agricultura Tropical). Se preparó un banco primario de almacenamiento de discos de agar-micelio en agua estéril. Los aislamientos fúngicos fueron cultivados en agar avena para la producción de conidios y micelio y así preparar los inóculos para las pruebas de actividad biológica. Para el inóculo de *C. lindemuthianum* y *F. oxysporum* se preparó una suspensión conidial de 10^5 conidios/mL. En el caso de *Rhizoctonia solani*, patógeno de micelio estéril, se preparó el inóculo a partir de un cultivo en caldo papa dextrosa que fue licuado para fragmentar el micelio.

Una vez preparados los inóculos, se sembraron masivamente 0,1mL en placas de PDA (papa dextrosa agar) suplementado con Cloranfenicol y azul de metileno (PDACAM) (Niño 2009). Este medio de cultivo permite valorar el aspecto morfológico y coloración de las colonias fúngicas, por su alto contenido en carbohidratos condiciona un mayor crecimiento (Márquez 2007), el Cloranfenicol inhibe el crecimiento de bacterias y el azul de metileno genera un buen contraste para la lectura de los halos de inhibición de crecimiento fúngico. Luego de la siembra de los patógenos se colocó en el centro de las placas de agar un disco de papel filtro Whatman #1 de 6mm de diámetro activado con 500µg de cada uno de los extractos diluídos en DMSO-etanol. Como control negativo de inhibición se usaron discos impregnados con DMSO-etanol y como control positivo de inhibición se usaron discos activados con 2,5mg/ml Terbinafina reconstituída en DMSO. Finalmente como control absoluto de desarrollo fúngico, se hizo siembra de los patógenos en placas de PDACAM (Kevan *et al.* 1993, Prada y Vega 2008, Niño 2009). Las placas se incubaron a temperatura ambiente por siete días, evaluando actividad antimicrobiana por medio de halos de inhibición o algún efecto en el crecimiento del patógeno desde las 72 horas de cultivo (Márquez *et al.* 2007, Niño 2009). Para este ensayo se montaron cuatro réplicas de cada combinación patógeno - extracto vegetal.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Recuperación y caracterización morfológica de actinomicetos

Se confirmaron las características morfológicas macroscópicas y microscópicas de los actinomicetos de este estudio en las siembras en agar avena (Figura 3). La cepa MCR9 mostró colonias de textura seca pulverulenta, color anverso gris plateado y reverso café oscuro; microscópicamente se observaron filamentos en cadena larga de conidios y micelio en espiral. La cepa MCR24 mostró colonias de textura seca pulverulenta, anverso gris y pigmento amarillo difusible en el medio de cultivo; microscópicamente se observaron filamentos ramificados y pocos conidios simples. La cepa MCR26 mostró colonias pequeñas, de textura seca pulverulenta, anverso de color gris a morado y reverso gris oscuro; microscópicamente se observaron filamentos largos y fragmentados, micelio tortuoso, cadenas de conidios cortas sin formar espirales.

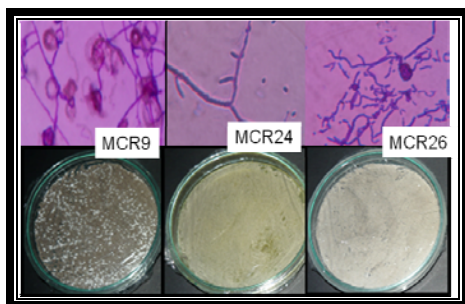


Figura 3. Morfología microscópica y macroscópica de los actinomicetos de estudio. A microscopía cepa MCR9, MCR 24, MCR 26. B Macroscopía cepas MCR 9, MCR 24, MCR 26 en agar avena.

Las características macroscópicas y microscópicas de las cepas MCR9, MCR24 y MCR26, concuerdan con lo determinado por Duque y Quintana en el 2008, cuando evaluaron su actividad como PGPR, por lo tanto se puede considerar que las cepas están activas, viables y puras.

6.2 Preparación de siembra y seguimiento de desarrollo de plantas fríjol

El método de desinfección de las semillas se escogió después de hacer pruebas con diferentes tiempos de desinfección en NaClO, por 2, 4, 6, 8 y 10 minutos. Los mejores resultados para la germinación se consiguieron con concentraciones de hipoclorito al 5% por 6 minutos y etanol al 80% por 30 segundos, evitándose la contaminación de las semillas durante el periodo de germinación, en fotoperiodo, y manteniéndose las características propias de la semilla (color, forma, tamaño y viabilidad). Al finalizar el periodo de germinación en fotoperiodo se alcanzó el 80% de la germinación de las semillas, considerado como un porcentaje apto y adecuado para el inicio del cultivo de fríjol en condiciones de invernadero.

En cuanto a la etapa de desarrollo de las plantas en condiciones de invernadero, se dispuso de un espacio de 6m de largo por 3m de ancho, en el que se construyó un invernadero de 3m de altura. Es preciso señalar que si bien las condiciones ambientales no siempre fueron constantes, las variaciones climáticas no tuvieron efectos considerables que impidieran el desarrollo del cultivo. En relación a lo mencionado anteriormente, Lindig (2002) demostró que las condiciones de crecimiento del frijol en invernadero pueden afectar la inducción de defensa sistémica como la síntesis de fitoalexinas. Por otro lado, Heil (2001) plantea que en invernadero las plantas tienden a aumentar su rendimiento y disminuir en defensa, esto quiere decir que son más susceptibles a factores que puedan causar algún tipo de daño. Contrariamente, las plantas cultivadas en campo pueden ser capaces de producir, en mayor proporción, sustancias para su defensa, aunque disminuye su rendimiento. Estos comportamientos dependen directamente del gasto de energía generado por las plantas y los estímulos que esta tenga para la producción de mecanismos de defensa (Heil 2001).

Durante el desarrollo del cultivo, se observó en algunas hojas, clorosis y marchitamiento prematuro, esta reacción pudo deberse a un efecto de estrés abiótico. Los pocos casos fueron aislados y se evitó mezclar las plantas de muestreo con las que presentaran síntomas de estrés. Estos cambios fueron identificados a tiempo gracias a una monitoreo diario de las plantas, en el cual no solo se observaban cambios morfológicos en la planta sino también la etapa de desarrollo en la que se encontraba, para así determinar el momento de la cosecha.

El tiempo de muestreo de los dos estadios de desarrollo no presentó diferencias marcadas entre los diferentes tratamientos. Las plantas alcanzaron el estadio de desarrollo vegetativo (V4) luego de 33 días de siembra en los materos. La colecta de material para estadio reproductivo (R5) difirió del estadio vegetativo en que todas las plantas llegaron al estadio en el mismo día, el muestreo de las plantas se llevó a cabo entre 45 y 51 días posteriores a la siembra en suelo. El hecho de no observar diferencias marcadas en los tiempos de desarrollo de las plantas en cada estadio entre los diferentes tratamientos, no permite determinar actividad promotora de crecimiento vegetal, por la interacción de frijol-actinomicetos, en función de aceleración del ciclo de desarrollo de las plantas de frijol. La aceleración del ciclo de desarrollo vegetativo y reproductivo y la productividad de la planta es uno de los efectos de la interacción con PGPR (Lucy *et al.* 2004). Estudios de aplicación de PGPR para la protección de plantas de pepino frente CMV (virus del mosaico del pepino cohombro) han demostrado además de la protección a la enfermedad, el rápido desarrollo de las plantas inoculadas con PGPR en comparación con las plantas control (Murphy *et al.* 2003).

Por otro lado, el monitoreo diario del desarrollo de las plantas de frijol no mostró diferencias marcadas en el crecimiento (altura y número de foliolos), comparado entre los tratamientos; por lo tanto, no se puede asegurar que el inóculo de los actinomicetos haya sido suficiente para observar un estímulo marcado en el crecimiento. Para determinar un estímulo en el crecimiento es necesario llevar a cabo mediciones de altura de las plantas y peso seco a nivel foliar y radicular.

6.3 Extracción de fitoalexinas

Para la identificación de los diferentes extractos se creó una tabla de códigos con el objetivo de facilitar la interpretación de los resultados. La tabla de códigos se presenta en el anexo 1. La tabla está distribuida por etapa de crecimiento (V4 – R5), tejido vegetal (hojas – raíces), tratamiento (cepa actinomiceto – controles) y réplica; por ejemplo VR0-1 corresponde a V: etapa vegetativa, R: raíz, 0: control H₂O y 1: réplica 1; RH26-3: R: etapa reproductiva, H: hojas, 26: tratamiento con cepa MCR26 y 3: réplica 3.

Los métodos de extracción del material vegetal deben obedecer a la naturaleza química de las sustancias presentes en la planta y al propósito de investigación. En la búsqueda de metabolitos para la determinación de su actividad biológica, la extracción del material vegetal frecuentemente se realiza con solventes orgánicos de bajo punto de ebullición (alcohol y acetato de etilo, entre otros) y baja reactividad. El alcohol es generalmente más eficaz para recuperar la mayoría de los compuestos presentes (Fernández y Gonzales 2009). Sin embargo, en pruebas preliminares para este trabajo, realizando cromatografía capa delgada en placas de sílica gel, se concluyó que el mejor solvente para extraer un amplio espectro de metabolitos fue acetato de etilo. Las corridas cromatográficas de los extractos de acetato de etilo presenta un mayor número de bandas, con R_f entre 0,05 a 0.93 (anexo 2). En la figura 4 los óvalos en rojo señalan los extractos en acetato de etilo de los tratamientos NPK y MCR24, en los cuales se observa mayor número y definición de bandas. Las placas reveladas con vainilla muestran también mayor diversidad de compuestos en los extractos de acetato de etilo.

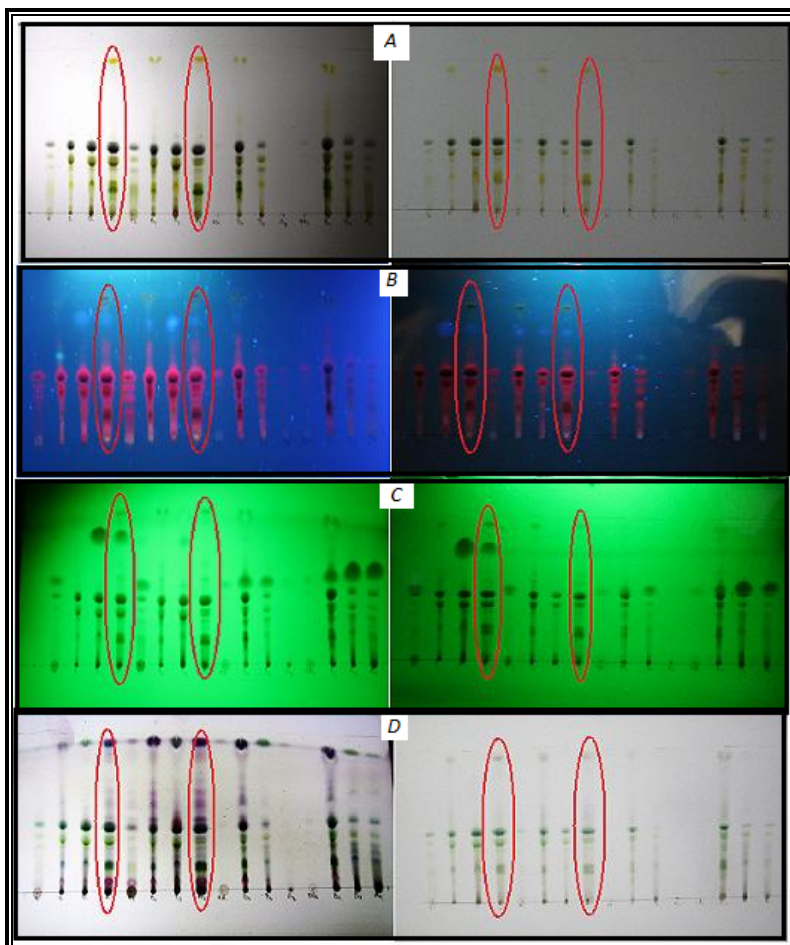


Figura 4. Cromatografía de capa delgada de extractos en diferentes solventes. Los óvalos en rojo muestran los extractos en acetato de etilo. Placas visualizadas con: A: luz blanca, B: luz UV onda larga, C: luz UV onda corta, D: luz blanca revelado con vanilina.

El solvente de corrida (fase móvil) también es determinante en la escogencia del solvente de extracción en función de la resolución de las bandas de los diferentes metabolitos. Por esta razón se llevó a cabo previamente una prueba para escoger el mejor solvente de extracción (Figura 5). El solvente seleccionado fue bencina de petróleo: acetona en proporción 8:2.

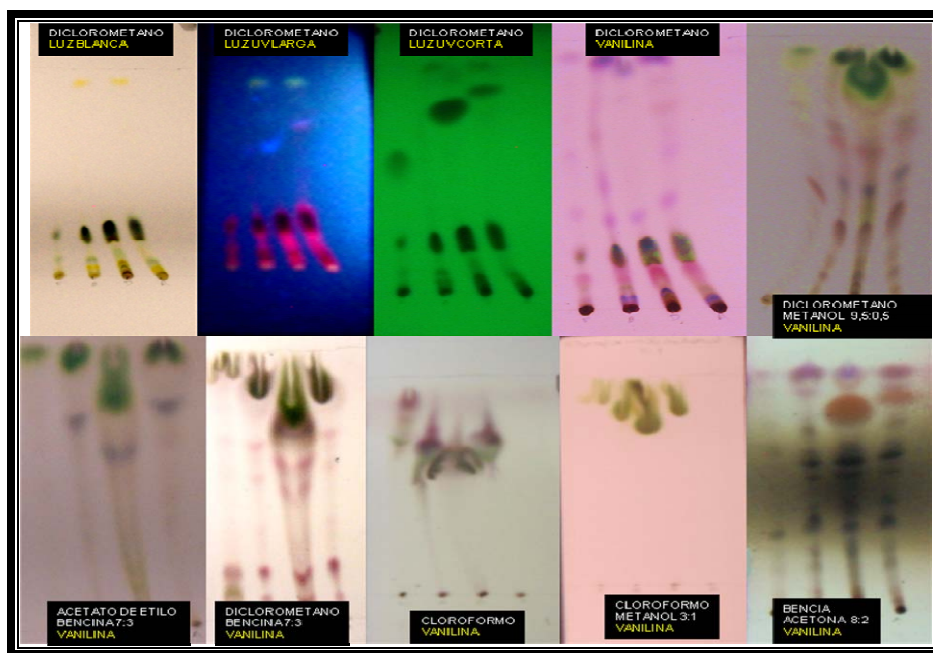


Figura 5. Comparación de corridas Cromatograficas con diferentes combinaciones de solventes

Luego del proceso de extracción sólido líquido en acetato de etilo y su correspondiente filtración, los 60 extractos se concentraron por rotaevaporación. Finalmente los extractos fueron pesados y reconstituídos en acetato de etilo. Los pesos de los extractos secos se encuentran resumidos en el anexo 3. Todos los extractos se ajustaron a una misma concentración, 50mg/mL, para posteriormente activar discos de papel filtro (10µL de extracto para una cantidad de 500µg de extracto por disco de papel filtro).

6.4 Evaluación de actividad antimicrobiana de extractos

La actividad biológica fue evaluada frente a hongos fitopatógenos foliares y radicales de fríjol. La caracterización morfológica de los aislamientos se llevó a cabo en agar avena. La caracterización morfológica macro y microscópica confirmó la identidad y pureza de los aislamientos fúngicos. La figura 6 muestra la morfología microscópica típica de cada una de las cepas.

Se seleccionaron para el estudio las cepas de *Colletotrichum lindemuthianum* 86, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporium*. Las cepas de *C. lindemuthianum* 56 y *Phaeoisariopsis griseola* se excluyeron del estudio por su baja producción de conidios y lento crecimiento, respectivamente. Se probaron diferentes medios de cultivo como Muller-Hinton suplementado con glucosa, V8 y V8 suplementado con 2 y 4% (p/v) de harina de amaranto para inducir mayor crecimiento de *P. griseola*, en incubación con luz constante y oscuridad constante (Figura 7), pero los resultados no fueron los esperados (Steinglein *et al.* 2006).

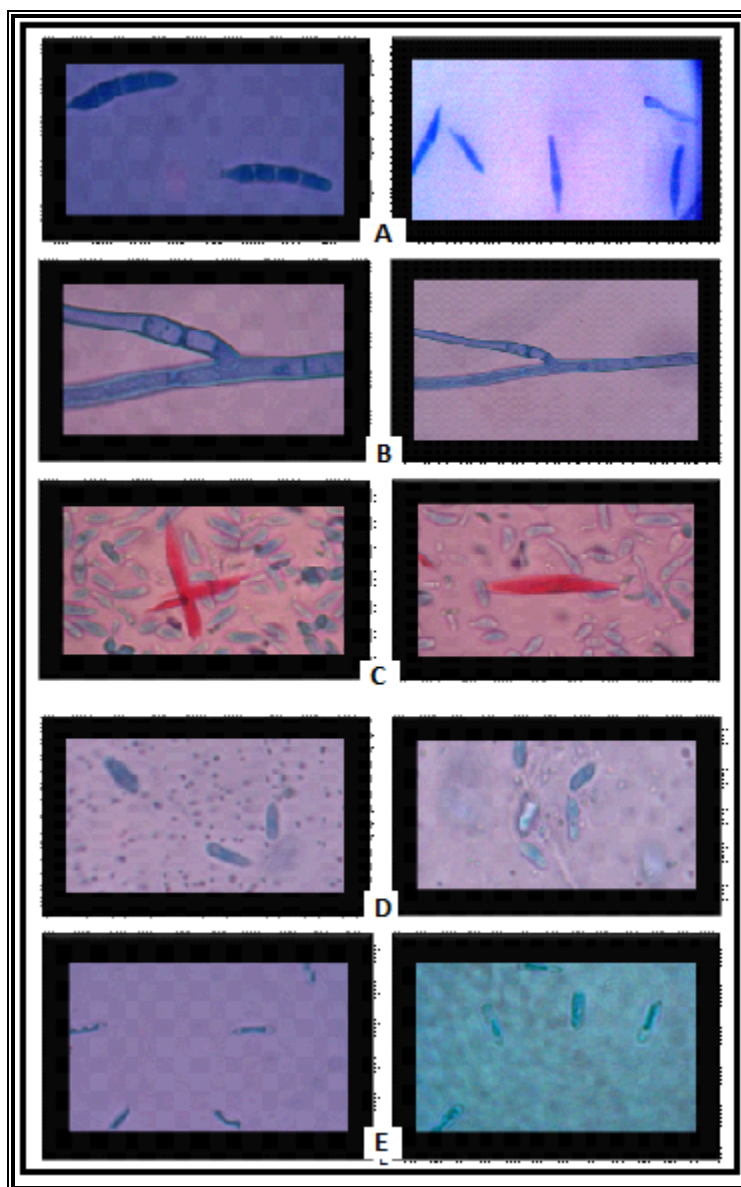


Figura 6. Caracterización morfológica microscópica de aislamientos fúngicos (tinción con azul de lactofenol). A. *Phaeoisariopsis griseola*, B. *Rhizoctonia solani*, C. *Fusarium oxysporum*, D. *Colletotrichum lindemutianum* 56, E. *Colletotrichum lindemutianum* 86.

A partir de la reconstitución de las cepas en medio avena se hizo repique en los medios: Muller Hinton comercial, Muller Hinton preparado por componentes y PDA, luego de cinco días de incubación a 22°C se evaluó su comportamiento en los diferentes medios, obteniendo que la mejor producción de micelio y conidios se da en el medio PDA. Se presentó buen crecimiento en todos los medios, pero en el medio PDA se determinó mayor producción de conidios en menor tiempo y desarrollo de micelio más homogéneo en la placa de cultivo. En repiques sucesivos,

también se observó mayor estabilidad morfológica en medio PDA. Por estas razones el medio PDA fue seleccionado para las pruebas de actividad antimicrobiana de los extractos.



Figura 7. Prueba de crecimiento de *Phaeoisiaopsis griseola* en diferentes medios de cultivo para inducir mayor tasa de crecimiento y producción de conidios.

Las pruebas preliminares de actividad de antifúngicos comerciales mostraron inhibición de *F. oxysporum* por DMSO puro (Figura 8). Siendo el DMSO esencial como solvente para asegurar su difusión en el medio de los extractos, se probaron mezclas de DMSO y etanol como solvente para diluir los extractos. La mezcla en proporción 1:1 no mostró inhibición de crecimiento del patógeno. En cuanto a la actividad antifúngica de terbinafina, se observó inhibición de crecimiento para las cepas de *F. oxysporum* y *C. lindemuthianum* 86, pero en menor proporción para la cepa de *R. solani*, obteniendo halos de 32mm, 17mm y 7mm, respectivamente. Adicionalmente se evaluó el posible efecto inhibitorio de acetato de etilo sobre los patógenos fúngicos, teniendo en cuenta que las diluciones de los extractos en DMSO-etanol contienen trazas de este solvente. Ninguno de los patógenos inhibió su crecimiento por acetato de etilo, esto puede deberse a que el acetato de etilo por ser un solvente de alta presión de vapor se evapora rápidamente sin dejar trazas en el papel filtro o el medio de cultivo, que puedan tener un efecto deletéreo para las cepas de los fitopatógenos.

Para la prueba de actividad antimicrobiana a partir de los discos de papel filtro, impregnados con los 60 extractos, los discos presentaron diferentes coloraciones dependiendo de extracto. Los discos con pigmento verde corresponden a los extractos de tejido foliar (presencia de

clorofila) y los que no tienen pigmento corresponden a los extractos de tejido radicular (Figura 9).

Los resultados de actividad biológica de los extractos en términos de halos de inhibición de crecimiento micelial no fueron positivos. Se observó crecimiento masivo al alrededor de los discos de papel impregnados con los extractos para las cepas de *F. oxysporum* y *R. solani*. En el caso de *C. lindemuthianum* 86 el crecimiento no fue homogéneo, sin embargo no se observó halo de inhibición de crecimiento alrededor del disco.

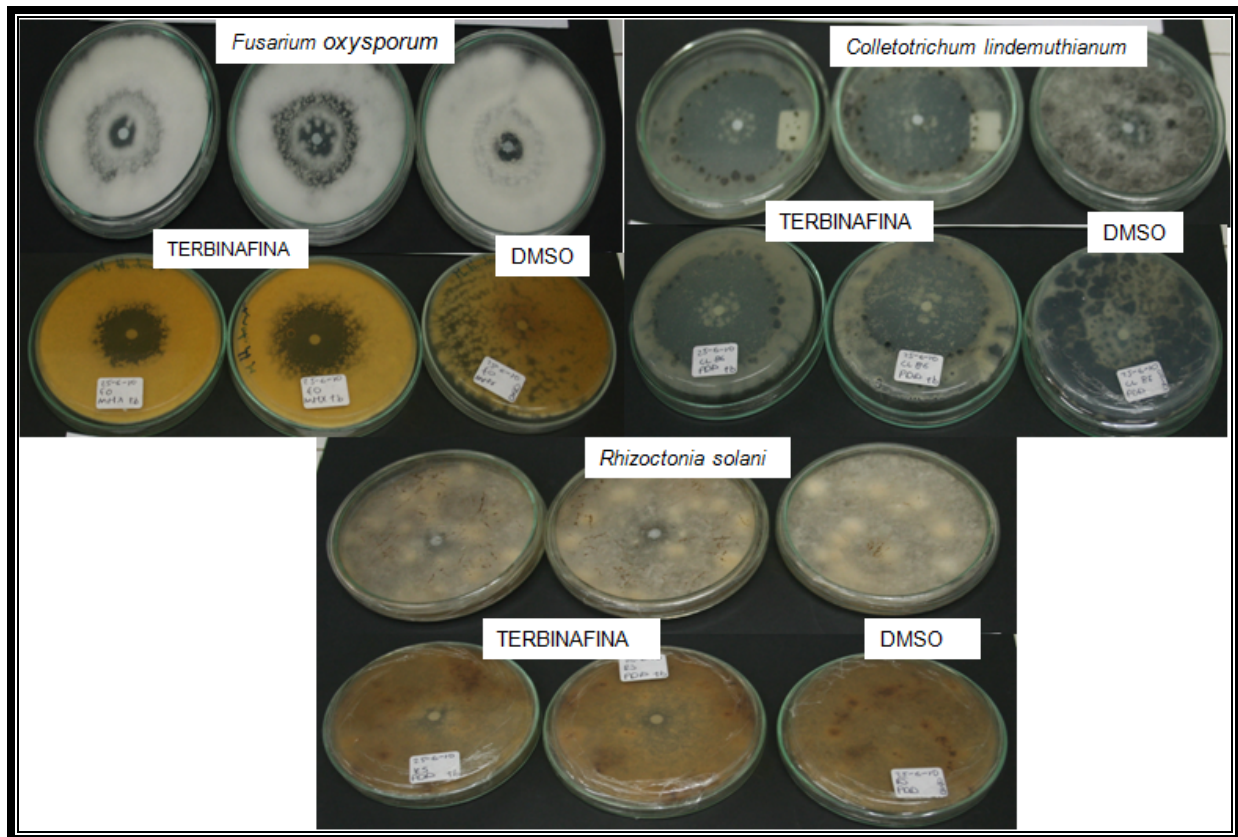


Figura 8. Pruebas preliminares de actividad del antifúngico comercial Terbinafina para los fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthianum* y *Rhizoctonia solani*.

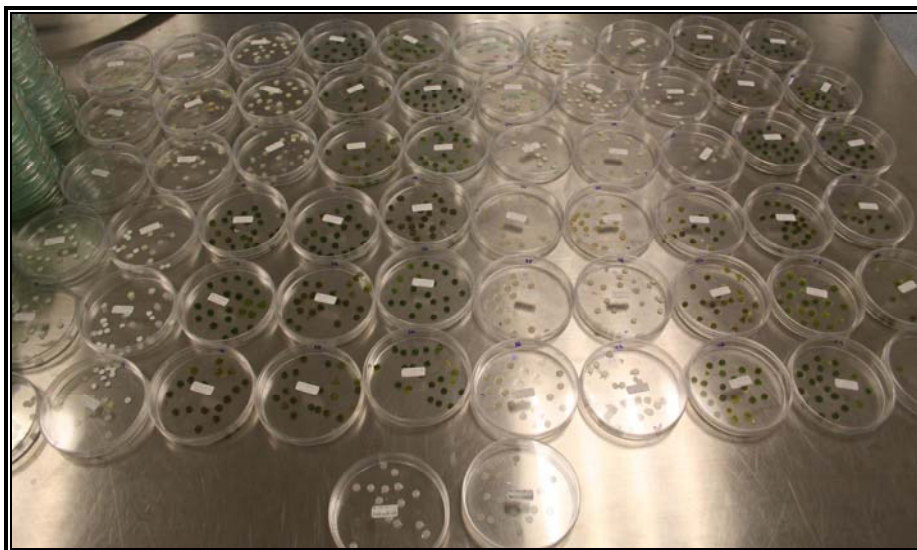


Figura 9. Discos de papel filtro impregnados con los 60 extractos.

Aunque no se determinó inhibición de crecimiento de los patógenos por acción de los extractos vegetales, se observaron diferencias a nivel morfológico en el desarrollo de las cepas, indicando un posible efecto de estrés por parte de los extractos para *C. lindemuthianum* 86 y *R. solani*. No siempre las fitoalexinas son inhibitorias de crecimiento en fitopatógenos, también pueden alterar el metabolismo de los patógenos retrasando su crecimiento y generando alteraciones en su morfología (Hammerschmidt 1999).

Las fitoalexinas no son específicas en su comportamiento debido a que sin importar el tipo de agente (biótico o abiótico) utilizado como inductor, el nivel de resistencia en la planta varía en función de los patógenos (Agrios 2004), pues estos no responden de la misma manera, ya que muchos expresan mecanismos de detoxificación. También es muy importante la concentración de fitoalexinas producida para lograr un efecto más evidente frente a la inhibición del patógeno.

Entre las fitoalexinas producidas por el frijol se encuentra la faseolina, la cual se ha identificado como inhibidora de diferentes fitopatógenos, pero esta está presente principalmente en las semillas (García 2003). Teniendo en cuenta que en este estudio no se prepararon extractos a partir de semillas no se podría asegurar que la interacción con actinomicetos no induce la síntesis de este metabolito. Las plantas de frijol, en respuesta a la inoculación con los actinomicetos, pudieron sintetizar otro tipo de fitoalexinas diferentes a la faseolina, ya que se reportan 16 tipos de fitoalexinas en frijol (Universidad Autónoma de Zacatecas 2010), pero quizás la concentración no fue suficiente para observarse un efecto inhibitorio en el crecimiento fúngico. Las fitoalexinas sintetizadas por una misma especie vegetal no se comportan de la misma forma y su síntesis depende directamente del elicitor (biótico o abiótico). Por otro lado, las fitoalexinas pueden no ser detectables debido a que su síntesis es muy rápida luego de su inducción (Taiz y Zieger 2006).

Para que la resistencia inducida se manifieste, debe transcurrir un periodo de tiempo antes de que ocurra la síntesis y el movimiento sistémico de una o varias sustancias del punto de inoculación o inducción a las partes no inoculadas (Agrios 2004). En relación a esto, se tuvo en cuenta que el estadio de crecimiento puede ser un determinante en la inducción de la resistencia de la planta. En *R. solani* esto se pudo ver reflejado en el estadio de reproducción, en donde se observó que todos los extractos pertenecientes a esta etapa causaron alteración en el pigmento de las colonias del fitopatógeno, mientras que en el estadio vegetativo no se observó efecto de los extractos. También se observó una diferencia entre los tratamientos con actinomicetos, en donde MCR24 y MCR26 alteraron la pigmentación característica de las colonias observándose blancas, mientras que MCR9 no causó ningún efecto en el desarrollo de *R. solani*. Por otro lado, se pudo apreciar que MCR24 en el estadio de desarrollo V4, se diferencia de las demás cepas ya que los extractos de raíz fueron los que ocasionaron la inhibición de síntesis de melanina, mientras que los extractos de hojas visiblemente no tuvieron acción. Cuando se hace una comparación con los controles (control de crecimiento, Terbinafina y DMSO+etanol), el color marrón característico del fitopatógeno permanece, esto confirma una vez más que los extractos pueden ser los causantes de esta alteración. Este efecto en la morfología de la colonia consiste en una diferencia en la pigmentación del micelio. Los cultivos de los tratamientos mencionados anteriormente presentan pigmentación marrón claro, mientras que el micelio del resto de los tratamientos se observa blanco (Figura 10). Es probable que los extractos estén ejerciendo estrés sobre el patógeno y éste en respuesta no sintetice melanina, por lo cual el micelio no se observa oscuro (Hyakumachi *et al.* 1987, Abi-Elil y Sharaf 2003). En este caso los extractos pueden ser inhibidores de expresión de factores de patogenicidad, ya que la melanina cumple funciones importantes en los fitopatógenos atribuyendo mecanismos de opresión necesarios en el momento de la infección (Hyakumachi *et al.* 1987, Gómez y Nosanchuk, 2003).

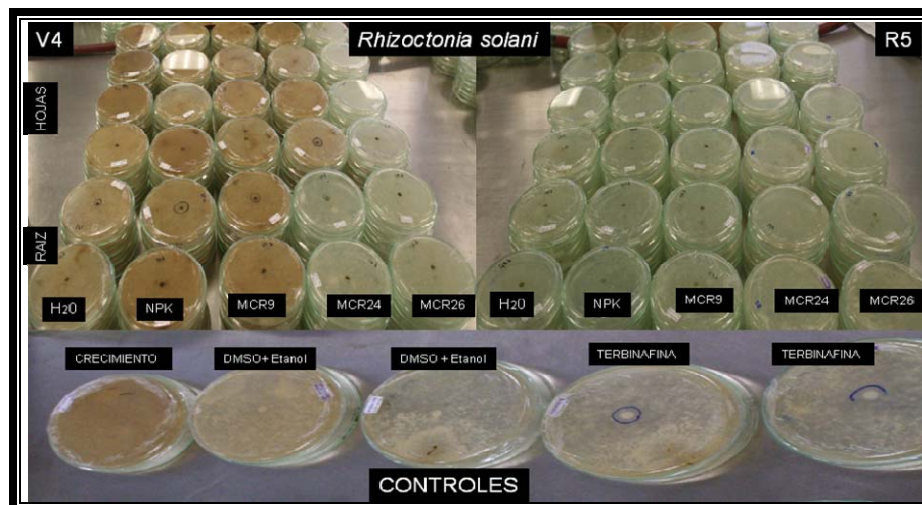


Figura 10. Comparación del efecto en la inhibición de melanina provocado por extractos de frijol frente *R.solani*.

C. lindemuthianum 86 en respuesta al enfrentamiento con los diferentes extractos presentó mayor producción de conidios Figura 11, aunque no se observaron diferencias entre los diferentes tratamientos. De los 60 extractos evaluados, 46 indujeron producción de conidios y en los 14 restantes las colonias se comportaron de igual forma que el control negativo DMSO-etanol y el control de crecimiento sin solvente. Los 14 extractos fueron: VR0-1, VR0-2, VH0-3, VR0-3, VR1-2, VR1-3, VR26-1, VH0-3, VH26-1, VH26-2, RH0-3, RR1-2, RR26-3 y RH24-1. La inducción temprana de producción de conidios puede estar asociada a un efecto de estrés por parte de los extractos.

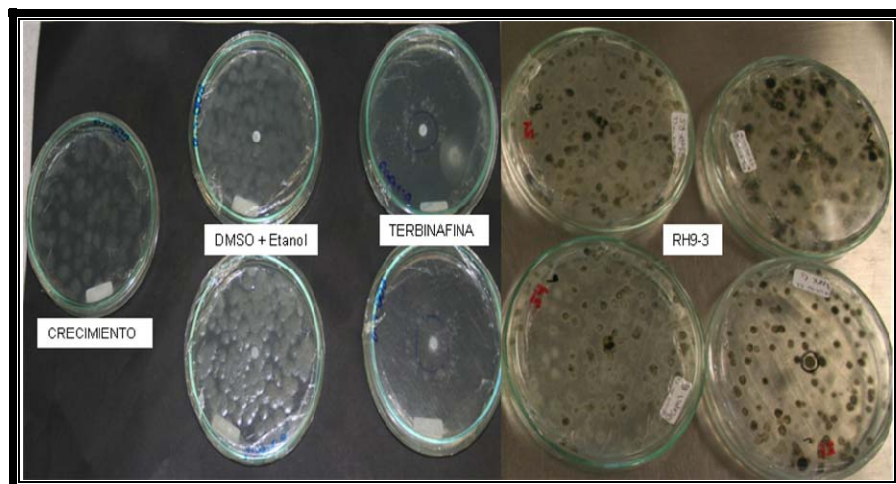


Figura 11. Efecto de esporulación ocasionado por extractos de frijol en *C. lindemuthianum* 86.

Es importante agregar que en la mayoría de los casos es difícil de diferenciar si el compuesto con actividad antimicrobiana se sintetiza por inducción de un elicitor o se sintetiza constitutivamente (fitoanticipinas). Además no se ha comprobado en que parte de la planta puedan encontrarse las mayores concentraciones de las fitoalexinas, se desconoce si su producción está íntimamente relacionada a un fenómeno específico, que ocurre en una etapa en particular de la inducción o de la enfermedad (Granada 2009). Por las razones mencionadas anteriormente se prepararon extractos de tejidos foliares y radicales y se muestreó en dos etapas diferentes de desarrollo, asumiendo que en estadios vegetativos y reproductivos se expresan rutas metabólicas secundarias diferentes. Para diferenciar entre fitoalexinas y fitoanticipinas, la estrategia fue la comparación entre los tratamientos de inoculación con actinomicetos y los controles tratados con agua y fertilizante NPK.

Entre algunas de las características de los compuestos fenólicos existe la posibilidad de volatilización, este fenómeno se puede presentar desde el momento de corte en la planta, así los compuestos fenólicos pierden sus características sutilmente luego de la cosecha (Waterman 1994). Desde el momento que se hace el corte de la planta dividiendo parte aérea de la parte radicular, la planta responde, generando una cadena de reacciones producto de su defensa natural. Para contrarrestar este efecto, las plantas se congelaron en con nitrógeno líquido luego de la cosecha y posteriormente se separaron las porciones aéreas y radicales.

Entre los reportes referentes a obtención de metabolitos secundarios a partir de material vegetal (Granada 2009, Fernández y Gonzales 2009, Márquez *et al.* 2007, entre otros), es importante la cantidad de material vegetal de estudio y por lo tanto la concentración de extracto que se obtenga de cada una de ellos, para posteriormente hacer las pruebas de bioensayo. A pesar que el cultivo de frijol pudo ser más extenso, pero por motivos de espacio no fue posible, se logró coleccionar 2g a 5g de peso seco de los diferentes tejidos y obtener extractos, a partir de 2g de tejido liofilizado, de concentraciones entre 0.017g/mL y 0.05g/ML (ver anexo 3). Aunque se usaron 500µg de extracto para activar los discos de papel filtro, no se pudo observar un marcado efecto de inhibición de crecimiento fúngico. Al parecer la cantidad de extracto para causar inhibición no fue suficiente, se ha descrito que cuando las fitoalexinas se producen en cantidades mínimas, estas pueden tener otra funcionalidad en el desarrollo de la planta. Yoshikawa en el año 1986 hace un estudio en donde prueba concentraciones mínimas de fitoalexinas con ácido indol acético (AIA) para evaluar la producción de raíces adventicias en plantas de frijol, concluyendo que cuando hay producción de fitoalexinas estas pueden no solo estar asociadas a la defensa de la planta, sino que también ejercen una función como cofactor actuando sinérgicamente con otros compuestos, en este caso AIA, promoviendo el enraizamiento (Yoshikawa 1986).

7. CONCLUSIONES

- El acetato de etilo mostró ser el solvente apropiado para la extracción de metabolitos de tejidos de frijol. Gracias a su polaridad media, se extraen mayor número de metabolitos y en mayor concentración, comparando con solventes de diferentes polaridades.
- La selección de la mezcla de solventes bencina de petróleo: acetona, proporción 8:2, como fase móvil para desarrollar las cromatografías de capa delgada, demuestra la baja a media polaridad de los metabolitos extraídos a partir de los tejidos de frijol.
- Los extractos del material vegetal, tanto de hoja como raíz, no mostraron actividad antifúngica en términos de halos de inhibición de crecimiento micelial, sin embargo se observaron otros efectos sobre los fitopatógenos en relación a su pigmentación y producción de conidios, como síntomas de estrés en colonias de *R. solani* y *C. lindemuthianum*, respectivamente.
- La cantidad de extracto requerida para determinar halos de inhibición de crecimiento micelial de los fitopatógenos puede ser mayor de 0.5mg.

8. RECOMENDACIONES

- Teniendo en cuenta que no se observó claramente inhibición de crecimiento micelial de los fitopatógenos evaluados, se recomienda aumentar las concentraciones del extracto vegetal para comprobar la relación y el efecto entre la cantidad de extracto requerida para inhibir a los fitopatógenos.
- La técnica de difusión en placa no es la más apropiada para el estudio de fitoalexinas para el fitopatógeno *Phaeoisariopsis griseola*, pues este no presenta un crecimiento radial extenso. Se recomienda evaluar otras alternativas para determinar actividad biológica de extractos vegetales, por ejemplo inhibición a nivel de germinación.
- El fitopatógeno *R.solani* mostró diferencias morfológicas a nivel macroscópico en respuesta a los extractos de los estadios de crecimiento V4 y R5, esto nos indica que la etapa de desarrollo puede ser determinante en la actividad antimicrobiana, por lo tanto en futuras investigaciones sería pertinente evaluar otros estadios de para verificar esta observación.
- El hecho de no haber determinado actividad antifúngica, no descarta la posibilidad de un efecto de los actinomicetos en la inducción de rutas de metabolismo secundario, por lo que se recomienda examinar los extractos a nivel de grupos funcionales. Esta evaluación requiere cantidades mínimas de extracto y los resultados de presencia de determinados grupos funcionales se puede asociar a la presencia de fitoalexinas.

9. BIBLIOGRAFIA

Abo ellil A, Sharaf E. Growth, Morphologia Alterations and Adaptation of Some Plant Pathogenic Fungi to Benlate and Zineb. A new look. *Online journal of biological sciences* 2003; 3 (3): 271-281p.

Agrios G. *Fitopatología*. Editorial Limusa. México. 2004, 98 p.

Agrios g. *Plant Pathology*. Fifth Edition. Elservier. 2005, 208-247 p.

Arauz, I. *Fitopatología: un enfoque agroecológico*. Editorial de la universidad de costa rica. Costa rica. 1998p

Arias J, JaramilloM, Rengifo T. *Manual: Buenas Prácticas Agrícolas, en la producción de fríjol voluble*. Fao, Corpoica. Medellín. Colombia. 2007. 167p.

Bello C, Gómez R *Evaluación de Mecanismos Directos Relacionados con la Promoción de Crecimiento Vegetal por Parte de Actinomicetos Nativos Colombianos y su interacción con Glomus sp.* **Trabajo de grado** 2009, 1-180p.

Bent E. *Induced Systemic Resistance Mediated by Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and (PGPF)*.2002.

Chen C, Bélanger R, Benhamou N, Paulitz T. Defense Enzymes Induced in Cucumber Roots by Treatment With Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum* *Physiological and molecular plant pathology*. 2000; 56(1): 13-23p.

Dey, Harborne. *Methods in plant biochemistry*. Volúmen 1 Terpenoids. 1991, 152 p.

Devendra k, Choudhary A, Prakash B. Induced Systemic Resistance (ISR) in Plants: Mechanism of Action. *Indian Journal of Pathology and Microbiology* 2007; (47): 289-297p.

Domingo D, López M, Plantas con Acción Antimicrobiana. *Revista Española Quimioterapia*. 2003; 16 (4): 385-393p

Domínguez, A, *Métodos de Investigación fotoquímica*. Distrito federal de méxico.1973.

Duque C, Quintana M. Determinación Preliminar de la Actividad Promotora de Crecimiento Vegetal de Actinomicetos Aislados de suelo. **Trabajo de grado**. 2008, 1-109 p.

Ebel J. Phytoalexin Synthesis. The Biochemical Analysis of the Induction Process. *Annals review of phytopathology*. 1986; (24):235-264p

Fernández D, González C. Evaluación *in vitro* de la Actividad Anti Fúngicas del Extracto Foliar del Árbol *Azadirachta indica* Contra algunos hongos Fitopatógenos. **Trabajo de grado**. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, 2009.

Ferroni J. Evaluación de Respuestas Sistémicas Inducidas en Plantas de Frijol *Phaseolus vulgaris* por la Interacción con Actinomicetos Nativos Colombianos. **Trabajo de grado**. Pontificia Universidad Javeriana. 2009.

Franco-correa M. Aislamiento, Caracterización y Evaluación de Actinomicetos Inhibidores de Algunos Hongos Fitopatógenos. **Tesis de maestría en microbiología**, Departamento de química, instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. 1999, 1-86 p

Franco correa M. Evaluación de Caracteres PGPR en Actinomicetos e Interacciones de estas Rhizobacterias con Hongos Formadores de Micorrizas. **Tesis doctoral**. Facultad de ciencias. Universidad de granada. España 2008, 1-266p.

García R. Fitoalexinas. Mecanismos de Defensa de las Platas. *Revista Chapingo*. México. 2003, 4-10p

Granada S. Caracterización Fitoquímica y Evaluación de la Actividad Fúngica de Material Elicitado y no Elicitado de *Solanum tuberosum* (papa) y su Correlación con la Respuesta Fitoalexina. **Trabajo de grado**. Universidad de Antioquia. 2009.

Gómez B, Nosanchuk J. Melanin and Fungi Current Opinion in Infectious Diseases; 2003, 16(2):91-96p

Harborne J. Phytoalexins, Natural plant Protection. University of reading. *Elsevier* 2003, 1152-1159 p.

Hasegawa M, Mitsuhashi I , Seo S, Imai T, Koga J, Okada K, Yamane H, Ohashi Y. Phytoalexin Accumulation in the Interaction Between Rice and the Blast Fungus *Plant Physiology*. 1986; (82): 864-866p

Hyakumachi M, Yokoyama K. Role of Melanin in Susceptibility and Resistance of *Rhizoctonia solani* to Microbial Lysis. *Transactions of the British Mycological Society* 1987, 89 (1):27-33p

Kevan P, Croft C, Jiittner F, Alan J. Volatile Products of the Lipxygenase Pathway Evolved From *Phaseolus vulgaris* Leaves Inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant physiology*. 1993;101: 13-24p

Krishnaveni S, Liang G, Muthukrishnan S, Manickam A. Purification and Partial Characterization of Chitinases from Sorghum Seed. *Plant science* 1999; 144 1-7p

Lanot A. Elicitation of Isoflavan Phytoalexins. *Springer*. 2005; 355-36p.

Márquez R, Torres C, Mercado A. Actividad Anti Fúngica del Extracto Total en etanol de las Hojas Frescas de *Pedilanthus tithymaloides* L poit. *Ultimorrial. Scientia et technica*. 2007, (8) 033: 155-159p

Maldonado L, Betancourt M, Lozoya E. Local and systemic gene expression of Sesquiterpene Phytoalexin Biosynthetic Enzymes in plant leaves. *European journal of plant pathology*. 2007.

Murphy J, Reddy M, Ryu C, Kloepper J, li R. Rhizobacteria-Mediated Growth Promotion of Tomato Leads to Protection Against *Cucumber Mosaic Virus*. *Phytopathology* 2003, 93 (10): 1301-1307p

Niño F. Evaluación de Metabolitos Secundarios del Hongo *Ganoderma lucidum* con actividad antifúngica frente a *fusarium* spp. De interés clínico. **Trabajo de grado** 2010

Rojas L, Vargas J. Evaluación de la Actividad Enzimática de Quitinasas en Plantas de Frijol *Phaseolus vulgaris* inoculadas con Actinomicetos Nativos Ccolombianos. *Trabajo de grado*. 2009.

Sherma, J, Fried B. Handbook of Thin Layer Chromatography, Segunda Edición. *Ed pennsylvania: dekker*. 1996.

Stenglein S, Aulicino M, Arambarri A, Balatti P. New Media for Increasing Sporulation and Germination of *Phaeoisariopsis griseola* Conidia. *European journal of plant pathology*. 2006, 115:173–180p

Taiz, L, Zeiger E. *Plant physiology*. Fourth Edition. Sinauer Associates. Sunderland. 2006, 316-343 p.

Van loon L, Bakker P, Pieterse C. Systemic Resistance Induces by Rhizosphere Bacteria. *Annual review of phythopathology*, 1998 (36): 453-483p.

Van loon L. Plant Responses to Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *European ournal plant of pathology*.2007; (119): 243–254p

Waterman P, Mole S. *Analysis of phenolic plant metabolites*. Oxford. 1994

Yoshikawa M, Gemma H, Sobajima Y, Masago H. Rooting Cofactor Activity of Plant Phytoalexins. *Plant physiology*. 1986; (82), 864-866p

Universidad Autonoma de Zacatecas. Departamento de biología molecular de plantas. Sinteis de Fitoalexinas. <http://www.uaz.edu.mx/uabe/lbmp/sintesis.htm> consultado el: julio 15 de 2010

10. ANEXOS

ANEXO 10.1 Convención de tratamientos para cada extracto

ESTADIO	TEJIDO	TRATAMIENTO	REPLICA	CODIGO INTER	CONVENCION
V4	RAIZ	Control H2O	1	1	VR0-1
		Control H2O	2	2	VR0-2
		Control H2O	3	3	VR0-3
		Control NPK	1	4	VR1-1
		Control NPK	2	5	VR1-2
		Control NPK	3	6	VR1-3
		Streptomyces MCR9	1	7	VR9-1
		Streptomyces MCR9	2	8	VR9-2
		Streptomyces MCR9	3	9	VR9-3
		Termofida MCR24	1	10	VR24-1
		Termofida MCR24	2	11	VR24-2
		Termofida MCR24	3	12	VR24-3
		Streptomyces MCR26	1	13	VR26-1
		Streptomyces MCR26	2	14	VR26-2
		Streptomyces MCR26	3	15	VR26-3
	HOJAS	Control H2O	1	16	VH0-1
		Control H2O	2	17	VH0-2
		Control H2O	3	18	VH0-3
		Control NPK	1	19	VH1-1
		Control NPK	2	20	VH1-2
		Control NPK	3	21	VH1-3
		Streptomyces MCR9	1	22	VH9-1
		Streptomyces MCR9	2	23	VH9-2
		Streptomyces MCR9	3	24	VH9-3
		Termofida MCR24	1	25	VH24-1
		Termofida MCR24	2	26	VH24-2
		Termofida MCR24	3	27	VH24-3
		Streptomyces MCR26	1	28	VH26-1
		Streptomyces MCR26	2	29	VH26-2
		Streptomyces MCR26	3	30	VH26-3
R5	RAIZ	Control H2O	1	31	RR0-1
		Control H2O	2	32	RR0-2
		Control H2O	3	33	RR0-3
		Control NPK	1	34	RR1-1

ESTADIO	TEJIDO	TRATAMIENTO	REPLICA	CODIGO INTER	CONVENCION
		Control NPK	2	35	RR1-2
		Control NPK	3	36	RR1-3
		Streptomyces MCR9	1	37	RR9-1
		Streptomyces MCR9	2	38	RR9-2
		Streptomyces MCR9	3	39	RR9-3
		Termofida MCR24	1	40	RR24-1
		Termofida MCR24	2	41	RR24-2
		Termofida MCR24	3	42	RR24-3
		Streptomyces MCR26	1	43	RR26-1
		Streptomyces MCR26	2	44	RR26-2
		Streptomyces MCR26	3	45	RR26-3
	HOJAS	Control H2O	1	46	RH0-1
		Control H2O	2	47	RH0-2
		Control H2O	3	48	RH0-3
		Control NPK	1	49	RH1-1
		Control NPK	2	50	RH1-2
		Control NPK	3	51	RH1-3
		Streptomyces MCR9	1	52	RH9-1
		Streptomyces MCR9	2	53	RH9-2
		Streptomyces MCR9	3	54	RH9-3
		Termofida MCR24	1	55	RH24-1
		Termofida MCR24	2	56	RH24-2
		Termofida MCR24	3	57	RH24-3
		Streptomyces MCR26	1	58	RH26-1
		Streptomyces MCR26	2	59	RH26-2
		Streptomyces MCR26	3	60	RH26-3

ANEXO10.2. Tabla con Rf de MCR24 y NPK ensayo preliminar en CCD.

Fracción	Característica	Luz blanca (Rf)	Pigmentación	Luz UV onda larga (Rf)	Pigmentación	Luz UV onda corta (Rf)	Pigmentación	Revelador vanilina
E1 (crudo etanol MCR24)	amarilla	0,23	roja	0,23	gris	0,23	amarillo	0,18
	crema cl	0,33	roja	0,33	verde cl	0,38	gris	0,33
	café cl	0,38	roja	0,38	verde	0,45	verde cl	0,38
	verde cl	0,45	roja	0,45			verde	0,45
B1 (Bencina MCR24)	crema	0,05	naranja	0,05	gris	0,23	azul	0,05
	amarilla	0,23	naranja	0,09	verde cl	0,38	azul	0,23
	café	0,33	gris	0,23	verde	0,45	verde cl	0,33
	verde	0,38	roja	0,33	gris	0,93	verde cl	0,38
	verde	0,45	negro	0,38			verde	0,45
	amarilla	0,93	negro	0,45			gris	0,56
			rosado	0,62			azul	0,93
			azul	0,78				
			verde	0,93				
D1 (Dicloro- metano MCR24)	verde	0,05	naranja	0,05	gris	0,23	negro	0,05
	amarilla	0,23	naranja	0,09	verde cl	0,38	verde	0,23
	café	0,33	naranja	0,23	verde	0,45	verde cl	0,33
	verde	0,38	roja	0,33	negro	0,78	verde	0,38
	verde	0,45	negro	0,38			verde	0,45
			negro	0,45			gris	0,56
			azul	0,78				
A1 (Acetato de etilo MCR24)	café claro	0,18	naranja	0,09	gris	0,23	negro	0,05
	amarilla	0,23	negro	0,23	verde	0,38	gris	0,18
	gris	0,33	roja	0,33	verde	0,45	verde	0,23
	café	0,38	gris	0,38	gris	0,52	verde cl	0,33
	verde	0,45	negro	0,45	negro	0,78	verde	0,38
	amarilla	0,93	rosado	0,62	gris	0,93	verde	0,45
			verde cl	0,78			azul	0,56
			verde	0,93			gris	0,62
							azul	0,93
E2 (crudo etanol NPK)	gris	0,23	naranja	0,23	gris	0,52	gris	0,18
	verde	0,38	rosado	0,33			gris	0,23

Fracción	Característica	Luz blanca (Rf)	Pigmentación	Luz UV onda larga (Rf)	Pigmentación	Luz UV onda corta (Rf)	Pigmentación	Revelador vanilina
	verde	0,45	rosado	0,38			verde cl	0,38
			rosado	0,45			verde	0,45
B2 (Bencina NPK)	café cl	0,18	amarillo	0,05	gris	0,23	negro	0,05
	amarilla	0,23	amarillo	0,09	verde cl	0,38	gris	0,18
	gris	0,33	naranja	0,18	verde	0,45	verde	0,23
	café	0,38	naranja	0,23	gris	0,52	verde cl	0,33
	verde	0,45	roja	0,38	gris	0,93	verde	0,38
	amarilla	0,93	negro	0,45			verde	0,45
			azul	0,62			azul	0,56
			verde	0,78			azul	0,62
			verde	0,93			verde	0,93
D2 (Dicloro-Metano NPK)	café cl	0,05	rosado	0,05	verde	0,38	gris	0,18
	amarilla	0,23	rosado	0,09	verde	0,45	gris	0,23
	verde	0,38	rosado	0,18			gris	0,33
	verde	0,45	amarillo	0,23			verde cl	0,38
			rosado	0,33			verde	0,45
			roja	0,38				
			roja	0,45				
			verde	0,78				
A2 (Acetato Etilo NPK)	verde cl	0,18	amarilla	0,05	gris	0,23	negro	0,18
	amarilla	0,23	naranja	0,09	verde cl	0,38	negro	0,23
	gris	0,33	naranja	0,18	verde	0,45	verde cl	0,33
	café cl	0,38	naranja	0,23	gris	0,52	verde cl	0,38
	verde	0,45	roja	0,33	gris	0,93	verde	0,45
	amarilla	0,93	roja	0,38			azul	0,56
			negra	0,45			azul	0,62
			blanca	0,62			verde	0,93
			azul	0,78				
			verde	0,93				
FH1 (Fracción hidroalcohólica MCR24)			verde	0,38	gris	0,52	gris	0,45
			verde	0,45				

Fracción	Característica	Luz blanca (Rf)	Pigmentación	Luz UV onda larga (Rf)	Pigmentación	Luz UV onda corta (Rf)	Pigmentación	Revelador vanillina
B3 (Bencina liq-liq MCR24)	verde cl	0,18	naranja	0,09	gris	0,23	gris	0,05
	verde cl	0,23	roja	0,23	verde	0,32	verde	0,18
	gris	0,33	roja	0,33	verde	0,38	verde	0,23
	café	0,38	roja	0,38	verde	0,45	negro	0,33
	verde	0,45	negra	0,45	negro	0,52	verde cl	0,38
	crema	0,93	azul	0,56			verde	0,45
			azul	0,62			gris	0,56
			azul	0,78			verde	0,93
			verde	0,93				
D3 (Dicloro- metano liq-liq MCR24)	amarilla cl	0,23	naranja	0,05	gris	0,23	negro	0,23
	gris	0,33	rosado	0,09	gris	0,32	gris	0,33
	café	0,38	rosado	0,18	gris	0,38	verde cl	0,38
	verde	0,45	naranja	0,23	verde	0,52	verde cl	0,45
			rojo	0,33			azul	0,56
			rojo	0,38				
			rojo	0,45				
			azul	0,56				
A3 (Acetato de etilo liq-liq MCR24)			rosado	0,38				
			rosado	0,45				
FH2 (Fraccion hidroalcoholica NPK)	gris	0,45	rojo	0,38	gris	0,52	gris	0,45
			rojo	0,45				
B4 (Bencina liq-liq NPK)	café cl	0,18	rojo	0,09	negro	0,23	negro	0,05
	café	0,23	negro	0,18	gris	0,32	negro	0,23
	gris	0,33	rojo	0,23	verde	0,38	negro	0,33
	café	0,38	rojo	0,33	verde	0,45	negro	0,38
	verde	0,45	negro	0,38	verde	0,52	negro	0,45
	amarilla	0,93	negro	0,45	gris	0,93	gris	0,56
			rosado	0,56			verde	0,93

Fracción	Característica	Luz blanca (Rf)	Pigmentación	Luz UV onda larga (Rf)	Pigmentación	Luz UV onda corta (Rf)	Pigmentación	Revelador vanillina
			rosado	0,62				
			azul	0,78				
			verde	0,93				
D4 (Dicloro- metano liq-liq NPK)	verde cl	0,05	rojo	0,05	gris	0,23	negro	0,23
	amarilla	0,23	rosado	0,09	gris	0,32	negro	0,33
	crema	0,33	gris	0,18	gris	0,38	negro	0,38
	verde cl	0,38	rojo	0,23	verde	0,45	negro	0,45
	verde	0,45	rojo	0,33	verde	0,52	gris	0,56
			rojo	0,38			gris	0,93
			negro	0,45				
			azul	0,56				
			azul	0,62				
A4 (Acetato de etilo liq-liq NPK)	crema	0,23	rosado	0,05	gris	0,23	negro	0,23
	verde cl	0,33	gris	0,09	gris	0,32	negro	0,33
	café	0,38	rojo	0,18	gris	0,38	negro	0,38
	verde	0,45	rojo	0,33	verde	0,45	negro	0,45
			rojo	0,38	verde	0,52	negro	0,56
			rojo	0,45			gris	0,93

ANEXO 10.3. Pesos y Concentraciones de los extractos obtenidos.

ETAPA	TEJIDO	TRATAMIENTO	REPLICA	PESO seco EXT (g)	CONCENTRACION EXT (g/mL)RAIZ
V4	RAIZ	H ₂ O	1	0,0613	0,03065
V4	RAIZ	H ₂ O	2	0,1867	0,09335
V4	RAIZ	H ₂ O	3	1,0519	0,52595
V4	RAIZ	NPK	1	0,1239	0,06195
V4	RAIZ	NPK	2	0,1088	0,0544
V4	RAIZ	NPK	3	0,083	0,0415
V4	RAIZ	CEPA 9	1	0,2617	0,13085
V4	RAIZ	CEPA 9	2	0,0356	0,0178
V4	RAIZ	CEPA 9	3	0,0679	0,03395
V4	RAIZ	CEPA 24	1	0,1623	0,08115
V4	RAIZ	CEPA 24	2	0,1464	0,0732
V4	RAIZ	CEPA 24	3	0,0423	0,02115
V4	RAIZ	CEPA 26	1	0,1369	0,06845
V4	RAIZ	CEPA 26	2	0,1074	0,0537
V4	RAIZ	CEPA 26	3	0,1929	0,09645
V4	HOJAS	H ₂ O	1	0,1636	0,0818
V4	HOJAS	H ₂ O	2	0,2157	0,10785
V4	HOJAS	H ₂ O	3	0,1726	0,0863
V4	HOJAS	NPK	1	0,1797	0,08985
V4	HOJAS	NPK	2	0,1088	0,0544
V4	HOJAS	NPK	3	0,1175	0,05875
V4	HOJAS	CEPA 9	1	0,1006	0,0503
V4	HOJAS	CEPA 9	2	0,1661	0,08305
V4	HOJAS	CEPA 9	3	0,1807	0,09035
V4	HOJAS	CEPA 24	1	0,0901	0,04505
V4	HOJAS	CEPA 24	2	0,1757	0,08785
V4	HOJAS	CEPA 24	3	0,1574	0,0787
V4	HOJAS	CEPA 26	1	0,1533	0,07665
V4	HOJAS	CEPA 26	2	0,1925	0,09625
V4	HOJAS	CEPA 26	3	0,1936	0,0968
R5	RAIZ	H ₂ O	1	0,1356	0,0678
R5	RAIZ	H ₂ O	2	0,1316	0,0658
R5	RAIZ	H ₂ O	3	0,0967	0,04835
R5	RAIZ	NPK	1	0,2528	0,1264
R5	RAIZ	NPK	2	0,3471	0,17355

R5	RAIZ	NPK	3	0,3746	0,1873
R5	RAIZ	CEPA 9	1	0,1872	0,0936
R5	RAIZ	CEPA 9	2	0,1498	0,0749
R5	RAIZ	CEPA 9	3	0,2258	0,1129
R5	RAIZ	CEPA 24	1	0,141	0,0705
R5	RAIZ	CEPA 24	2	0,198	0,099
R5	RAIZ	CEPA 24	3	0,0876	0,0438
R5	RAIZ	CEPA 26	1	0,1359	0,06795
R5	RAIZ	CEPA 26	2	0,1583	0,07915
R5	RAIZ	CEPA 26	3	0,321	0,1605
R5	HOJAS	H ₂ O	1	0,1353	0,06765
R5	HOJAS	H ₂ O	2	0,1978	0,0989
R5	HOJAS	H ₂ O	3	0,2007	0,10035
R5	HOJAS	NPK	1	0,3135	0,15675
R5	HOJAS	NPK	2	0,2194	0,1097
R5	HOJAS	NPK	3	0,2086	0,1043
R5	HOJAS	CEPA 9	1	0,1374	0,0687
R5	HOJAS	CEPA 9	2	0,1315	0,06575
R5	HOJAS	CEPA 9	3	0,1831	0,09155
R5	HOJAS	CEPA 24	1	0,1973	0,09865
R5	HOJAS	CEPA 24	2	0,1924	0,0962
R5	HOJAS	CEPA 24	3	0,1747	0,08735
R5	HOJAS	CEPA 26	1	0,2192	0,1096
R5	HOJAS	CEPA 26	2	0,2113	0,10565
R5	HOJAS	CEPA 26	3	0,2683	0,13415

ANEXO 10.4. Medio de cultivo

MEDIO AVENA		
Componentes	Cantidad (g/L)	Preparacion
Harina de avena	20	Disolver la harina de avena y el agar bacteriologico y aforar a un litro con agua destilada calentar hasta ebullición, tapar y autoclavar por 15 minutos a 121°C.
Agar bacteriológico	15	
MEDIO MULLER HINTON MODIFICADO		
Componentes	Cantidad (g/L)	Preparacion
Glucosa	20	Disolver la glucosa, peptona de caseina, almidón, extracto de carne y el agar agar, aforar a un litro con agua destilada calentar hasta ebullición, agregar el azul de metileno, tapar y autoclavar por 15 minutos a 121°C.
Azul de metileno	100 µL por litro	
Peptona de caseína	17,5	
Almidon	1,5	
Extracto de carne	4	
Agar-agar	15	
Agar bacteriológico	15	
AGAR PAPA DEXTROSA		
Componentes	Cantidad (g/L)	Preparacion
Papa Parda Comercial	200	se adiciona 200gramos de papa en un litro de agua destilada, hirviendo, decantándose y aforrándose agregándole 15 gramos de agar-agar, luego se autoclavar por 15 minutos a 121°C.
Agar-Agar	15	