



Acta Agronómica

ISSN: 0120-2812

actaagronomica@palmira.unal.edu.co

Universidad Nacional de Colombia

Colombia

Leguízamo, María Claudia; Sánchez de Prager, Marina; Martínez, Javier; Vela, Diana; Clavijo, Sharon;  
García, Alexandra

Control de *Fusarium* spp. y *Bacillus subtilis* mediante metabolitos de *Xenorhabdus bovienii* mutualista  
de *Steinernema feltiae*

Acta Agronómica, vol. 63, núm. 1, 2014, pp. 1-10

Universidad Nacional de Colombia

Palmira, Colombia

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169930903008>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

# Control de *Fusarium* spp. y *Bacillus subtilis* mediante metabolitos de *Xenorhabdus bovienii* mutualista de *Steinernema feltiae*

## Control of *Fusarium* spp and *Bacillus subtilis* through metabolites of *Xenorhabdus bovienii* mutualist of *Steinernema feltiae*

María Claudia Leguízamo\*, Marina Sánchez de Prager, Javier Martínez, Diana Vela, Sharon Clavijo y Alexandra García

Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Autora para correspondencia: mariaclaulb@gmail.com

Rec.:10.30.2013 Acep.: 01.30.2014

### Resumen

En el estudio se evaluó la actividad antimicrobiana de metabolitos de *Xenorhabdus bovienii* (Enterobacteriaceae), mutualista del nemátodo entomoparásito *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) (clamidosporas, Cephalobina, Steinernematidae) sobre *Fusarium* spp. y *Bacillus subtilis*. *Xenorhabdus bovienii*, se extrajo a partir de larvas de *Galleria mellonella* infectadas con *S. feltiae* e incubadas en biorreactor. Su crecimiento fue medido en intervalos de 4 h durante 96 h de cultivo, en las cuales se extrajeron metabolitos por las metodologías: compuestos orgánicos, proteínas, indol, metanol, columna para cromatografía y butanol. Se utilizaron cuatro concentraciones de metabolitos de *X. bovienii* que se probaron contra *B. subtilis* y *Fusarium* spp., en semillas de tomate variedad Santa Clara mediante la medición del halo de inhibición (mm) por la presencia de macro- y microconidias y clamidosporas. *Xenorhabdus bovienii* presentó mayor crecimiento y presencia de metabolitos entre 16 y 40 h de incubación. La máxima inhibición ocurrió con concentraciones de 100% durante los primeros muestreos. En *Fusarium* spp., la inhibición del crecimiento micelial coincidió con menor presencia de macro- y microconidias y clamidosporas. No se encontraron efectos fitotóxicos de los metabolitos probados sobre las plántulas de tomate.

**Palabras Clave:** *Bacillus subtilis*., control biológico, *Fusarium* spp., metabolitos secundarios, *Xenorhabdus bovienii*.

### Abstract

The antimicrobial activity of metabolites of *Xenorhabdus bovienii* (Enterobacteriaceae) was evaluated, mutualist of the entomoparasite nematode *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) (Cephalobina, Steinernematidae) over *Fusarium* spp. and *B. subtilis*. *X. bovienii* was purified from *Galleria mellonella* larvae infected with *S. feltiae* and extracted in a bioreactor. Its growth was sampled at intervals of 4h for 96h of culture, a time on which metabolites were extracted by using six methods: organic compounds, proteins, Indole compounds, methanol, column chromatography and butanol. The metabolites extracted from *X. bovienii* at four concentrations were faced with *B. subtilis* and *Fusarium* spp. in tomato seeds, Santa Clara's variety. The inhibition halo (mm) was assessed for *B. subtilis* and for *Fusarium* in the presence of macro, microconidia, and chlamydospores. Phytotoxicity was assessed. *X. bovienii* showed higher growth and the presence of metabolites in the first 16-20 h of incubation up to 40h. The maximum inhibition occurred at concentrations of 100% and early sampling. In *Fusarium* spp. mycelial growth inhibition coincided with a lower presence of macro, microconidia, and chlamydospores. No phytotoxic effects of the metabolites tested were observed. The

potential of *X. bovienii* was tested for control of *Fusarium* spp. and *B. subtilis* as a microorganism sensitive to changes by these metabolites.

**Key Words:** *Bacillus subtilis*, biological control, *Fusarium* spp, secondary metabolites, *Xenorhabdus bovienii*.

## Introducción

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una hortaliza de importancia económica en el Valle del Cauca, Colombia, donde se siembra en monocultivo por pequeños productores, sistema que ha incidido en el aumento de plagas y enfermedades que incrementan considerablemente los costos de producción. Varias especies del género *Fusarium* causan daños considerables en el tallo y la raíz de la planta de tomate, un hongo cuyas estructuras de resistencia (clamidosporas) pueden permanecer en el suelo durante años. Para el control de patógenos en tomate es frecuente la aplicación no controlada de altas dosis de productos de síntesis química, no obstante aquellos mutan y se adaptan con facilidad a las nuevas condiciones, afectando el medio ambiente (Info-agro, 2011). Por lo anterior, es cada vez más urgente el uso de prácticas de control biológico que, comparadas con el uso de productos de síntesis química, son menos contaminantes del medio ambiente, ya que estos controladores y antagonistas tienen varias estrategias de acción; entre ellas, la producción de metabolitos secundarios presentes en los organismos o sus simbioses, los cuales pueden ser aislados y multiplicados para uso en este tipo de control (Xu, 1998).

El complejo *S. feltiae* – *X. bovienii* posee un amplio rango de hospederos y habilidades para buscar e introducir sus bacterias mutualistas dentro del cuerpo de los insecto, ocasionando septicemia dentro de 24 a 48 h siguientes y superando las reacciones inmunológicas presentadas en la hemolinfa como defensa celular (Parada et al., 2006; Martínez, 2010).

La cepa Colombia del ciclo de vida del complejo *S. feltiae* - *X. bovienii* ha sido ampliamente documentado por Triviño (2006) y Martínez (2010). La capacidad de control biológico de este complejo se basa en el hecho que la bacteria produce metabolitos secundarios con capacidad antibiótica, que actúan como alternativas de defensa y comunicación con otras especies. En *X. bovienii* se distinguen las fases de crecimiento FI y FII, las cuales en medio de cultivo se diferencian por su morfología, fisiología y expresión (Xu, 1998; Triviño, 2006).

En cultivos o en soluciones puras de especies de *Xenorhabdus* se han encontrado fuentes naturales de antibióticos como indoles, xenorhabdinas y xenocumacinas, que son de uso tanto para el área médica como en agronomía (Xu, 1998). Aunque en Colombia en la última década ha crecido el interés y la demanda por el uso de los nemátodos entomoparásitos para el control de estas plagas (Parada et al., 2006), poco se ha explorado la actividad antimicrobiana de las bacterias asociadas con *Xenorhabdus* sp. y *Photorhabdus* sp., simbioses de *Steinernema* spp. y *Heterorhabditis* sp., respectivamente. Este trabajo tuvo como objetivo contribuir al desarrollo de esta alternativa de control biológico y evaluar la actividad antimicrobiana de algunos metabolitos

secundarios de la bacteria *X. bovienii* mutualista del nemátodo entomoparásito *S. feltiae* (Filipjev, 1934) sobre aislados de *Fusarium* spp., habitante de suelo y de la rizósfera del cultivo de tomate.

## **Materiales y métodos.**

El trabajo comprendió tres etapas: (1) obtención de cultivos puros de los microorganismos *Fusarium* spp., *X. bovienii* y *B. subtilis*, siendo esta última la bacteria control, dada su alta susceptibilidad a metabolitos de *X. bovienii* (Xu, 1998); (2) pruebas de patogenicidad para seleccionar los aislamientos de *Fusarium* spp., altamente patogénicos sobre tomate variedad Santa Clara. En esta misma etapa se determinó la cinética de crecimiento y se obtuvieron los metabolitos secundarios de caldo bacteriano de *X. bovienii* mediante seis metodologías de extracción; y (3) se evaluó la actividad antimicrobiana de los metabolitos sobre *B. subtilis* y *Fusarium* spp., su toxicidad sobre semillas y plántulas de tomate variedad Santa Clara.

Los muestreos de campo se realizaron en 2008 en los municipios de Santa Elena (SE), Guacarí (Gu), Media Canoa (MC), El Bolo (B), y Toro en el Departamento del Valle del Cauca, y en Puerto Tejada (PT) en el Departamento de Cauca. Las muestras de suelo tomadas en los cultivos y consistentes en rizósfera y material vegetal con posibles síntomas de *Fusarium* fueron analizadas en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. En los aislamientos se identificó *Fusarium* spp., el cual en forma pura se utilizó para las pruebas de patogenicidad en semillas de tomate variedad Santa Clara (Duarte, 2007). Como indicador se utilizó un cultivo puro de *B. subtilis*, facilitado por la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, y altamente sensible a metabolitos de *X. bovienii* (Xu, 1998).

La obtención de los metabolitos secundarios de *X. bovienii* se hizo a partir de larvas de *Galleria mellonella* infectadas con *S. feltiae* e incubadas en biorreactor 3L con medio NBTA; posteriormente se estimó la cinética de crecimiento en intervalos de muestreo cada 4 h durante 96 h de cultivo. Del material recolectado se extrajeron metabolitos por los métodos propuestos por Xu (1998): 1. Compuestos orgánicos, 2. Proteínas, 3. Compuestos de indol, 4. Metanol, 5. Columna para cromatografía, y 6. Butanol.

Los metabolitos de *X. bovienii* fueron evaluados contra *B. subtilis* y *Fusarium* spp., en cuatro concentraciones (100, 75, 50 y 25%) para cada metodología de extracción, en las cuales se utilizaron sensidiscos (papel filtro, Whatman) durante 40 segundos durante los cuales se observó la formación de halos de inhibición (mm), que fueron medidos 24 h después de sembrados e incubados con ambos microorganismos. Además, se observó la presencia de macro y microconidias y clamidosporas presentes en los medios de cultivo CLA (Carnation Leafpiece- Agar) y SNA (Spezieller Nahorstoffar Agar) (Lara et al., 2010).

Para el estudio de la fitotoxicidad de estos metabolitos sobre los patógenos, las semillas de tomate impregnadas con cada solución se dividieron en cuatro grupos que fueron colocados en cajas de Petri con cada una de las cuatro diluciones según las horas de cada tratamiento. Al

finalizar este periodo fueron sembradas en suelo estéril y llevadas a cámara de crecimiento controlado. El monitoreo se hizo durante 10 días hasta la obtención de plántulas de 10 cm de longitud, aproximadamente, teniendo en cuenta la formación de zonas decoloradas y la presencia de manchas. Los tratamientos se dispusieron en un diseño completamente al azar y los datos se analizaron con el programa SAS ® 9.2 y las comparaciones entre medias por la prueba de Duncan ( $P < 0.05$ ).

## Resultados y discusión

### Aislamiento de los microorganismos

De acuerdo con la escala de daño propuesta por Duarte (2007) —0 = semilla sana; 1 = daño de una porción de la semilla en contacto con el micelio; 2 = tegumento de la semilla invadido por micelio y esclerocios, pero la plántula aparenta estar sana; 3 = tegumento de la semilla libre del hongo, pero la plántula infectada; 4 = Tegumento de la semilla y plántula infectadas; 5 = Semilla infectada y no germinada— en este estudio de 13 aislamientos, seis presentaron una severa incidencia de patógenos.

Los aislamientos de *Fusarium* spp., obtenidos en los muestreos efectuados en el Departamento del Valle del Cauca mostraron la mayor incidencia, siendo más incidentes A12 (SETM1M4), A1 (GUM1R2), A13 (SETMF1M6), A4 (GUM5R2), A5 (GUM6R1) y A7 (BTa1), el grado de incidencia sobre estos tres últimos fue similar ( $P > 0.05$ ). Por su parte *B. subtilis* fue identificada como Cepa C-4.

### Cinética de crecimiento y extracción de metabolitos de *X. bovienii*

El cultivo puro de *X. bovienii* obtenido en biorreactor presentó un crecimiento diferente durante las 96 h de evaluación. En la curva de crecimiento la mayor pendiente ocurrió entre 16 y 20 h seguido por una fase de crecimiento con pendiente constante hasta 32 h, a partir; a partir de este punto y hasta 72 h ocurrió una atenuación de crecimiento para estabilizarse hasta 96 h. Después del secado en rotavapor al final de 36 h se obtuvo 1 ml de un líquido de consistencia aceitosa y color ámbar el cual aumentó hasta un promedio máximo de 1.5 ml, para obtener finalmente un concentrado máximo de 500 µl.

**Actividad antimicrobiana de los metabolitos secundarios sobre *Bacillus subtilis*.** El método de extracción del metabolito, las concentraciones evaluadas y el tiempo de exposición, así como la interacción de estos últimos mostraron diferencias ( $P < 0.05$ ) (Cuadro 1)

Con excepción de la proteínas (Vela, 2009), los metabolitos extraídos por las cinco metodologías utilizadas disminuyeron significativamente el crecimiento de esta bacteria (Cuadro 2). La mayor inhibición ocurrió cuando el metabolito se utilizó puro sin dilución (100%) y la mayor

antibiosis sobre *B. Subtillis* se presentó cuando los metabolitos de *X. bovienii* se extrajeron entre 8 y 12h.

**Sobre *Fusarium* spp.** El método de extracción y la concentración de los metabolitos de *X. bovienii* así como el tiempo de exposición mostraron diferencias ( $P < 0.05$ ) en los halos de inhibición (Cuadro 3). Al igual que en *B. subtilis*, los halos de inhibición de los aislamientos mostraron mayor efecto cuando se aplicó la concentración 100% y una extracciones entre 0 y 40 h.

### **Esporulación y formación de estructuras de aislamientos de *Fusarium* spp.**

Se encontraron diferencias ( $P < 0.05$ ) entre aislamientos y medios de cultivo (CLA y SNA) para la expresión de macro y microconidias, no así para clamidosporas en las cuales sólo se detectaron cambios entre medios de cultivo. El tiempo de incubación durante el cual se extrajeron los metabolitos secundarios afectó significativamente estas tres estructuras.

Para las clamidosporas el medio de cultivo más favorable fue CLA, ya que carece de fuentes de carbohidratos lo que estimula la formación de estructuras de resistencia durante las primeras 20 h. Para las macro y microconidias, las interacciones no presentaron diferencias ( $P > 0.05$ ) lo que indica que la presencia y expresión de estas estructuras sólo fueron dependientes del medio de cultivo y del tiempo de extracción del metabolito (Cuadros 4 y 5).

### **Fitotoxicidad de los metabolitos**

Los metabolitos aplicados en concentraciones entre 25 y 100% no afectaron el desarrollo del cultivo de tomate variedad Santa Elena. Según Xu (1998) en el ciclo de vida de *X. bovienii* en simbiosis con el nemátodo *S. feltiae*, una vez la bacteria es liberada por el nemátodo, su población se multiplica rápidamente y produce varios metabolitos que superan el sistema inmunológico del insecto que les sirve como hospedero, ocasionándole la muerte por septicemia dentro de 24 a 48 h siguientes. La respuesta inhibitoria a los metabolitos extraídos de *X. bovienii* en todas las metodologías probadas sobre *B. subtilis* y los aislamientos de *Fusarium* spp. (con excepción de proteínas) fue alta especialmente en las primeras horas de incubación (4, 8, 12, 16, 20 h).

*Xenorhabdus bovienii* digiere rápidamente el insecto hospedero y lo hace disponible para ser utilizado como alimento del nemátodo *S. feltiae*, además, produce metabolitos secundarios que evitan la infección y proliferación de organismos oportunistas (hongos, bacterias e inclusive otros nemátodos) en el cadáver de la larva parasitada. No obstante la presencia de estos compuestos antimicrobianos depende de las horas de muestreo y de los métodos de extracción, identificando algunos metabolitos como xenorhabdinas, nematophinas y xenocumacinas, entre otros (Xu, 1998).

Los resultados en este estudio muestran potencialidades de biocontrol de *Fusarium* spp., por parte de *X. bovienii* considerando, posiblemente, no sólo metabolitos aislados sino el medio

de cultivo en su conjunto (compuestos integrantes del medio ricos en nutrientes, metabolitos secretados por la bacteria e inclusive, las poblaciones de *X. bovienii*).

## Conclusiones

- Con una probabilidad de 95% se puede asegurar que *B. subtilis* es altamente sensible a la actividad antibiótica de *X. bovienii* y fue válido utilizar esta bacteria como microorganismo indicador.
- Se observó la efectividad de los metabolitos secundarios obtenidos sobre el hongo *Fusarium* spp., afectando sus estructuras de resistencia.
- No obstante este hongo se sigue presentando como un limitante en diversos cultivos incluyendo tomate. Se requieren, por tanto, desarrollar nuevas alternativas de control biológico con otros organismos que puedan sustituir o complementar los controladores de síntesis química, tal como la planteada en este trabajo.
- Los metabolitos secundarios de la bacteria *X. bovienii* no presentaron actividad fitotóxica en semillas ni en plántulas de tomate variedad Santa Clara.
- Independiente del método de extracción, la mayor antibiosis sobre *B. subtilis* se presentó cuando los metabolitos de *X. bovienii* se extrajeron entre 8 y 12 h, tiempo en el cual ocurre la fase I de crecimiento de la bacteria y se expresa la mayor cantidad de metabolitos secundarios con propiedades antibióticas.

## Agradecimientos

A Colciencias por la financiación del Macroproyecto Escalado y Formulación Industrial de *Steinernema feltiae* (Cephalobina: Steinernematidae) Cepa Colombiana y su Bacteria Simbionte *Xenorhabdus bovienii* (Enterobacteriaceae) para el Control de Insectos y Fitopatógenos, que dio origen y apoyo parcial a esta investigación. A la Dirección de Investigaciones – UN Palmira (DIPAL), a los empleados del Laboratorios de Microbiología (Facultad de Ciencias Agropecuarias– Palmira), Biología (Facultad de Ciencias -Bogotá) y Malherbología (Facultad de Agronomía-Bogotá), por apoyo en infraestructura, conocimiento y calidad humana. A Rosa Cristina Martínez por su colaboración en la revisión y estructuración del documento.

## Referencias

- Duarte, S. 2007. Pruebas de patogenicidad de microorganismos aislados de palmas, afectadas por marchitez letal. Tesis de Grado. Microbiología Agrícola y Veterinaria, Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias en Microbiología Agrícola y Veterinaria, Bogotá D.C. 112 p.
- Fodor A; Fodor A.; Forst S.; Hogan J.; KleinM.; Lengyel K.; Sáringer G.; Stackebrandtm E.; Taylor, R.; y Lehoczky, E. 2010. Comparative analysis of antibacterial activities of *Xenorhabdus* species on related and non-related bacteria in vivo. J. Microbiol. Antimicrob. 2(4):36 - 46.
- Infoagro. 2005. El cultivo del tomate. Disponible en: <http://www.infoagro.com/hortalizas/tomate.htm>. [Revisado: 13 septiembre de 2011].
- Lara, C; Mendoza, C.; y Oviedo, L. 2010. Productividad y selectividad del medio de cultivo a partir de guayaba agria (*Psidium araca*) en el crecimiento de levaduras nativas del género *Candida* sp., Rev. Col. Biotechn. 12(2):119 - 125.

- Martínez, J. 2010. Determinación de parámetros básicos de escalamiento en la producción del Nemátodo entomoparásito *Steinernema feltiae* como controlador biológico de insectos plaga en medio líquido. Tesis de Grado M.Sc. Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, Maestría en Ingeniería Química, Bogotá D.C. 122 p.
- Parada, J.; Luque, E. y Piedrahita, W. 2006. Nemátodos entomoparásitos. Experiencias y perspectivas, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 197 p.
- Triviño, J. 2006. Biología Básica de *Steinernema feltiae* En: Parada, J.; Luque, J.; Piedrahita C. (eds.). Nemátodos entomoparásitos. Experiencias y perspectivas. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, p. 42 - 59
- Vela, D. 2009. Informe Final Metodologías de Obtención de Metabolitos Secundarios con Capacidad Antibiótica, dentro del proyecto Escalado y Formulación industrial de *Steinernema feltiae* (Cephalobina Steinernematidae) cepa Colombia y su bacteria simbiote *Xenorhabdus bovienii* (Enterobacteriaceae) para el control de insectos y fitopatógenos", Estudiante de Química Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá.
- Xu, Ch., 1998. The stability and cytotoxic properties of Xenorhabdies and Xenorhabdins, Secondary metabolites of the entomopathogenic nematode symbiont, *Xenorhabdus bovienii* (enterobacteriaceae). Tesis, M.Sc., Simon Fraser University. 222p.

**Cuadro 1.** Análisis de varianza del efecto inhibitorio sobre *Bacillus subtilis* de metabolitos secundarios de *X. bovienii* obtenidos por diferentes métodos de extracción, tiempos y concentraciones.

F.V.	G.I.	<i>Bacillus subtilis</i>	
		CM	Pr > F
Método de extracción	4	1.349	<.0001
Concentración (C)	3	2.064	<.0001
Tiempo (T)	17	0.129	<.0001
C x T	51	0.023	0.0099
Promedio	—	1.136	—
CV (%)	—	9.4	—



**Cuadro 2.** Promedios (mm) del halo de inhibición del crecimiento de *B. Bacillus subtilis* como respuesta a la exposición de los metabolitos secundarios obtenidos por los diferentes métodos de extracción analizados.

<b>Método</b>	<b>Promedio</b>
Butanol	1.381 a*
Columna <sup>a</sup>	1.281 a
Indol	1.261 a
Orgánicos	1.269 a
Metanol	0.574 b

\* Promedios seguidos de l tras iguales no difieren estadísticamente ( $P > 0.05$ ) al nivel de probabilidad de 5%.

a. Columna para cromatografía.

**Cuadro 3.** Promedios de halos de inhibición (mm) de los aislamientos de *Fusarium* spp. vs. metabolitos de *Xenorhabdus bovienii* extraídos mediante cinco métodos.

<b>Aislado</b>	<b>Método de extracción de metabolitos</b>				
	<b>Butanol</b>	<b>Metanol</b>	<b>Orgánicos</b>	<b>Indol</b>	<b>Columna<sup>a</sup></b>
BTU2	0.80 a*	0.73 b	0.59 c	0.54 d	0.48 e
GMU1R2	0.52 d	0.73 b	0.80 a	0.56 cd	0.58 c
GM5R2	0.94 a	0.64 c	0.73 c	0.81 b	0.95 a
GM6R1	0.51 d	0.74 b	0.88 a	0.58 c	0.56 c
SETM1M4	0.49 c	0.79 b	1.13 a	0.49 c	0.43 d
SETMF1M6	0.45 e	0.73 b	0.81 a	0.62 c	0.53 d

\* Promedios en una misma columna seguidos de letras iguales no difieren estadísticamente ( $P > 0.05$ ) al nivel de probabilidad de 5%.

a. Columna para cromatografía

**Cuadro 4.** Análisis de varianza del efecto de dos medios de cultivo probados en la expresión de macro-, microconidias y clamidosporas de seis aislamientos de *Fusarium* spp.

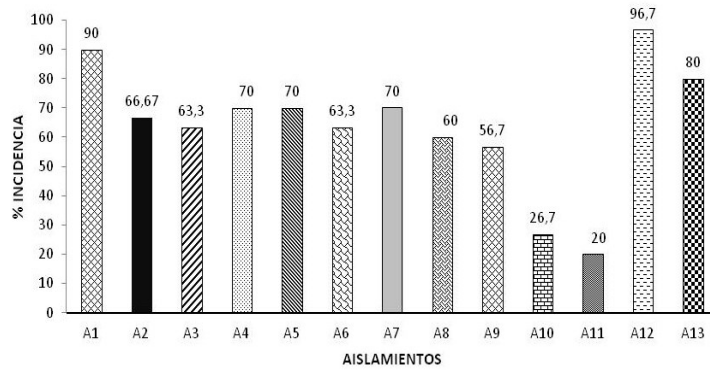
F.V.	G.I.	Macroconidias		Microconidias		Clamidosp.	
		CM	Pr > F	CM	Pr > F	CM	Pr > F
Aislamiento (A)	5	440933.8	<0.0001	1943895.3	0.1622	1312	0.1622
Medio (M)	1	43447.0	<0.0001	153365.7	0.0023	7743.2	0.0023
A x M	8	4893.0	0.282	27347.6	0.001	3528.2	0.001
Tiempo (T)	17	7856.6	<0.0001	39055.5	0.0003	2260.2	0.0003
T x A	85	264.2	0.0245	13574.5	< 0.0001	1650.4	< 0.0001
T x M	17	1690.8	0.6040	6146.6	0.0729	1284.5	0.0729
T x A x M	85	2127.3	0.2684	5794.4	< 0.0001	1543.5	< 0.0001
Promedio	324	—	645	—	172,8	—	—
CV(%)	13.6	—	14.0	—	16.6	—	—

**Cuadro 5.** Efecto del tiempo (h) de extracción de los metabolitos secundarios sobre la expresión de macro-, microconidias y clamidosporas de los seis aislamientos de *Fusarium* spp.

Macroconidias		Microconidias		Clamidosporas	
Tiempo (horas)	Prom.	Tiempo (horas)	Prom.	Tiempo (horas)	Prom.
96	352.3 a*	96	706.2 a	32	189.2 a
72	339.2 ab	72	678.6 ab	4	188.8 a
80	336.0 ab	80	672.2 abc	88	179.6 ab
94	336.0 ab	94	671.9 abc	96	178.6 abc
56	335.7 ab	56	671.4 abc	80	176.1 abc
32	334.8 ab	32	669.5 abc	48	175.9 abc
88	334.2 ab	88	668.6 abc	72	175.6 abc
48	330.1 abc	48	660.3 abcd	44	173.3 bc
44	328.3 bcd	44	656.6 bcd	56	172.4 bc
4	326.1 bcd	40	646.2 bcd	64	172.3 bc
40	323.1 bcd	36	634.9 bcde	40	171.6 bc
12	309.6 cde	12	619.1 def	28	170.7 bc
28	308.6 cde	28	617.2 def	24	165.5 bc
20	308.2 cde	20	616.4 def	8	165.5 bc
24	308.1 cde	24	616.2 def	12	164.2 bc
8	305.8 de	16	597.1 ef	16	162.7 c
16	298.5 e	4	581.3 f	20	162.3 c

\* Promedios en una misma columna seguidos de letras iguales no difieren estadísticamente ( $P > 0.05$ ) al nivel de probabilidad de 5%.

**Figura. 1.** Porcentajes de incidencia de los trece aislamientos de *Fusarium* spp. sobre semillas de tomate variedad Santa Clara.



A1: GuM1R2, A2: GuM3r, A3: GuM4, A4: GuM5R2, A5: GuM6R1, A6: MCM1, A7: BTa1, A8: BTU2, A9: BTa3, A10: PTM5R3, A11: PTM5R2, A12: SETM1M4, A13: SETMF1M6 (Figura 1), donde se hace referencia a los municipios de muestreo como: GU = Guacari, MC = Media Canoa, B = Bolo, PT = Puerto Tejada, y SE = Santa Elena.