



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Interacciones microbianas en un
consorcio de *Trichoderma virens* y
Bacillus velezensis con actividad
biocontroladora en el patosistema
Fusarium oxysporum f. sp. *physali* -
uchuva**

Luisa Fernanda Izquierdo García

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de posgrado
Bogotá, Colombia

2019

**Interacciones microbianas en un
consorcio de *Trichoderma virens* y
Bacillus velezensis con actividad
biocontroladora en el patosistema
Fusarium oxysporum f. sp. *physali* -
uchuva**

Luisa Fernanda Izquierdo García

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magíster en Ciencias Agrarias

Director:

Carlos Andrés Moreno Velandia Ph.D.

Codirectora:

Adriana González Almario Ph.D.

Línea de investigación:

Fitopatología

Grupo de Investigación:

Control Biológico de Plagas Agrícolas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de posgrado

Bogotá, Colombia

2019

*“La ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es solo un técnico:
es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un
cuento de hadas” - Marie Curie -*

*A mis padres
Pedro Ignacio y Myriam*

Interacciones entre *Trichoderma virens* y *Bacillus velezensis*

Agradecimientos

A la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria AGROSAVIA (anteriormente, Corpoica) por permitirme hacer parte de su equipo de investigadores y realizar este estudio en el Centro de Investigaciones Tibaitatá.

A mi director de tesis Carlos Andrés Moreno Velandia, por haber confiado en mí y por haberme formado como investigadora, por permitirme hacer tangibles mis ideas y estar abierto a mis propuestas para realizar este trabajo, por su dirección y apoyo.

A mi codirectora de tesis Adriana González Almario, por sus consejos y por sus aportes desde la construcción de este proyecto.

A la doctora Alba Marina Cotes y a los investigadores del grupo de investigación de Control Biológico de Plagas Agrícolas del área de fitopatología, quienes aportaron constructivamente durante la ejecución de este estudio.

A los profesores de seminario de investigación del programa de Maestría en Ciencias Agrarias, Teresa Mosquera, Enrique Darghan, David Cuellar y Johanna Soto por sus comentarios y correcciones acertadas al proyecto de tesis.

A los técnicos del Laboratorio de Microbiología Agrícola David Triana, José Neuta, Inés Roldán, Luis Miguel Rosero, Óscar Garnica y Omaira Amaya por su apoyo en las diferentes fases de este trabajo.

A mi familia por los momentos de alegría y dispersión durante este proceso, a mis padres por su apoyo incondicional, a mis hermanos y a mis sobrinos.

A Dios por permitirme no ceder, principalmente en la última fase de este trabajo.

Interacciones entre *Trichoderma virens* y *Bacillus velezensis*

Resumen

Fusarium oxysporum es uno de los fitopatógenos más devastadores a nivel mundial causando marchitamientos vasculares en varias especies cultivadas. El manejo tradicional de esta enfermedad incluye el uso de variedades resistentes y fungicidas, principalmente. Sin embargo, la eficacia de estos métodos es limitada, lo cual ha generado la necesidad de desarrollar métodos de control alternativos. El control biológico con microorganismos antagonistas es un método sostenible, seguro y eficaz, pero el uso de un solo agente de control biológico (ACB) usualmente ha resultado en efectos inconsistentes. Una forma para mejorar la consistencia de biocontrol consiste en el empleo de consorcios microbianos, en estudios previos fue seleccionado un consorcio microbiano conformado por *Trichoderma virens* GI006 y *Bacillus velezensis* Bs006 por presentar un efecto sinérgico en el control del marchitamiento vascular de la uchuva en condiciones de invernadero, con base en este contexto, el objetivo del presente trabajo fue estudiar las interacciones entre estos dos microorganismos, esta se evaluó en diferentes medios de cultivo, se midió el efecto del co-cultivo de estos dos microorganismos y de su exposición al sobrenadante de cada uno sobre la viabilidad, el crecimiento, la formación de biopelículas, la producción de enzimas degradadoras de pared celular y la actividad antagónica contra *F. oxysporum* f. sp. *physali* (Foph). En condiciones *in vivo* también se evaluó el efecto de la combinación de diferentes concentraciones de Bs006 en el consorcio sobre el desarrollo del marchitamiento vascular; se determinó la colonización del tejido vegetal, la sobrevivencia en el suelo, la producción de enzimas degradadoras de pared celular y la inducción de resistencia sistémica como respuesta a la aplicación combinada de los dos microorganismos al suelo. Se observó que la compatibilidad entre *T. virens* GI006 y *B. velezensis* Bs006 es dependiente de las condiciones nutricionales del medio, dicha compatibilidad fue mayor en condiciones nutricionales cercanas a las encontradas en la rizósfera. El sobrenadante de *T. virens* GI006 afectó negativamente a *B. velezensis* Bs006, mientras que el sobrenadante de Bs006 en concentración de 1% estimuló el crecimiento de GI006. *B. velezensis* formó biopelículas sobre las hifas y los conidios de *T.*

virens sin afectar la viabilidad del hongo. El perfil enzimático de los ACB fue dependiente del medio de cultivo, protocolo empleado y tiempo evaluado. En general, se determinó que GI006 presentó actividad quitinasa total, β -1,3-glucanasa, β -N-acetilglucosaminidasa, quitobiosidasa y proteasa, mientras que Bs006 presentó actividad proteasa, quitobiosidasa y β -1,3-glucanasa. En consorcio se detectó la actividad de todas las enzimas mencionadas, pero no se observó un efecto aditivo. Las aplicaciones simultáneas de los ACB y de Foph al mismo sitio mostraron una eficacia sinérgica (71.5%) en el control del marchitamiento vascular y en la reducción de la población viable de Foph (63%). Sin embargo, este efecto sinérgico no se mantuvo cuando hubo una separación física entre los ACB y Foph en la rizósfera, aunque el consorcio también presentó eficacia en la reducción de la enfermedad, sugiriendo que el efecto se debió a la inducción sistémica de resistencia. Los resultados obtenidos sugieren que la eficacia del consorcio podría ser atribuida a modos de acción directos e indirectos que pueden ser complementarios.

Palabras clave: marchitamiento vascular, control biológico, sinergia, modos de acción, compatibilidad

Abstract

Fusarium oxysporum is one of the most devastating plant pathogens worldwide, causing vascular wilt in several crops. Traditional management of this disease mainly incorporates the use of resistant cultivars and fungicides. However, efficacy of these methods is limited being necessary to develop alternative control methods. Biological control is a sustainable, safe and effective alternative, but the use of a single biological control agent (BCA) usually has inconsistency results. The biocontrol performance could be enhanced using microbial consortia, in previous studies was selected a consortium of *Trichoderma virens* GI006 and *B. velezensis* Bs006 with synergistic activity controlling vascular wilt under greenhouse. The aim of this work was to evaluate the BCA-interactions between microorganisms in consortium against vascular wilt in Cape gooseberry. Interactions were evaluated in different culture medium as the effect of co-culture, exposure to supernatants of each one of them on its viability, biofilm formation, cell wall degradation enzymes (CWDE) and antagonism against *F. oxysporum* f. sp. *physali* (Foph). The effect of combinations of different doses of GI006 and Bs006 on development of vascular wilt was evaluated *in vivo* conditions. Furthermore, colonization of BCA inside the host, survival and production of CWDE in soil, and induce systemic resistance were determined. It was observed that the compatibility between *T. virens* GI006 and *B. velezensis* Bs006 changed according to the culture medium being higher in nutritional conditions like those in the rhizosphere. Supernatant (>1%) from GI006 liquid culture negatively affected the growth of *B. velezensis* Bs006, while Bs006 supernatant (1%) induced the growth of GI006. It was observed to Bs006 cells adhering to the surface of *T. virens* hypha and conidia without affecting its viability. The enzymatic profile of the BCA also was dependent on the culture medium. In general, it was determined that GI006 produced β -1,3-glucanase, β -N-acetylglucosaminidase, chitobiosidase and protease, while Bs006 produced protease, chitobiosidase and β -1,3-glucanase. All the evaluated enzymes were detected in the consortium, but this did not have an additive effect. Simultaneous applications of the BCA and Foph to the soil showed a synergistic efficacy in both vascular wilt (71%) and viable population of Foph (63%) reduction. However, the synergistic effect was not maintained when there was a physical separation between BCA and Foph in the rhizosphere. Overall,

the results of this study suggest that Bs006 and GI006 are compatible in the rhizosphere and the efficacy of the consortium reducing fusarium wilt of cape gooseberry can be attributed to complementary direct and indirect modes of action.

Keywords: vascular wilt, biological control, synergy, modes of action, compatibility

Contenido

	Pág.
Agradecimientos	VIII
Resumen	XI
Abstract.....	XIII
Contenido	XV
Lista de figuras.....	XVIII
Lista de tablas	XXIV
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XXV
Introducción	27
Objetivos.....	37
Objetivo general.....	37
Objetivos específicos	37
1. <i>Bacillus velezensis</i> Bs006 y <i>Trichoderma virens</i> GI006: una interacción sinérgica en el control del marchitamiento vascular de la uchuva	39
Resumen	39
1.1 Introducción.....	40
1.2 Materiales y métodos	42
1.2.1 Microorganismos y condiciones de cultivo	42
1.2.2 Material vegetal	43
1.2.3 Evaluación del efecto de la concentración de Bs006 y GI006 sobre el desarrollo del marchitamiento vascular	44
1.2.4 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de sobrenadantes de los cultivos líquidos de <i>B. velezensis</i> Bs006 y <i>T. virens</i> GI006.....	47
1.2.5 Co-cultivos <i>in vitro</i> de Bs006 y GI006 en medio sólido.....	49
1.2.6 Inoculaciones combinadas de Bs006 y GI006 <i>in planta</i>	51
1.2.5. Análisis estadístico	52
1.3 Resultados	52
1.3.1 Efecto de concentraciones de la concentración de <i>B. velezensis</i> en consorcio sobre el desarrollo del marchitamiento vascular	52

1.3.2 Interacción en medio líquido entre sobrenadantes y células de los agentes de control biológico.....	55
1.3.3 Interacción entre células en medio sólido.....	60
1.3.4 Interacción entre sobrenadantes y células de GI006 y Bs006 en invernadero.....	67
1.3.5 Interacción de GI006 y Bs006 <i>in planta</i> (Microscopía ambiental de tejido vegetal).....	70
1.4 Discusión.....	72
1.5. Conclusiones.....	80
2. Modos de acción de <i>Trichoderma virens</i> GI006 y <i>Bacillus velezensis</i> Bs006: descifrando el arsenal del consorcio microbiano	81
Resumen.....	81
2.1. Introducción.....	82
2.2. Materiales y métodos.....	86
2.2.1. Microorganismos y condiciones de cultivo.....	86
2.2.2. Material vegetal.....	87
2.2.3. Caracterización de la actividad enzimática de GI006 y Bs006.....	87
2.2.4. Inducción de resistencia.....	93
2.2.5. Colonización y sobrevivencia.....	94
2.2.6. Análisis estadístico.....	95
2.3. Resultados.....	95
2.3.1. Actividad enzimática semicuantitativa.....	95
2.3.1.1. Actividad enzimática cuantitativa.....	96
2.3.1.1.1. Inducción de resistencia.....	111
2.3.1.1.2. Colonización y sobrevivencia.....	114
2.3.2. Discusión.....	118
2.3.3. Conclusiones.....	125
3. Discusión general.....	127
4. Conclusiones y recomendaciones	131
4.1. Conclusiones.....	131
4.2. Recomendaciones.....	131
5. Bibliografía.....	133
6. Anexos.....	148
Anexo 1. Composición de medios de cultivo empleados.....	148
Anexo 2. Información de cepas de agentes de control biológico empleadas en consorcios.....	150
Anexo 3. Curvas de progreso de la enfermedad bajo invernadero en concentración.....	151
Anexo 4. Efecto de suplemento de caldos de cultivo sobre el crecimiento de <i>B. velezensis</i> Bs006.....	152
Anexo 5. Efecto de suplemento de caldos de cultivo sobre el crecimiento de <i>T. virens</i> GI006.....	152
Anexo 6. Curvas de progreso de la enfermedad bajo invernadero en interacción caldos y células.....	153
Anexo 7. Curvas de progreso de la enfermedad bajo invernadero experimento de raíces divididas.....	154

Interacciones entre *Trichoderma virens* y *Bacillus velezensis*

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1. Representación diagramática de la escala de severidad del marchitamiento vascular de la uchuva causado por Foph-Map5 (Fuente: autor).....	46
Figura 1-2. Efecto de concentraciones de GI006 y Bs006 en consorcio sobre el progreso de la incidencia de la enfermedad. El ABCPE (área bajo la curva) fue calculada con base en el registro de la incidencia durante 50 días después de la aplicación de tratamientos, el suelo se inoculó con Foph-Map5 en concentración de 1×10^4 ufc.g ⁻¹ de suelo. Las barras sobre las columnas representan la desviación estándar (n= 4). Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan ($\alpha= 0.05$), Bs= <i>B. velezensis</i> Bs006, GI= <i>T. virens</i> GI006.....	53
Figura 1-3. Área bajo la curva del progreso de la severidad de la enfermedad. El ABCPE (área bajo la curva) fue calculada con base en el registro de la severidad durante 50 días después de la aplicación de tratamientos, el suelo se inoculó con Foph-Map5 en concentración de 1×10^4 ufc.g ⁻¹ de suelo. Las barras sobre las columnas representan la desviación estándar (n= 4). Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan ($\alpha= 0.05$), Bs= <i>B. velezensis</i> Bs006, GI= <i>T. virens</i> GI006.....	54
Figura 1-4. Crecimiento de <i>T. virens</i> GI006 en presencia de diferentes concentraciones del sobrenadante de <i>B. velezensis</i> Bs006. Sobrenadantes puros de Bs006 libres de células adicionados al medio PDB en 1, 5, 10, 20 y 30%. Crecimiento medido como densidad óptica (DO) en lector de microplacas durante 48 horas.	55
Figura 1-5. Crecimiento de <i>T. virens</i> GI006 expuesto a diferentes concentraciones de sobrenadante de <i>B. velezensis</i> Bs006. Sobrenadantes puros de Bs006 libres de células adicionados al medio PDB en 1, 5, 10, 20 y 30%. Crecimiento medido como densidad óptica (DO) en lector de microplacas durante 48 horas. Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para cada tiempo de evaluación. Barras sobre las columnas representan la desviación estándar de los datos (n=3)	56
Figura 1-6. Crecimiento de <i>B. velezensis</i> Bs006 en presencia de diferentes concentraciones del sobrenadante de <i>T. virens</i> GI006. Sobrenadantes puros de GI006 libres de células adicionados al medio LB en 1, 5, 10, 20 y 30%. Crecimiento medido como densidad óptica (DO) en lector de microplacas durante 48 horas.....	57
Figura 1-7. Crecimiento de <i>B. velezensis</i> Bs006 expuesto a diferentes concentraciones de sobrenadante de <i>T. virens</i> GI006. Sobrenadantes puros de GI006 libres de células	

Interacciones entre *Trichoderma virens* y *Bacillus velezensis*

adicionados al medio LB en 1, 5, 10, 20 y 30%. Crecimiento medido como densidad óptica (DO) en lector de microplacas a las 24 y 48 horas. Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para cada tiempo de evaluación. Barras sobre las columnas representan la desviación estándar de los datos (n=3)..... 57

Figura 1-8. Actividad antagónica de *T. virens* GI006 expuesto al sobrenadante de Bs006 en enfrentamiento dual. Conidios de GI006 (G) expuestos durante seis horas a sobrenadantes puros de Bs006 libres de células en 1 y 30%. Inhibición medida de acuerdo con el crecimiento diametral de Foph-Map5 (control positivo - F) en medio PDA después de siete días de incubación a 25 °C. 58

Figura 1-9. Actividad antagónica de *B. velezensis* Bs006 expuesto al sobrenadante de GI006. Células de Bs006 (B) expuestas durante seis horas a sobrenadantes puros de GI006 libres de células en 1 y 30%. Inhibición medida de acuerdo con el crecimiento diametral de Foph-Map5 (control positivo - F) en medio PDA después de siete días de incubación a 25 °C. 58

Figura 1-10. Formación de biopelículas de *B. velezensis* Bs006 en presencia del sobrenadante de *T. virens* GI006. *B. velezensis* Bs006 fue cultivado durante 24 h en caldo LB suplementado con sobrenadante de *T. virens* GI006 en concentraciones de 1 a 30% (SobGI1 – SobGI30). Control Bs006 sin adición de sobrenadante. Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha= 0.05$)..... 59

Figura 1-11. Formación de biopelículas de *B. velezensis* Bs006 crecida en co-cultivo con conidios de *T. virens* GI006. *B. velezensis* Bs006 fue cultivado durante 24 h en caldo LB suplementado con conidios viables de *T. virens* GI006 en concentraciones de 10^5 a 10^7 conidios.mL⁻¹ (CoGIE5 – CoGIE7). Control Bs006 solo sin conidios de GI006. Como control se utilizó el cultivo de Bs006 libre de conidios de GI006 (Control). Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha= 0.05$)..... 60

Figura 1-12. Inhibición del crecimiento de la colonia de Foph-Map5 en medio sólido por GI006, Bs006 y su mezcla. Las líneas verticales sobre las columnas representan la desviación estándar entre las unidades experimentales de tres réplicas en el tiempo (n=12). Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha= 0.05$)..... 61

Figura 1-13. a. Crecimiento de microorganismos sobre diferentes medios de cultivo desde una suspensión de GI006 (G), Bs006 (B) y Foph-Map5 (F). Inoculación de una suspensión de 10 μ L que contenía una mezcla de GI006 (1×10^6 conidios.mL⁻¹) y/o Bs006 (1×10^8 células.mL⁻¹) en mezcla con Foph-Map5 (1×10^5 microconidios.mL⁻¹) en el centro de una caja de Petri de 90 mm de diámetro con medio PDA, después de siete días de incubación a 25 °C. **a.** (EA), exudados radicales sintéticos. **b.** extracto de suelo+ exudados radicales sintéticos (SEA), **c.** extracto de suelo (SS), **d.** LBA, **e.** PDA, **f.** PDA (50%)+LBA (50%), **g.** exudados radicales de uchuva (EU), **h.** extracto de suelo+exudados (SEU) 63

- Figura 1-14.** Inhibición del diámetro de la colonia de *T. virens* GI006 en pruebas de enfrentamiento dual con *B. velezensis* Bs006 en diferentes medios de cultivo. Bs006 (2 gotas de 10 μ L, 10^8 ufc.mL⁻¹, en puntos extremos) y GI006 (una gota de 10 μ L, 10^6 conidios.mL⁻¹ en el centro) se inocularon simultáneamente en las cajas de Petri. Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha= 0.05$). Las barras sobre las columnas representan la desviación estándar de los datos (n=5) 64
- Figura 1-15.** Interacción entre *T. virens* GI006 y *B. velezensis* Bs006 en soporte sólido de exudados radicales de uchuva bajo microscopio óptico. **a.** Zona de inoculación de *T. virens* GI006 **b.** Zona de interacción (ZI). Flechas amarillas indican formación de biopelícula de *B. velezensis* Bs006 sobre conidios de *T. virens* GI006 después de 72 horas de contacto. **Bs=** células de Bs006, **GI=** conidios de GI006 65
- Figura 1-16.** Interacción entre *T. virens* GI006 y *B. velezensis* Bs006 en soporte sólido de exudados radicales de uchuva bajo microscopio de fluorescencia. **a.** Conidios de *T. virens* GI006 germinados en ausencia de *B. velezensis*. **b, c y d.** Interacción entre conidios de GI006 y células de Bs006. Las flechas amarillas indican esporas Bs006 en inicio de formación de biopelícula sobre conidios germinados e hifas de GI006 después de 72 horas de contacto..... 66
- Figura 1-17.** Efecto de la combinación de células y sobrenadantes de GI006 y Bs006 sobre el progreso de la incidencia de la enfermedad. Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba rango múltiple de Duncan ($\alpha= 0.05$). Con= Conidios, Cel= células, Bs=*B. velezensis*, Bs006, GI=*T. virens* GI006. Sob= sobrenadante libre de células. 68
- Figura 1-18.** Efecto de la combinación de células y sobrenadantes de GI006 y Bs006 sobre el progreso de la severidad de la enfermedad. Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba rango múltiple de Duncan ($\alpha= 0.05$). Con= Conidios, Cel= células, Bs=*B. velezensis*, Bs006, GI=*T. virens* GI006. Sob= sobrenadante libre de células. 68
- Figura 1-19.** Imágenes de microscopía de barrido ambiental de tejido vegetal de semillas de uchuva inoculadas con *T. virens* GI006 y *B. velezensis* Bs006. **a.** Testa de semilla sin inocular, **b y c.** Semilla co-inoculada con GI006 y Bs006. **Bs:** células de *B. velezensis* Bs006, **GI:** hifas de *T. virens* GI006. Las muestras fueron observadas 24 horas después de la inoculación e incubación en cámaras húmedas a 25 °C..... 70
- Figura 1-20.** Imágenes de microscopía de barrido ambiental de tejido vegetal de semillas de uchuva germinadas e inoculadas con *T. virens* GI006 y *B. velezensis* Bs006. **a.** Red de conidios de *T. virens* GI006 sobre el cuello de la plántula de uchuva, **b.** Plántula co-inoculada con Bs006, GI006 y *Foph*-Map5, **c.** Hifas de GI006 sobre la superficie de la raíz principal, **Bs:** células de Bs006, **GI:** hifas de GI006, **Foph:** *F. oxysporum* f. sp. *physali*-Map5..... 71
- Figura 2-1.** Halos de hidrólisis de quitina en medio sólido para evaluación de quitinasa producidos por *T. virens* GI006 (10 μ L). **a.** Control negativo (ADE), **b.** GI006 de 1×10^5 concentración de conidios.mL⁻¹, **c.** 1×10^6 conidios.mL⁻¹ y **d.** 1×10^7 conidios.mL⁻¹ cuatro días después de inoculación. Las flechas amarillas indican la formación del halo púrpura y la formación de micelio sobre el medio..... 97

Interacciones entre *Trichoderma virens* y *Bacillus velezensis*

- Figura 2-2.** Halos de hidrólisis de proteína en medio sólido para evaluación de proteasa inoculado con *B. velezensis* Bs006 y/o *T. virens* GI006 cuatro días después de inoculación. a. Control negativo (ADE), b. Bs006 en concentración de 1×10^8 ufc.mL⁻¹, c. GI006 en concentración de 1×10^6 conidios.mL⁻¹ y Bs006 en 1×10^8 ufc.mL⁻¹, d. GI006 en concentración de 1×10^5 conidios.mL⁻¹, e. GI006 en 1×10^5 conidios.mL⁻¹ y Bs006 en 1×10^8 ufc.mL⁻¹ y f. GI006 en 1×10^7 conidios.mL⁻¹ y Bs006 en 1×10^8 ufc.mL⁻¹. El indicador de actividad proteasa se nota por la claridad que toma el medio sólido. 98
- Figura 2-3.** Halos de hidrólisis de carboximetilcelulosa en medio CMC producidos por *B. velezensis* Bs006 (10µL en 1×10^6 a 1×10^8 ufc.mL⁻¹) cinco días después de inoculación. a. control negativo, b. Bs006 en concentración 1×10^6 ufc.mL⁻¹, c. Bs006 en concentración 1×10^7 ufc.mL⁻¹, Bs006 en concentración 1×10^8 . Los halos de coloración amarilla en el medio sólido son indicadores de actividad celulosa..... 98
- Figura 2-4.** Poblaciones de *T. virens* (GI006) y *B. velezensis* (Bs006) en co-cultivo en medio mínimo basal líquido (MMB) suplementado con micelio inerte de *F. oxysporum* f. sp. *physali* cepa Map5 (M-Foph). GI006 fue inoculado en 5×10^4 conidios.mL⁻¹, Bs006 en 5×10^6 ufc.mL⁻¹. Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). 105
- Figura 2-5.** Poblaciones de *T. virens* (GI006), *B. velezensis* (Bs006) y *F. oxysporum* f. sp. *physali* cepa Map5 (Foph-Map5) en co-cultivo en medio líquido solución de suelo y exudados de raíz de uchuva (SEU). GI006 fue inoculado en 5×10^4 conidios.mL⁻¹, Bs006 en 5×10^6 ufc.mL⁻¹ y Foph-Map5 en 1.1×10^5 microconidios.mL⁻¹. Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) 106
- Figura 2-6.** Poblaciones de *T. virens* (GI006), *B. velezensis* (Bs006) y *F. oxysporum* f. sp. *physali* cepa Map5 (Foph-Map5) en co-cultivo en caldo estéril solución de suelo y exudados artificiales de raíz (SEA). GI006 fue inoculado en 5×10^4 conidios.mL⁻¹, Bs006 en 5×10^6 ufc.mL⁻¹ y Foph-Map5 en 1.1×10^5 microconidios.mL⁻¹. Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). 106
- Figura 2-7.** Colonias de *T. virens* GI006 y Foph-Map5 en PDA suplementado con Tritón y cloranfenicol y *B. velezensis* Bs006 sembrado en microgota (20 µL) en medio LB (con choque térmico previo – 90°C durante 15 minutos) provenientes de muestras de co-cultivos en medio líquido a las 48 horas de fermentación. 107
- Figura 2-8.** Poblaciones de *T. virens* (GI006), *B. velezensis* (Bs006) y *F. oxysporum* f. sp. *physali* cepa Map5 (Foph) en muestras de suelo inoculadas de forma individual y en consorcio. 0 ddi: tiempo inicial y 7 ddi: tiempo final de muestreo. Las muestras de suelo corresponden a las muestras empleadas para cuantificación de actividad enzimática. Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) 110
- Figura 2-9.** Colonias de *T. virens* GI006 y Foph-Map5 en PDA suplementado con Tritón y cloranfenicol y de *B. velezensis* Bs006 en medio LB (con choque térmico previo a 90°C durante 15 minutos) provenientes de muestras de suelo a los 21 ddi..... 111

- Figura 2-10.** Efecto de la aplicación de *T. virens* GI006 (GI) y *B. velezensis* Bs006 (Bs) solos y en consorcio, sobre el progreso de la incidencia del marchitamiento vascular de la uchuva causado por *F. oxysporum* f. sp. *physali* cepa Map5 (Foph) en el modelo de raíces divididas. El área bajo la curva del progreso de la incidencia (ABCPE-Incidencia) fue calculada con base en el registro de la incidencia durante 50 días después de la aplicación de los tratamientos. El suelo se inoculó con Foph en concentración de 1×10^4 ufc.g⁻¹ de suelo en una porción de la raíz dividida. Las barras sobre las columnas representan la desviación estándar de los datos (n= 4). Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan ($\alpha= 0.05$). Con: Conidios, Cel: Células, Sob: Sobrenadante..... 112
- Figura 2-11.** Efecto de la aplicación de *T. virens* GI006 (GI) y *B. velezensis* Bs006 (Bs) solos y en consorcio sobre el progreso de la severidad del marchitamiento vascular de la uchuva causado por *F. oxysporum* f. sp. *physali* cepa Map5 (Foph) en el modelo de raíces divididas. El valor del área bajo la curva del progreso de la severidad fue calculado con base en el registro de la severidad al cabo de 50 días después de la aplicación de los tratamientos. El suelo se inoculó con Foph en concentración de 1×10^4 ufc.g⁻¹ de suelo en una porción de la raíz dividida. Las barras sobre las columnas representan la desviación estándar de los datos (n= 4). Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan ($\alpha= 0.05$). Con: Conidios, Cel: Células, Sob: Sobrenadante. 113
- Figura 2-12.** Población de microorganismos en sustrato aplicados solos y en consorcio en etapa de semillero (5 mL). GI006 fue aplicado en 1×10^6 conidios.mL⁻¹, Bs006 en 1×10^8 ufc.mL⁻¹. Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba LSD ($\alpha = 0.05$) 114
- Figura 2-13.** Población endófitas de *T. virens* (GI006) y *B. velezensis* (Bs006) en el tallo de plántulas de uchuva durante la etapa de semillero. GI006 fue aplicado en 1×10^6 conidios.mL⁻¹, Bs006 en 1×10^8 ufc.mL⁻¹. Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba LSD ($\alpha= 0.05$) 115
- Figura 2-14.** Población endófitas de *T. virens* (GI006) y *B. velezensis* (Bs006) en la raíz de plántulas de uchuva en la fase de semillero. GI006 fue aplicado en 1×10^6 conidios.mL⁻¹, Bs006 en 1×10^8 ufc.mL⁻¹. Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba LSD ($\alpha= 0.05$) 115
- Figura 2-15.** Población de microorganismos en el suelo aplicados solos y en consorcio en la fase de trasplante (30 mL). GI006 fue aplicado en 1×10^6 conidios.mL⁻¹, Bs006 en 1×10^8 ufc.mL⁻¹ y Foph-Map5 en 2.22×10^6 microconidios.mL⁻¹. GI+Bs Prev+Foph indica una aplicación preventiva del consorcio en etapa de semillero adicional a la aplicación en trasplante. Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba LSD ($\alpha= 0.05$) 116
- Figura 2-16.** Población endófitas (tallo) de microorganismos aplicados al sustrato solos y en consorcio en la etapa de trasplante (30 mL). GI006 fue aplicado en 1×10^6 conidios.mL⁻¹, Bs006 en 1×10^8 ufc.mL⁻¹ y Foph-Map5 en 2.22×10^6 microconidios.mL⁻¹. Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con el test de LSD ($\alpha = 0.05$). 117

Interacciones entre *Trichoderma virens* y *Bacillus velezensis*

Figura 2-17. Población endófitas (raíz principal) de microorganismos aplicados solos y en consorcio al sustrato en la etapa de trasplante (30 mL). GI006 fue aplicado en 1×10^6 conidios.mL⁻¹, Bs006 en 1×10^8 ufc.mL⁻¹ y Foph-Map5 en 2.22×10^6 microconidios.mL⁻¹. Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba LSD ($\alpha = 0.05$).....117

Figura 2-18. Colonias de microorganismos obtenidas de muestras de tejido a los 21 ddi procesadas para el aislamiento de endófitos. *T. virens* GI006 y Foph-Map5 en PDA suplementado con Tritón y cloranfénicol y *B. velezensis* Bs006 en medio LB (con choque térmico previo – 90°C durante 15 minutos).....118

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1. Escala de severidad del marchitamiento vascular de la uchuva.....	46
Tabla 1-2. Factor de sinergia de la eficacia del control de la incidencia y severidad del marchitamiento vascular en diferentes concentraciones de la mezcla	54
Tabla 1-3. Crecimiento de microorganismos inoculados en mezcla en diferentes medios de cultivo.....	62
Tabla 1-4. Factor de sinergia de la eficacia de control del progreso de la incidencia y la severidad del marchitamiento vascular	69
Tabla 1-5. Factor de sinergia de la eficacia de control de la incidencia y la severidad del marchitamiento vascular registrados al finalizar el experimento (50 ddi) ²²	69
Tabla 2-1. Efecto del co-cultivo de GI006 y Bs006 en medio sólido sobre su perfil enzimático.....	97
Tabla 2-2. Perfil de EDPC producidas por GI006, Bs006 y su co-cultivo en medio LB-PDB	99
Tabla 2-3. Perfil de EDPC en medio mínimo basal suplementado con micelio inerte de Foph-Map5	101
Tabla 2-4. Perfil de EDPC en medio solución de suelo – exudados artificiales de raíz (SEA)	102
Tabla 2-5. Perfil de EDPC en medio solución de suelo y exudados de raíz de uchuva (SEU).....	103
Tabla 2-6. Perfil de EDPC detectadas en el suelo inoculado con agentes de control biológico y <i>F. oxysporum</i>	109
Tabla 2-7. Factor de sinergia de eficacia del control de la población viable de Foph en suelo siete días después de inoculación	110
Tabla 2-8. Factor de sinergia de eficacia del control de la incidencia y severidad del marchitamiento vascular en el modelo de raíces divididas	113

Lista de Símbolos y abreviaturas

ABCPE:	Área bajo la curva del progreso de la enfermedad
ACB:	Agentes de Control Biológico
ADE:	Agua destilada estéril
Bs006:	<i>Bacillus velezensis</i> cepa Bs006
DNS:	Ácido dinitrosalicílico
Foph:	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>physali</i>
Fox:	<i>Fusarium oxysporum</i>
GI006:	<i>Trichoderma virens</i> cepa GI006
INC:	Incidencia
LBA:	Luria Bertani Agar
Map5:	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>physali</i> cepa Map5
mg:	Miligramos
mL:	Mililitro
PDA:	Papa-Dextrosa-Agar
SEA:	Medio Suelo-exudados artificiales
SEU:	Medio Suelo-exudados de uchuva
SEV:	Severidad
SF:	Factor de sinergia
SP:	Suelo planta
SS:	Solución de suelo
ufc	Unidades formadoras de colonia
µmol:	Micromol

Introducción

El fruto de uchuva (*Physalis peruviana*) presenta alto valor nutricional y funcional, debido a que posee compuestos bioactivos como vitamina C, compuestos fenólicos y antioxidantes (Curi et al., 2018) lo que ha favorecido el interés de mercados como Estados Unidos y la Unión Europea. La uchuva es el cuarto fruto de exportación de Colombia (Analdex, 2018), pero su cultivo es afectado seriamente por el marchitamiento vascular, causado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *physali* (Rodríguez, 2010; Simbaqueba et al., 2018). Esta enfermedad presenta síntomas típicos como amarillamiento lateral de las hojas, retraso en el crecimiento de las plantas, defoliación y marchitamiento (Rodríguez, 2010; Moreno, 2017).

F. oxysporum (Fox) se encuentra dentro de los 10 patógenos de mayor importancia en fitopatología, ocupando el lugar número cinco. Los microorganismos que se encuentran en esta clasificación son aquellos que afectan cultivos de gran valor económico, presentan amplio rango de hospederos, causan pérdidas severas y efectos devastadores y por esto mismo, son empleados como modelos de estudio de las interacciones planta-patógeno (Dean et al., 2012). Fox presenta más de 120 *formae speciales* basado en la especificidad por la especie de la planta hospedero. Los hospedantes de formas patogénicas de Fox pertenecen a un amplio rango de familias de plantas (Di Pietro et al., 2003) incluyendo las solanáceas, a la que pertenece la uchuva.

En general, el ciclo de la infección causada por Fox inicia por la presencia de estructuras vegetativas, reproductivas y de resistencia (clamidosporas) del hongo en el suelo o en material vegetal (Agrios, 2005). La presencia de compuestos orgánicos, aminoácidos y azúcares presentes en los exudados radicales estimulan la germinación de las esporas dormantes (Hildebrand et al., 1992), este tubo germinal se extiende hasta entrar en contacto con la raíz, solo las clamidosporas que se encuentran próximas (cerca de 1 mm o menos) a la raíz tienen la oportunidad de causar una infección y no todas las esporas

germinarán en dirección a los exudados, algunas lo hacen en dirección a las partículas de suelo (Huisman, 1982; Gordon, 2017). Este proceso es seguido por la elongación de la hifa y la formación de una red de micelio y el ensanchamiento de la parte terminal de las hifas para formar un apresorio en el sitio de infección. El ingreso al interior del hospedero ocurre por aberturas estrechas creadas con la ayuda de enzimas degradadoras (Gordon, 2017). Después de la penetración, el crecimiento del hongo es inicialmente intercelular y al final intracelular (Michielse y Rep, 2009).

El micelio avanza intercelularmente a través del córtex hasta ingresar a través de las traqueidas a los vasos del xilema donde coloniza y produce microconidios que son llevados hacia arriba con la savia. Los síntomas característicos de la enfermedad son el resultado de estrés hídrico severo y la obstrucción del xilema. El marchitamiento es causado por la acumulación del micelio y producción de toxinas del patógeno, así como por la respuesta de defensa del hospedero que incluye la producción de geles, gomas y formación de tilosa y el colapso de los vasos por la proliferación de células adyacentes del parénquima (Di Pietro et al., 2003; Agrios, 2005).

La diseminación de Fox ocurre en el suelo, principalmente porque este forma estructuras de resistencia (clamidosporas), las cuales pueden sobrevivir hasta 10 años. Este hongo también puede estar asociado a hospederos alternos, a fuentes de agua para el riego en sistemas y a material vegetal usado para la propagación de plantas, el cual ha sido una de las principales fuentes de diseminación a larga distancia. Así mismo, se ha descrito una relación con el nematodo *Meloidogyne* sp., el cual genera heridas y predispone a la planta para ser infectada por *F. oxysporum* (McGovern, 2015).

El manejo de la enfermedad para el modelo Fox-tomate se ha enfocado principalmente en la generación de material vegetal resistente (resistencia vertical o monogénica mediante la introgresión de genes de especies silvestres). En tomate los genes de resistencia contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), conocidos como *I*, *I-2* y *I-3*, han sido introgresados en cultivares comerciales (Huang y Lindhout 1997; Takken y Rep 2010). Otras alternativas para su manejo fueron revisadas por Mc Govern (2015), como el empleo de desinfectantes como hipoclorito para la desinfección de la semilla (Menzies y Jarvis, 1994), aunque no ha sido completamente efectivo; fungicidas como benomil, con el cual las plantas de 21 días de edad tratadas en dosis de 0,090 g.L⁻¹ controlaron óptimamente la enfermedad (Mihuta-

et al., 1990), otros fungicidas como procloraz, bromuconazol, carbendazim e himexazol han mostrado diferentes valores de eficacia en condiciones de invernadero (Amini y Sidovich 2010; Myresiotis et al., 2012) y fumigantes aplicados al suelo como bromuro de metilo (Santos et al., 2006)

Para su manejo también se ha incluido la rotación de cultivos de tomate con otros cultivos entre ellos plantas de arroz para reducir el inóculo en el suelo (Cerkauskas, 2005); el manejo de la nutrición enfocado principalmente en el control del pH a valores cercanos a la neutralidad, ya que se ha encontrado que pHs ácidos favorecen la enfermedad, aumentando el pH de 6.5 a 7 con la adición de nitrógeno como nitrato en lugar de amonio (Cerkauskas, 2005) y la adición de carbonato de calcio para obtener valores de pH cercanos a 7.3 (Jones et al., 1990).

Huang et al. (2011) demostraron que la adición de silicio logró reducir la severidad de la enfermedad y su contenido en raíz se correlacionó con la reducción de la severidad. El control físico mediante vapor y solarización también ha sido otra alternativa empleada para disminuir el inóculo patogénico de *F. oxysporum* en el suelo (Momma et al., 2013; McGovern, 2015), el empleo de compuestos inductores de resistencia como quitosán, acibenzolar, ácido jasmónico, ácido salicílico y validamicina. Myresiotis et al. (2012) evaluaron la aplicación de acibenzolar-S-metil, pero este resultó en un bajo control de la enfermedad. Sin embargo, la eficacia aumentó cuando se combinó este inductor con bacterias del género *Bacillus*.

A pesar del gran número de opciones de control desarrolladas contra Fox, ninguna de estas estrategias ha sido completamente efectiva. La tendencia actual en el manejo de los marchitamientos vasculares causados por este patógeno se centra en reducir la aplicación de fungicidas, teniendo en cuenta los efectos negativos del uso inadecuado de los fungicidas sobre el medio ambiente y sobre la salud. Como alternativa se ha considerado el uso de agentes de control biológico (ACB) debido a su alto potencial demostrado en planes de manejo integrado (McGovern 2015). El control biológico de *F. oxysporum* empleando microorganismos de los géneros *Bacillus*, *Trichoderma*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Glomus* y cepas no patogénicas de *Fusarium* ha sido ampliamente publicado en la literatura (McGovern, 2015). Loganathan et al. (2014) encontraron que el pretratamiento con *Bacillus subtilis* fue efectivo en condiciones de campo, induciendo

respuestas de defensa en la planta; Myresiotis et al. (2012) reportaron un control cercano al 50% con la aplicación combinada de las cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus pumilus*; también se ha evaluado *Trichoderma harzianum* logrando una eficacia de 41% en el control de la enfermedad presentando valores superiores a los obtenidos con el fungicida procloraz (22%) (Charoenporn et al., 2010).

El uso de ACB es considerado como una alternativa sostenible para el control de fitopatógenos del suelo, debido a su mínimo impacto sobre el medio ambiente (Brimner y Boland, 2003). El control biológico involucra el uso de organismos benéficos, así como sus metabolitos, que reducen los efectos negativos de los fitopatógenos y estimulan respuestas de defensa en las plantas. La supresión de la enfermedad mediada por agentes de control biológico, es una consecuencia de la interacción entre la planta, los patógenos y la comunidad microbiana (Vinale et al., 2008).

La forma de implementación masiva del control biológico ha sido el desarrollo de formulaciones comerciales basadas en las estructuras de propagación de los biocontroladores, tales como los conidios en el caso de los hongos y de esporas y células vegetativas en el caso de las bacterias. El 75% de las bioplaguicidas en el mercado corresponde a formulaciones a base de bacterias, principalmente Gram positivas como *Bacillus* spp., teniendo en cuenta que forman esporas y pueden ser más resistentes a condiciones ambientales adversas, facilitando el almacenamiento de estos productos. Por su parte, los hongos representan solamente el 5% del mercado.

El primer hongo registrado ante la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. (EPA) fue *Trichoderma harzianum* en 1989. Este género presenta cerca de 89 especies y entre las más comercializadas como bioproductos a nivel mundial son *T. asperellum*, *T. gamsii*, *T. virens*, *T. viride* y *T. harzianum* para el control de patógenos del suelo. Las especies de *Trichoderma* utilizadas en biocontrol presentan alta tasa reproductiva, habilidad para colonizar la superficie y el interior de la planta, sobrevivencia bajo condiciones poco favorables, secreción de un amplio rango de antibióticos y enzimas degradadoras de pared celular, rasgos promotores del crecimiento vegetal e inductores de respuestas de defensa en las plantas (Lazarovits et al., 2014).

Los beneficios en el control de fitopatógenos por la aplicación de un solo agente de

biocontrol ya han sido demostrados, pero también se han descrito inconsistencias en su desempeño y baja correlación entre las condiciones *in vitro* e *in planta* (Parikh, Eskelson y Adesemoye, 2018), entre otras razones, debido a que un agente de control biológico no es activo en todos los tipos de suelo ni en todos los agroecosistemas (Raupach y Kloepper 1998). A pesar del alto potencial del control biológico, su implementación en los sistemas de producción ha sido muy lenta, debido a la variabilidad de los resultados de eficacia empleando cepas individuales (Xu et al., 2011). En este contexto, se ha demostrado que el uso combinado de antagonistas ha mejorado la eficacia y la consistencia del control biológico entre pruebas (Jain et al., 2015). El efecto sinérgico presentado por la combinación de microorganismos comparado con las aplicaciones individuales en condiciones de laboratorio, invernadero y campo, se ha demostrado para varios consorcios de agentes de control biológico (Sundaramoorthy et al., 2011; Bunterngsook et al., 2014; Sarma et al., 2015; Yang et al., 2015; Saravanakumar et al., 2016) .

Un consorcio microbiano es una asociación microbiana que contiene dos o más microorganismos, los cuales pueden ser de tipo arquea, hongos, bacterias, virus y algas (Paerl y Pinckney, 1996; Zhang et al., 2018). A nivel biotecnológico se han clasificado de acuerdo con su construcción en: I. consorcios microbianos naturales, los cuales se encuentran viviendo simbióticamente en la naturaleza; II. consorcios microbianos artificiales, conformados por diferentes microorganismos silvestres que pueden crecer juntos simbióticamente en un sistema cerrado para generar productos de valor; III. consorcios microbianos semi-sintéticos, en estos consorcios microorganismos silvestres y modificados son cultivados juntos para un fin común; IV. consorcios microbianos sintéticos: incluyen el co-cultivo de microorganismos que son modificados metabólicamente para aumentar su función y productividad (Bernstein y Carlson, 2012; Bhatia et al., 2018).

En la naturaleza, todos los microorganismos viven en asociaciones y forman consorcios naturales que son más estables que los monocultivos (Bhatia et al., 2018). Estudios recientes sobre el microbioma de la rizósfera y sobre la interacción de este con la planta, han revelado que las plantas forman su propio microbioma rizosférico, coordinado por los exudados radicales (Spence et al., 2014), fenómeno que varía con las condiciones ambientales y la edad de la planta (Micallef et al.,2009;Chaparro et al., 2013).

Para el caso específico de *Fusarium* spp., se han evaluado consorcios a base de *B. subtilis* MBI600 y *Rhizobium tropici* UMR 1899 contra en *Fusarium solani* en frijol en condiciones de campo, llegando a presentar un control de 40% (Estevez de Jensen et al., 2002). Así mismo la combinación de *B. subtilis* y *P. fluorescens* mostró una reducción significativa de la enfermedad cuasada por *F. solani* en pimiento (Sundaramoorthy et al., 2011). Mohammad, Hadi y Masoud (2011) encontraron que un aislamiento de *T. virens* en mezcla con *T. asperellum* logró disminuir hasta en 44% la severidad de la enfermedad causada por *Fusarium oxysporum* en lenteja.

Bacillus velezensis cepa Bs006 (anteriormente, *B. amyloliquefaciens*) fue aislada de la rizósfera de plantas de uchuva sanas, en un cultivo seriamente afectado por el marchitamiento vascular y seleccionada por su potencial como antagonista contra *F. oxysporum in vitro* (Caviedes, 2010). Sin embargo, estudios posteriores *in vivo* mostraron inconsistencias en el control de la enfermedad (Guacaneme, 2010; Torres, 2013; Díaz et al., 2013). La cepa Bs006 posee atributos deseables en un agente de control biológico, tales como su habilidad para sintetizar compuestos antimicrobianos (v.g. lipopéptidos cíclicos), su capacidad para colonizar las raíces de la planta de uchuva manteniendo una población activa contra *F. oxysporum* f. sp. *physali* (Foph) y de establecerse en la rizósfera (Moreno, 2017). Sin embargo, su actividad biocontroladora contra el marchitamiento vascular es dependiente de su concentración y la de Foph en el suelo (Moreno-Velandia et al., 2018). Adicionalmente se conoce que la biosíntesis de lipopéptidos cíclicos (CLPs) por Bs006 está afectada negativamente por bajas temperaturas y por baja disponibilidad de nutrientes del medio (Moreno, 2017).

Trichoderma es uno de los géneros más importantes en control biológico (Kipngeno et al., 2015), es ubicuo y altamente diverso en el suelo, son los hongos cultivables más prevalentes en estudios de suelo *in vitro* (Lazarovits et al., 2014), es uno de los géneros más estudiado y ha mostrado efecto en la reducción de enfermedades causadas por patógenos del suelo como *F. oxysporum* y *R. solani* (Kipngeno et al., 2015; McGovern, 2015).

Dentro de la colección de microorganismos con interés en control biológico de AGROSAVIA se encuentran 285 accesiones de hongos de las cuales 141 pertenecen a aislamientos nativos de *Trichoderma* spp. Entre los aislamientos que han sido objeto de un

mayor número de evaluaciones y que han mostrado valores altos de eficacia en diferentes patosistemas, se encuentra el aislamiento Th003 de *T. koningiopsis* evaluado contra *Rhizoctonia solani* en tomate (68%) (Moreno et al., 2007); *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en tomate (86%) (Beltrán et al., 2007) y uchuva (15%) (Cotes et al., 2012), *Sclerotinia sclerotiorum* en lechuga (Moreno et al., 2007) y *R. solani* en papa (80%) (Beltrán, 2004; Beltrán et al., 2011) y arroz (Mesa et al., 2015). Debido a la gran eficacia del aislamiento Th003, este constituye el principio activo del bioplaguicida comercial TRICOTEC WG®.

Otros aislamientos de *Trichoderma* de la colección de AGROSAVIA, con alto potencial de biocontrol son, *Trichoderma asperellum* Th034, el cual fue evaluado sobre *R. solani* en papa (Beltrán, 2004) y *Sclerotium cepivorum* en cebolla de bulbo (85,7%) (Castillo, 2000); *Trichoderma atroviridae* Th035, la cual ha sido evaluada contra *S. cepivorum* en cebolla de bulbo (67,8%) (Castillo, 2000) y *Botrytis cinerea* en tomate (Moreno, 2003); *Trichoderma virens* GI006, la cual ha sido evaluada contra *S. cepivorum* en cebolla de bulbo (64,2%) (Castillo, 2000) y contra *B. cinerea* en tomate, reduciendo la incidencia de la esporulación en los tallos afectados (Moreno, 2003).

En estudios previos estos aislamientos de *Trichoderma* spp. fueron evaluados en consorcio junto con el aislamiento *B. velezensis* Bs006, en combinaciones de dos, tres, cuatro y cinco aislamientos, contra el marchitamiento vascular de la uchuva. El consorcio conformado por *T. virens* GI006 y *B. velezensis* Bs006 fue seleccionado por presentar un efecto sinérgico sobre el control del marchitamiento vascular de la uchuva en condiciones de invernadero y mostrar consistencia en sus valores de eficacia entre pruebas (Izquierdo et al., sin publicar). De forma individual el aislamiento Bs006 había presentado eficacia en el control de la enfermedad en concentraciones de 1×10^7 y 1×10^8 ufc.mL⁻¹ (Moreno, 2017), para el caso de *T. virens* se había preseleccionado la concentración de 1×10^6 conidios.mL⁻¹ la cual había presentado valores de eficacia similares a 1×10^7 conidios.mL⁻¹ (Izquierdo et al., sin publicar).

El control biológico de fitopatógenos puede darse a través de modos de acción directos, los cuales actúan sobre el patógeno blanco, o indirectos, actuando sobre las repuestas de defensa de la planta (Harman, 2000). Los mecanismos de acción caracterizados para varias cepas de *Trichoderma* spp. han sido la antibiosis (Sharma, 2011), el micoparasitismo mediante la producción de enzimas degradadoras de la pared celular

(Dipietro et al., 1993; Ait-Lahsen et al., 2001; Lu et al., 2004; Mukherjee et al., 2013) y la inducción de respuestas de defensa en el hospedero (Cálderón et al., 1993; Djonovi et al., 2006). Para el caso de bacterias los modos de acción más importantes son la antibiosis, en el que la rizobacteria coloniza el sistema radical (Choudhary y Johri 2009) y libera moléculas antibióticas cerca de ella (Ongena y Jacques, 2008), las cuales también pueden actuar como señales inductoras de respuestas sistémicas de defensa en la planta (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

Los mecanismos más reportados para agentes de control biológico exitosos contra *F. oxysporum*, específicamente contra la *formae specialis lycopersici* en tomate, son la inducción de resistencia (Myresiotis et al., 2012; Loganathan et al., 2014; McGovern 2015) y antibiosis (Charoenporn et al., 2010; Larkin y Fravel, 2014; McGovern 2015). Se ha descrito que la pared celular de *F. oxysporum* es más resistente a enzimas degradadoras de la pared celular que otros patógenos del suelo como *R. solani* y *Sclerotium rolfii*. *F. oxysporum* contiene 194 y 115% más contenido de proteína en su pared que estos fitopatógenos, por lo cual podría verse menos afectado por antagonistas micolíticos, adicionalmente presenta una alta relación de quitina-laminarina y mayor contenido de laminarina comparado con *S. rolfii* (Sivan y Chet 1989). Por otro lado Schoffelmeer et al. (1999) encontraron que las glicoproteínas conforman cerca del 50-60% de la masa de *F. oxysporum*, por lo que su alto contenido de proteína y quitina debe ser tomado en consideración cuando se realizan selecciones de antagonistas contra este patógeno (Sivan y Chet 1989).

La eficacia del uso combinado de agentes de control biológico depende en particular de los modos de acción involucrados (Sarma et al. 2015a). Dunne et al. (1998) evaluaron el uso combinado de *P. fluorescens* productora de floriglucinol F113 y *Stenotrophomonas maltophilia* W81 con actividad proteolítica, incrementando la protección de remolacha contra *Pythium* sp. También se ha evaluado la producción de metabolitos y la competencia por nutrientes en el consorcio de *Pichia guilliermondii* Y2 y *Bacillus mycoides* B16 sobre *B. cinerea* en plantas de fresa (Guetsky et al., 2002); la inducción de respuestas sistémicas por *T. harzianum* Tr16 y *Pseudomonas* sp. Ps14 contra *F. oxysporum* en pepino cohombro (Alizadeh et al., 2013); la inducción de enzimas en el complejo fenilpropanoide y antioxidante de la planta contra *S. sclerotiorum* por un consorcio bacteriano (Jain et al., 2012).

En un consorcio de dos agentes de control biológico, la eficacia puede aumentar, reducirse o tener valores similares de eficacia de los microorganismos aplicados de forma individual. Sin embargo, la hipótesis de varios estudios para probar las interacciones sinérgicas, aditivas o antagónicas no se han formulado apropiadamente y por lo tanto no han sido probadas adecuadamente (Xu et al., 2011). Adicionalmente, se encuentra con frecuencia alta variabilidad de los resultados entre las pruebas de laboratorio, invernadero y campo (Duffy et al., 1996). Por esto, en el estudio de consorcios microbianos para el control de fitopatógenos, se deben utilizar metodologías orientadas a la selección de microorganismos compatibles, en condiciones ambientales cercanas al sitio donde estos serán aplicados y que permitan determinar los impactos de los consorcios en sus hospederos (Sarma et al., 2015).

Con base en la información presentada anteriormente, el presente trabajo buscó estudiar las interacciones en consorcio entre los microorganismos *T. virens* GI006 y *B. velezensis* Bs006 en condiciones *in vitro* e *in vivo*. *In vivo*, se simuló las condiciones nutricionales de la rizósfera, teniendo en cuenta que la capacidad individual y la interacción mutua es vital para la construcción de consorcios (Bhatia et al., 2018). Específicamente se estudió la influencia de cada agente de control biológico sobre la producción de enzimas degradadoras de pared celular por ambos agentes de biocontrol; sobre la actividad antagónica contra *F. oxysporum* f. sp. *physali*; y sobre la actividad biocontroladora contra el marchitamiento vascular de la uchuva. Se abordó el estudio de los modos de acción de inducción de resistencia en el hospedero, micoparasitismo a través de la producción de enzimas degradadoras de la pared celular y antibiosis de los dos agentes de control biológico de forma individual y en consorcio, con el fin de entender las interacciones que podrían ocurrir cuando coexisten en la rizósfera. Adicionalmente se evaluó el efecto del consorcio sobre la colonización y la sobrevivencia de los dos microorganismos en la rizósfera.

El estudio de las interacciones entre estos biocontroladores y de los modos de acción implicados sobre del marchitamiento vascular, mostró que los dos microorganismos fueron compatibles en la rizósfera y que los sobrenadantes de *B. velezensis* indujeron el crecimiento de la biomasa de *T. virens* y no afectaron su germinación; las mezclas de células-células y células-sobrenadantes de los microorganismos presentaron diferentes

valores de eficacia, pero la actividad sinérgica sobre el control del marchitamiento vascular de la uchuva se atribuyó a la interacción del caldo de *B. velezensis* Bs006 y los conidios de *T. virens* GI006 en interacción directa con el patógeno. En este trabajo se reporta un consorcio de agentes de biocontrol con potencial para ser evaluado contra el marchitamiento vascular de la uchuva en condiciones en campo.

Objetivos

Objetivo general

Determinar las interacciones microbianas entre *Trichoderma virens* (GI006) y *Bacillus velezensis* (Bs006) en consorcio.

Objetivos específicos

1. Estudiar la respuesta de la actividad biocontroladora frente a la concentración de *B. velezensis* (Bs006) en consorcio.
2. Determinar el efecto de un agente de control biológico sobre la viabilidad y actividad biológica del otro biocontrolador.
3. Caracterizar los modos de acción de los agentes de control biológico individualmente y en consorcio.

1. *Bacillus velezensis* Bs006 y *Trichoderma virens* GI006: una interacción sinérgica en el control del marchitamiento vascular de la uchuva

L.F. Izquierdo-García^{a*}, A. González-Almario^b, A.M. Cotes^a, C. A. Moreno-Velandia^a

^a Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA, Km 14
vía Bogotá – Mosquera, Colombia;

^b Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá,
Colombia.

Resumen

El marchitamiento vascular de la uchuva causado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *physali* puede causar hasta el 100% de pérdidas en este cultivo. El empleo de control biológico ha sido planteado como una alternativa para su control y este puede ser más eficaz y persistente mediante el uso de consorcios de microorganismos antagonistas. Los objetivos de este estudio fueron determinar las interacciones entre *T. virens* GI006 y *B. velezensis* Bs006 *in vitro* e *in planta*. Se estudió la respuesta de la actividad biocontroladora frente a la concentración de Bs006 en consorcio con GI006; el efecto de un agente de control biológico sobre la viabilidad y actividad biológica del otro biocontrolador. El estudio de las interacciones entre los dos microorganismos y entre estos con *F. oxysporum* f. sp. *physali* cepa Map5 (Foph-Map5) se realizó mediante pruebas de enfrentamiento dual en los medios de cultivo sintéticos PDB y LB, medios que contenían exudados radicales de uchuva y solución de suelo y medios artificiales que contenían componentes conocidos de los exudados radicales de tomate. Se evaluó el efecto de los sobrenadantes de GI006 sobre el crecimiento *in vitro* de Bs006 y viceversa, sobre la germinación de GI006, sobre

la formación de biopelículas de Bs006 y sobre la actividad antagónica de ambos agentes contra Foph-Map5 en los medios de cultivo mencionados. Se midió la actividad antagónica del co-cultivo de GI006 y Bs006 sobre Foph-Map5 y se realizaron observaciones al microscopio de semillas de uchuva inoculadas con los dos microorganismos. En condiciones *in vivo* se midió el efecto de las concentraciones de 10^7 y 10^8 ufc.mL⁻¹ de Bs006 y 10^6 conidios.mL⁻¹ de GI006 sobre el desarrollo de la enfermedad. En las pruebas de antagonismo dual entre GI006 y Bs006 se observó una respuesta diferencial entre medios de cultivo. En medios sintéticos se observó una inhibición similar de los dos microorganismos sobre el patógeno, pero en los demás medios solo GI006 inhibió el crecimiento de Foph-Map5. La inhibición del crecimiento de Foph-Map5 por la mezcla de GI006 y Bs006, presentó valores de hasta el 100% en los medios de solución de suelo y exudados radicales de uchuva o exudados sintéticos, lo que demostró que los dos microorganismos fueron compatibles. Por otra parte, se observó que el sobrenadante de Bs006 no afectó la actividad antagónica *in vitro* de GI006 y viceversa y tendió a inducir el crecimiento de GI006. Bajo condiciones de invernadero se observó un efecto sinérgico de control de la enfermedad por la mezcla de sobrenadante de Bs006 y los conidios de GI006, con una eficacia de 71%. En este trabajo reportamos un consorcio de agentes de control biológico compatible en condiciones nutricionales cercanas a las encontradas *in planta* y con actividad sinérgica contra el marchitamiento vascular de la uchuva.

Palabras clave: compatibilidad, sinergia, mezcla, consorcio, medios de cultivo, exudados radicales

1.1 Introducción

La capacidad de resiliencia de un ecosistema se relaciona directamente con su complejidad, traducido en la riqueza de especies (Döring et al., 2014). En este sentido, estudios sobre microbiomas vegetales y su relación con las plantas, han revelado que estas forman su microbioma rizosférico, coordinado por los exudados radicales (Spence et al. 2014), fenómeno que varía con las condiciones ambientales y la edad de la planta (Chaparro et al., 2013; Micallef et al., 2009). En la rizósfera los microorganismos trabajan como una comunidad y el conocimiento de las interacciones entre ellas se ha aprovechado de forma promisoría para el control de enfermedades de las plantas (Jain et al., 2015). En este contexto, el uso de microorganismos benéficos en consorcio o mezcla para el control

de fitopatógenos del suelo ayuda en la estabilidad del agroecosistema, en comparación con el uso de un solo agente para el control de una enfermedad. Al trabajar juntos, estos confieren beneficios a las plantas como promoción de crecimiento y tolerancia al estrés (Jain et al., 2015).

El control biológico ha surgido como una alternativa de control de enfermedades de las plantas ambientalmente sostenible. Sin embargo, el control biológico clásico, en el que se emplea un solo agente de control biológico, ha presentado alta variabilidad entre pruebas, teniendo en cuenta que los agentes de biocontrol son organismos vivos y pueden no ser activos en todos los agroecosistemas (Raupach y Kloepper, 1998). Para aumentar la eficacia del control biológico de fitopatógenos muchas de las investigaciones recientes se han encaminado en usar estos microorganismos en combinación. En estas mezclas o asociaciones el consorcio puede emplear diferentes modos de acción, aunque su eficacia relativa es desconocida y puede variar con las condiciones del medio en el que se encuentren.

En diferentes trabajos se ha evaluado la eficacia de microorganismos en consorcios, pero en pocos de ellos se ha evaluado su interacción a nivel microscópico, en pocos se ha determinado el microorganismo del consorcio al cual se le atribuye la actividad biocontroladora y son escasos los trabajos en los cuales se haya estudiado los modos de acción desplegados por el consorcio. El conocimiento de estas interacciones permitirá diseñar consorcios más efectivos y aprovechar al máximo su potencial para controlar las poblaciones de los fitopatógenos. En los primeros estudios sobre consorcios microbianos la selección de parejas o mezclas se hacía de acuerdo con su potencial individual, pero no se mencionaba cómo interactuaban, ni su efecto antagónico o supresivo sobre su pareja. La recomendación actual es evaluar cómo interactúan los componentes de estos consorcios, incluso conocer la interacción a niveles funcionales y poder determinar el componente predominante del consorcio (Sarma et al., 2015).

La eficacia de un consorcio de agentes de control biológico se puede predecir por la fórmula de Abbot (Abbot, 1925) en términos de la eficacia sobre el organismo blanco. El factor de sinergia calcula la eficacia de una mezcla dada de acuerdo a la suma de las eficacias de sus componentes, esta interacción puede ser del tipo antagónico cuando la eficacia de la mezcla es menor a la de sus componentes individuales, una interacción aditiva es la suma de las eficacias de cada uno de sus componentes y en una interacción

sinérgica la mezcla presenta una eficacia superior a la esperada al sumar las eficacias de sus componentes individuales (Levy, 1986).

Se han reportado estudios sobre el efecto sinérgico o el efecto aditivo de la aplicación de consorcios microbianos de dos, tres y hasta cuatro microorganismos. Los géneros más frecuentes en dichos estudios son *Trichoderma* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. y *Gliocladium* spp. En ellos se han evaluado mezclas de hongo – hongo, hongo – bacteria y bacteria – bacteria, en combinaciones de microorganismos inclusive pertenecientes al mismo género o cepas de la misma especie (Sarma et al., 2015).

Los géneros *Trichoderma* y *Bacillus* se encuentran dentro de los microorganismos más empleados en el control biológico contra *F. oxysporum* (McGovern, 2015). En estudios previos fue seleccionada la rizobacteria *B. velezensis* Bs006 aislada de la rizósfera de uchuva por presentar control del marchitamiento vascular (Díaz et al., 2013). Sin embargo, esta ha mostrado variabilidad en su eficacia contra Foph-Map5 entre pruebas. Moreno-Velandia et al. (2018) encontró que la eficacia de Bs006 es dependiente de la concentración tanto del patógeno como del agente de biocontrol aplicado al suelo y que la adición de los metabolitos bacterianos contenidos en el sobrenadante podría generar un efecto en favor del desarrollo de la enfermedad en la planta.

Por lo anterior, los objetivos de este estudio fueron determinar el efecto de un agente de control biológico sobre la viabilidad y actividad biológica del otro biocontrolador y estudiar la respuesta de la actividad biocontroladora frente a la concentración de *B. velezensis* (Bs006) en consorcio. Conocer las interacciones entre los microorganismos que conforman un consorcio efectivo contra el marchitamiento vascular de la uchuva permitirá generar una estrategia que disminuya la variabilidad entre pruebas y aumente su eficacia empleando microorganismos compatibles en la rizósfera aprovechando al máximo su potencial.

1.2 Materiales y métodos

1.2.1 Microorganismos y condiciones de cultivo

Como inóculo patogénico se utilizó la cepa Map5 de *F. oxysporum* f. sp. *physali* (Simbaqueba et al., 2018) designada en adelante como Foph-Map5, la cual fue aislada de

plantas de uchuva con síntomas característicos de marchitamiento vascular y es altamente virulenta sobre este hospedero (Rodríguez, 2013). Los agentes de control biológico (ACB) evaluados fueron las cepas de *Trichoderma virens* (GI006) y *Bacillus velezensis* (Bs006). Estos microorganismos se encontraban conservados a -80 °C en solución de glicerol (30%) y peptona (0,1%) en el Banco de Germoplasma de Microorganismos con Interés en Control Biológico de AGROSAVIA (Anexo 2).

Para la producción del inóculo de Foph-Map5 se siguió la metodología descrita por Moreno et al. (2018), esta consistió en cultivar el hongo en caldo estéril papa-dextrosa (PDB, Difco®) con una concentración inicial de 1×10^6 microconidios.mL⁻¹, incubándolo durante siete días con agitación continua (125 rpm) a 25°C. Después de este tiempo se cosecharon los nuevos microconidios producidos y se preparó una suspensión de estos la cual se ajustó mediante conteo en cámara de Neubauer a una concentración de 1×10^6 microconidios.mL⁻¹, con agua destilada estéril (ADE) para los ensayos *in vitro* y con agua de grifo para los ensayos en invernadero.

T. virens (GI006) fue reactivado en PDA y el segundo pase de siete días de crecimiento se tomó para la obtención del inóculo de conidios mediante raspado con ADE. *B. velezensis* (Bs006) se reactivó en medio de cultivo Agar Luria Bertani (LBA: Triptona 10 g/L, NaCl 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y agar 18 g/L). Con el segundo pase de 24 h de edad, se preparó el inóculo para iniciar la fermentación en caldo LB con una concentración inicial de 5×10^6 ufc.mL⁻¹. El cultivo de Bs006 se mantuvo en agitación continua en agitador orbital a 125 rpm y 25°C durante 48 horas. La concentración de las suspensiones de la bacteria requeridas se ajustó midiendo la densidad óptica en espectrofotómetro (BioteK®), ($DO_{600\text{nm}} = 0.5 \sim 2.49 \times 10^8$ ufc.mL⁻¹) (Moreno, 2017).

1.2.2 Material vegetal

Se empleó semilla comercial de uchuva de la casa Semicol®. La semilla se desinfectó superficialmente antes de la siembra sumergiéndola en solución NaOCl (3%) durante 20 min, y luego tres lavados con agua destilada estéril (ADE). Para los ensayos bajo invernadero se emplearon plántulas de 60 días de edad, crecidas en bandejas de germinación de 72 alvéolos con turba esterilizada en autoclave (dos ciclos continuos de 20

min, 15 PSI y 121°C). El trasplante se hizo en bolsas negras de polipropileno de 1 Kg de capacidad con 600 g de sustrato suelo:cascarilla de arroz (3:1 v/v) (Moreno, 2017)

1.2.3 Evaluación del efecto de la concentración de Bs006 y GI006 sobre el desarrollo del marchitamiento vascular

Con el fin de determinar la respuesta del desarrollo del marchitamiento vascular a la dosis de los dos agentes de control biológico seleccionados, se probaron combinaciones de las concentraciones 1×10^7 y 1×10^8 ufc.mL⁻¹ para *B. velezensis* Bs006 en combinación con 1×10^6 conidios.mL⁻¹ de *T. virens* GI006. Se incluyeron como controles los agentes de biocontrol en las diferentes concentraciones mencionadas; un control negativo en el cual las plantas crecieron en sustrato inoculado con Foph-Map5 y no recibieron tratamiento para el control de la enfermedad, y un control absoluto en el cual las plantas crecieron en sustrato libre de inóculo patogénico y de tratamientos de biocontrol. El experimento fue realizado dos veces en el tiempo.

Para esto, una suspensión de microconidios de Foph-Map5 se inoculó en el suelo húmedo para obtener una concentración de 1×10^4 ufc.g⁻¹ de suelo (Moreno, 2017). Con el suelo inoculado se llenaron bolsas para enraizamiento y allí se trasplantaron las plántulas de uchuva. Inmediatamente después del trasplante se aplicaron los tratamientos de biocontrol como suspensiones en el suelo, alrededor del cuello de la planta conocido en inglés como drench.

La suspensión de conidios de *T. virens* se ajustó en concentración de 1×10^6 conidios.mL⁻¹ y la rizobacteria en 1×10^8 ufc.mL⁻¹. Los tratamientos de biocontrol se aplicaron en semillero (2 mL.planta⁻¹), 15 días antes de trasplante (dat) y en el sustrato inmediatamente después del trasplante (30 mL.planta⁻¹). Las plantas se mantuvieron bajo invernadero durante 6 semanas, con una temperatura promedio de 25 °C.

Para este experimento se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. El tamaño de la unidad experimental fue de diez plantas. Las variables medidas fueron incidencia, expresada como el porcentaje de plantas enfermas del total de plantas en la unidad experimental, y severidad de la enfermedad la cual fue estimada de acuerdo con la escala descrita por Moreno et al. (2012) (

Tabla 1-1;Figura 1-1) y se presentó como el índice de intensidad de la enfermedad (IIE), calculado con la ecuación

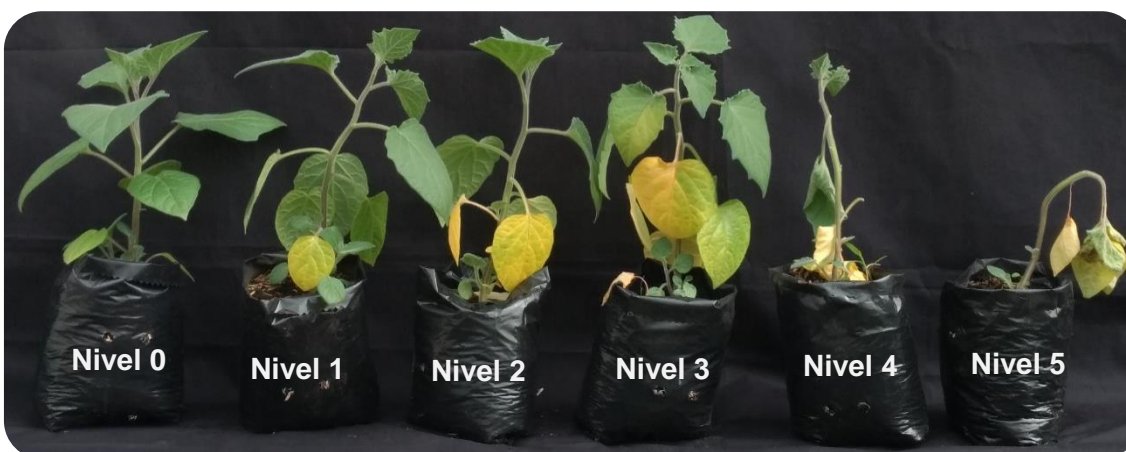
$IIE = (\sum Si * Ni) \div (5 * N)$, donde Si es el nivel de severidad de los síntomas, Ni es el número de plantas en cada nivel de severidad Si , y N es el número total de plantas de la unidad experimental (Hervás et al., 1998).

El registro de las variables de enfermedad se realizó cada cuatro días a partir de la expresión de los primeros síntomas y con estos datos se calculó el área bajo la curva de progreso de la incidencia y del índice de intensidad de la enfermedad. El porcentaje de eficacia (E) de los tratamientos para reducir la enfermedad se determinó con base en los valores de área bajo la curva de progreso de la enfermedad mediante la ecuación $E = ((a - b) \div a) \times 100$, donde a representa el valor de la enfermedad en el control negativo y b representa la enfermedad en un tratamiento dado (Abbott, 1925).

Para determinar si la eficacia sobre la incidencia y/o sobre la severidad de la enfermedad, presentada en los tratamientos de mezclas de ACB, fue el resultado de un efecto sinérgico, antagónico o aditivo, se calculó la eficacia esperada en el consorcio usando las ecuaciones de Abbott (1925) $Eesp = (a + b) - ((a \times b)/100)$ donde, a representa la eficacia en uno de los tratamientos de forma individual y b la eficacia en el otro tratamiento de forma individual y el factor de sinergia, (SF) calculado mediante la ecuación $SF = Eobs/Eesp$ en donde, $Eobs$ corresponde a la eficacia presentada en tratamiento del consorcio, cuando $SF = 1$, la interacción entre los agentes es aditiva; cuando $SF < 1$, la interacción es antagónica y cuando $SF > 1$, la interacción es sinérgica (Levy et al., 1986; Guetsky et al., 2002). La concentración de Bs006 en consorcio con mayor eficacia en la reducción de la enfermedad, fue seleccionada para estudiar las interacciones entre microorganismos que favorecen su actividad biocontroladora.

Tabla 1-1. Escala de severidad del marchitamiento vascular de la uchuva¹

Nivel	Síntomas
0	No hay síntomas de la enfermedad
1	Epinastia, marchitamiento y clorosis en hojas maduras
2	Epinastia en 30 a 50% de las hojas, moderado marchitamiento y clorosis en hojas maduras y leve en hojas del tercio medio, retraso en el crecimiento
3	60 a 80% de las hojas con epinastia, evidente pérdida de turgencia, moderada en el tercio medio, abscisión de hojas cloróticas
4	Epinastia de todas las hojas, clorosis severa, moderada defoliación, planta en evidente estado de marchitamiento
5	Entorchamiento foliar, marchitamiento severo, defoliación severa, doblamiento del tallo, planta muerta

**Figura 1-1.** Representación diagramática de la escala de severidad del marchitamiento vascular de la uchuva causado por Foph-Map5 (Fuente: autor)¹ Escala ajustada por Moreno, (2017)

1.2.4 Evaluación *in vitro* del efecto de sobrenadantes de los cultivos líquidos de *B. velezensis* Bs006 y *T. virens* GI006

Se evaluó la interacción entre los dos microorganismos en medio líquido con el fin de determinar una posible inducción o represión del crecimiento, la actividad antagónica *in vitro*, la germinación para *T. virens* y la formación de biopelículas para *B. velezensis*, sometiendo las células de cada microorganismo al efecto de diferentes concentraciones de sobrenadante del otro biocontrolador.

Para obtener el sobrenadante de *T. virens* GI006, este fue crecido en Erlenmeyer (300 mL) con 150 mL de medio estéril caldo-papa-dextrosa (PDB, difco®) durante cinco días (125 rpm, 25 °C) con una concentración inicial de 1×10^5 conidios.mL⁻¹. Después de la incubación, se cosechó el caldo de fermentación filtrándolo por papel Whatman No. 1 y posteriormente por filtros estériles de 0,22 µm (Millipore®).

El sobrenadante obtenido se almacenó a -20 °C hasta su uso. Para obtener el sobrenadante de *B. velezensis* Bs006, este fue crecido en caldo LB durante 48 horas y luego se centrifugó, cosechando el sobrenadante y luego este se pasó por filtros estériles de 0,22 µm (Millipore®).

La biomasa obtenida de Bs006 se lavó dos veces para eliminar restos de sobrenadante y se resuspendió en ADE, homogenizando mediante agitación en vórtex a máxima velocidad durante dos minutos, para ser utilizada como inóculo en estos experimentos. Por su parte, los conidios de *T. virens* se cosecharon de un cultivo en medio PDA de siete días de edad, inundando el medio con ADE y mediante raspado con rastrillo. La suspensión obtenida se agitó en vórtex a máxima velocidad durante 30 segundos y luego se filtró con muselina estéril (tamaño de poro 0,5 mm).

- *Efecto de sobrenadantes sobre el crecimiento de B. velezensis* Bs006 y *T. virens* GI006

Para evaluar el efecto del sobrenadante entre Bs006 y GI006 los microorganismos fueron incubados en los caldos LB y PDB, respectivamente, suplementados con 1, 5, 10, 20 y 30% de sobrenadante del otro microorganismo en microplacas de 96 pozos (Greiner®). La concentración inicial de Bs006 se ajustó en 5×10^6 ufc.mL⁻¹ y la de GI006 en 1×10^5 conidios.mL⁻¹. Como controles de la experimentación se contó con blancos de cada caldo

suplementado con los sobrenadantes en cada concentración sin inóculo microbiano, con controles sin suplemento de sobrenadante y tratamientos control en donde el suplemento consistió en el medio de cultivo estéril PDB o LB en las diferentes concentraciones mencionadas. Las variables medidas fueron: crecimiento medido por densidad óptica (DO) (Moreno, 2017) a una longitud de onda de 630 nm cada hora empleando un lector de microplacas (BIOTEK®) y el software Gen5®; se hicieron observaciones al microscopio para evaluar posibles efectos sobre la morfología de los microorganismos.

- *Efecto del sobrenadante de B. velezensis Bs006 sobre la germinación de T. virens GI006*

Para el registro de la germinación de los conidios de *T. virens* se ajustó la suspensión en 5×10^6 conidios.mL⁻¹ y se expuso durante una y seis horas a las concentraciones de sobrenadante de Bs006 mencionadas anteriormente. Después de la exposición las células de *T. virens* fueron separadas del medio líquido mediante centrifugación a 14000 rpm durante cinco minutos, posteriormente fueron lavadas dos veces y resuspendidas en ADE. Se sembraron nueve microgotas de 10 µL cada una en una caja de Petri con agar agua (Anónimo, 1968) y se llevó a incubación durante 24 horas. Después de este tiempo se registró la proporción de conidios germinados con un microscopio óptico (40 X) (Olympus® CX41) (Sanogo et al., 2002).

- *Efecto del sobrenadante y las células de T. virens GI006 sobre la formación de biopelículas por B. velezensis Bs006*

Para evaluar el efecto del sobrenadante de *T. virens* y la presencia de sus células sobre la capacidad de *B. velezensis* para formar biopelículas, se siguió la metodología descrita por Peeters, Nelis y Coenye (2008) y O'Toole (2011). Se empleó el medio mínimo M63 estándar para la formación de biopelículas suplementado con sulfato de magnesio (Merck®), glucosa (Sigma®) y casaminoácidos (Difco®) (O'Toole, 2011- Anexo 1). A este medio fue adicionado sobrenadante de *T. virens* GI006 en concentraciones de 1, 5, 10, 20 y 30%.

También se evaluó el efecto del co-cultivo de conidios de GI006 en concentraciones de 10^5 , 10^6 y 10^7 conidios.mL⁻¹ con células de Bs006 (24 h de edad en LBA) en concentración de 1×10^8 células.mL⁻¹. En ambos casos se adicionaron 100 µL de suspensión por pozo, en

una microplaca de 96 pozos (Greiner®) y se incubó durante 24 horas a 30 °C. Se sirvieron nueve pozos por cada tratamiento.

Después de la incubación se eliminó tanto el caldo fermentado, como las células en suspensión y se realizó un enjuague adicionando 100 µL de solución salina (0.85%) por pozo. Las biopelículas formadas se fijaron adicionando 100 µL de metanol (99%) por pozo durante 15 minutos, posteriormente se descartó el metanol y se secó en cabina de flujo laminar. Posteriormente, se adicionaron 200 µL de cristal violeta (para tinción de gram) durante 20 minutos, después de este tiempo el colorante fue eliminado y lavado con agua de grifo y finalmente se adicionó 150 µL de ácido acético (33%) para diluir el colorante adherido. La absorbancia se registró a 590 nm empleando un lector de microplacas (BIOTEK®) y el software Gen5®. El experimento fue ejecutado dos veces en el tiempo.

- *Efecto de los sobrenadantes sobre la actividad antagónica*

Las células de *T. virens* GI006 y *B. velezensis* Bs006 expuestas durante una y seis horas a los sobrenadantes recíprocos (como se describió anteriormente), fueron empleadas para realizar una prueba de enfrentamiento dual con Foph-Map5 en cajas de Petri (90 mm) con medio PDA. El experimento contó con cinco cajas por tratamiento y fue realizado dos veces en el tiempo. Las cajas inoculadas se incubaron durante siete días a 28°C en oscuridad y luego se midió el diámetro de la colonia de Foph-Map5 con un pie de rey (Fischer®) (Moreno, 2017).

1.2.5 Co-cultivos *in vitro* de Bs006 y GI006 en medio sólido

Se midió el efecto del medio de cultivo y la combinación de Bs006 con GI006 sobre su actividad antagónica contra Foph-Map5 mediante pruebas de enfrentamiento dual (Dennis y Webster, 1971) en diferentes medios de cultivo. Los medios de cultivo usados fueron LBA, PDA, PD-LBA (50% cada uno), exudados radicales artificiales de tomate (EA) (Nihorimbere et al., 2012), exudados radicales de uchuva (EU), solución de suelo (SS) y los medios EA y EU preparados en SS (SEA y SEU, respectivamente).

Los exudados de raíces se obtuvieron de plantas de uchuva de 30 días de edad de acuerdo con Moreno (2017). Para esto se crecieron plantas en bandejas de enraizamiento con turba y al cabo de 30 días después de la siembra, las plantas se desarraigaron del sustrato y se lavaron con agua de grifo hasta eliminar completamente el sustrato. Posteriormente la

parte aérea de la planta (tallos y hojas) y las raíces se sumergieron en solución NaOCl (2%) durante 0.2 y 5 min, respectivamente. Después de esto se realizaron cuatro lavados consecutivos con ADE para eliminar los residuos de desinfectante. Las plantas obtenidas se dispusieron en tubos Falcon (Falcon®) estériles de 50 mL de capacidad con las raíces sumergidas en 40 mL de solución de suelo estéril (filtrada por 0.2 µm). Las plantas se mantuvieron a 15 °C durante cinco días con fotoperiodo (12 horas luz artificial – 12 horas oscuridad). La solución de enraizamiento fue cosechada y se pasó por filtros de 0.2 µm y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

La solución de suelo se obtuvo mezclando 500 g de sustrato (suelo:cascarilla, 3:1 v/v) con 1000 mL de agua de grifo. Se llevó a agitación rotatoria a 125 rpm durante una hora a temperatura ambiente, posteriormente se filtró con tela muselina con tamaño de poro de 0.5 mm y luego se pasó por filtros de 0.8 µm y 0.22 µm.

Para la preparación de las suspensiones de células de Bs006 se emplearon cultivos de 24 h de edad en medio LBA y de conidios de GI006 de siete días de edad en medio PDA en concentración de 1×10^8 ufc.mL⁻¹ y 1×10^6 conidios.mL⁻¹, respectivamente. Se inocularon dos gotas (10 µL/gota) en puntos opuestos, a 1,5 cm del borde de la caja de Petri con los medios de cultivo mencionados. Simultáneamente se inoculó Foph-Map5 (10 µL, 1×10^5 microconidios.mL⁻¹) en el centro de la caja. Otro set de cajas de Petri con los medios de cultivo mencionados se inoculó solamente con una gota (10 µL) de una suspensión conjunta de Bs006, GI006 y Foph-Map5 en las concentraciones descritas arriba. Las cajas inoculadas se incubaron durante siete días a 28°C en oscuridad y luego se midió el diámetro de la colonia de Foph-Map5 con un pie de rey (Fischer®).

Adicionalmente, con el fin de realizar observaciones al microscopio de la interacción entre las células de *T. virens* GI006 y *B. velezensis* Bs006, se preparó un soporte sólido que consistió en exudados radicales de uchuva con agar (18 g. L⁻¹) esterilizado en autoclave y servido en Cajas de Petri. Se cortaron cuadros de 1, 5 cm² y en cada uno de dos extremos opuestos se inoculó una gota de 2 µL de suspensión de esporas (Bs006) provenientes de un cultivo de 48 horas en LBA y de conidios (GI006) de un cultivo de siete días de edad en PDA. El soporte se mantuvo en cámara húmeda durante 72 horas. Después de este tiempo se realizaron observaciones bajo el microscopio óptico (Olympus® CX41) y microscopio de fluorescencia (Olympus® IX71).

1.2.6 Inoculaciones combinadas de Bs006 y GI006 *in planta*

Se tomaron semillas de uchuva, las cuales fueron desinfectadas siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Posteriormente, las semillas se sembraron en solución nutritiva gelificada (GNM-Nihorimbere et al., 2012) y se incubaron en oscuridad durante 15 días, tiempo en el cual emergió la radícula. Las semillas germinadas se inocularon en la base de la radícula, colocando 2 μL de los ACB *T. virens* GI006 y *B. velezensis* Bs006 en concentraciones de 3×10^5 conidios. mL^{-1} y 3×10^7 ufc. mL^{-1} , respectivamente. Estas inoculaciones también se hicieron sobre semillas sin germinar y las semillas y plántulas inoculadas se mantuvieron sobre el medio GNM a 25 °C durante 48 horas.

Para la evaluación se tomaron muestras de 1 cm de longitud incluyendo el punto de inoculación o la semilla de uchuva según el caso y se observaron mediante microscopía de barrido ambiental de tejido vegetal (ESEM) a 2 - 4 °C, 400 Pa de presión y 49.2 a 56% de HR. Las observaciones se realizaron en la Universidad Industrial de Santander sede Guatiguará en un microscopio electrónico de barrido marca FEI® modelo QUANTA FEG 650, con tecnología Field Emmision.

- Evaluación del efecto de sobrenadantes y células de Bs006 y GI006 sobre su actividad biocontroladora

Se evaluó el efecto del sobrenadante de GI006 sobre la actividad biocontroladora Bs006 y recíprocamente el efecto del sobrenadante de Bs006 sobre la actividad biocontroladora de GI006, en el modelo de bioensayo de invernadero descrito anteriormente. Para esto, *B. velezensis* Bs006 fue crecido en caldo LB durante 48 horas a 28°C y 125 rpm, mientras que *T. virens* fue crecido en PDA durante siete días a 28 °C. El caldo fermentado de Bs006 se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos y 4°C para separar la biomasa del sobrenadante.

El sobrenadante fue cosechado y pasado por filtros de 0,22 μm (Sartorius®) y la biomasa de Bs006 se lavó dos veces con ADE para el eliminar los residuos de sobrenadante. Los conidios de *T. virens* fueron obtenidos mediante raspado de caja y para obtener el sobrenadante de este hongo, el medio PDA en el cual creció el hongo se licuó en ultraturrax a máxima velocidad durante dos minutos, adicionando 15 mL de ADE por caja de Petri. La

suspensión obtenida se centrifugó bajo condiciones ya descritas y el sobrenadante obtenido se filtró por 0.22 μm .

Para la preparación de las suspensiones, la biomasa de cada agente de control biológico se resuspendió en una solución de sobrenadante del microorganismo recíproco, es decir, biomasa de Bs006 en solución sobrenadante de GI006 y viceversa. Se utilizó el mismo volumen de sobrenadante requerido para ajustar la concentración de biomasa a partir de la fermentación líquida o sólida. Se probaron concentraciones 10^8 ufc.mL⁻¹ para Bs006 y 10^6 conidios.mL⁻¹ para GI006; 8.3% de sobrenadante de Bs006 y 0.25% de sobrenadante de GI006. La aplicación de los tratamientos solo se realizó inmediatamente después del trasplante.

1.2.5. Análisis estadístico

Los datos se sometieron a pruebas de normalidad de acuerdo con la prueba de Shapiro Wilk ($P > 0.05$) y homogeneidad de varianzas con la prueba de Levene. La significancia se determinó por el análisis (ANOVA) usando un modelo lineal generalizado GLM. Se emplearon las pruebas de rango múltiple de Duncan y de Tukey ($P=0.05$) para realizar la comparación de medias entre tratamientos. El análisis se realizó empleando el programa estadístico S.A.S (versión 9.4: SAS Institute, Cary, NC)

1.3 Resultados

1.3.1 Efecto de concentraciones de la concentración de *B. velezensis* en consorcio sobre el desarrollo del marchitamiento vascular

Bajo las condiciones experimentales utilizadas en este estudio, se observó que el progreso de la incidencia de la enfermedad fue significativamente más bajo en comparación con el control negativo (Foph), cuando las plantas de uchuva recibieron la aplicación del consorcio de *T. virens* GI006 (10^6 conidios.mL⁻¹) y *B. velezensis* Bs006 (10^8 ufc.ml⁻¹) pero no cuando la rizobacteria se usó en el consorcio en 10^7 ufc.mL⁻¹ (Anexo 3). Sin embargo, esta misma tendencia fue observada con la aplicación de GI006 de forma individual (Figura 1-2.). No obstante, estos mismos efectos fueron más pronunciados en el progreso de la severidad de la enfermedad, en donde se evidenció claramente que la concentración 10^7

ufc.mL⁻¹ de Bs006 combinada con GI006, no redujo el avance de síntomas en las plantas enfermas (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). En términos de eficacia en la reducción de la enfermedad, la aplicación de GI006 de forma individual y del consorcio de GI006 (10⁶ conidios.mL⁻¹) y Bs006 (10⁸ ufc.mL⁻¹) redujeron el progreso de la incidencia y la severidad del marchitamiento vascular en 15 y 19% (sobre incidencia) y en 28 y 35% (sobre severidad), respectivamente (Tabla 1-2). Sin embargo, el análisis estadístico no presentó diferencias con respecto a la aplicación de GI006 de forma individual y el consorcio. Adicionalmente, en este experimento se observó que la rizobacteria aplicada de forma individual no controló el marchitamiento vascular de la uchuva.

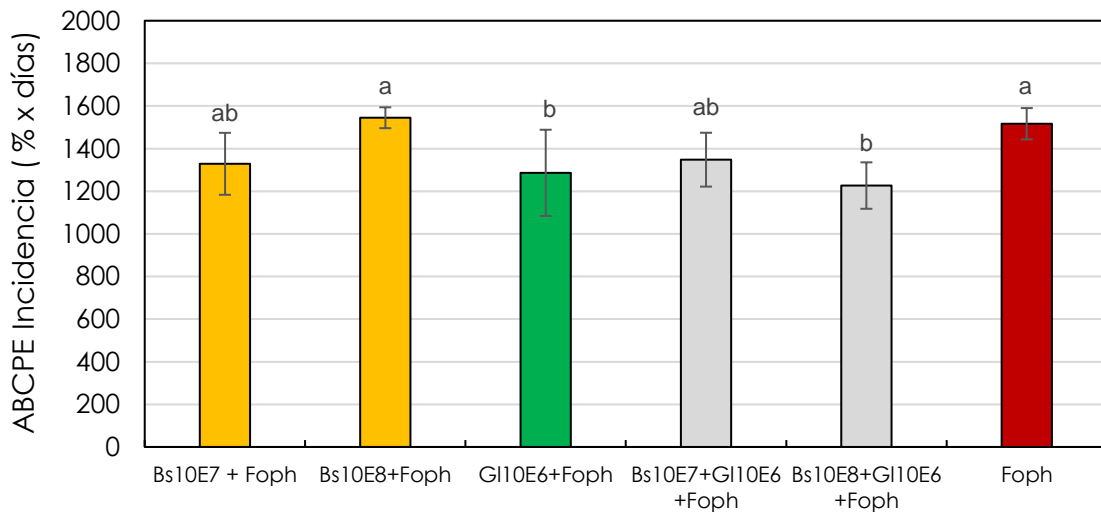


Figura 1-2. Efecto de concentraciones de GI006 y Bs006 en consorcio sobre el progreso de la incidencia de la enfermedad. El ABCPE (área bajo la curva) fue calculada con base en el registro de la incidencia durante 50 días después de la aplicación de tratamientos, el suelo se inoculó con Foph-Map5 en concentración de 1×10^4 ufc.g⁻¹ de suelo. Las barras sobre las columnas representan la desviación estándar (n= 4). Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan ($\alpha= 0.05$), Bs=*B. velezensis* Bs006, GI=*T. virens* GI006

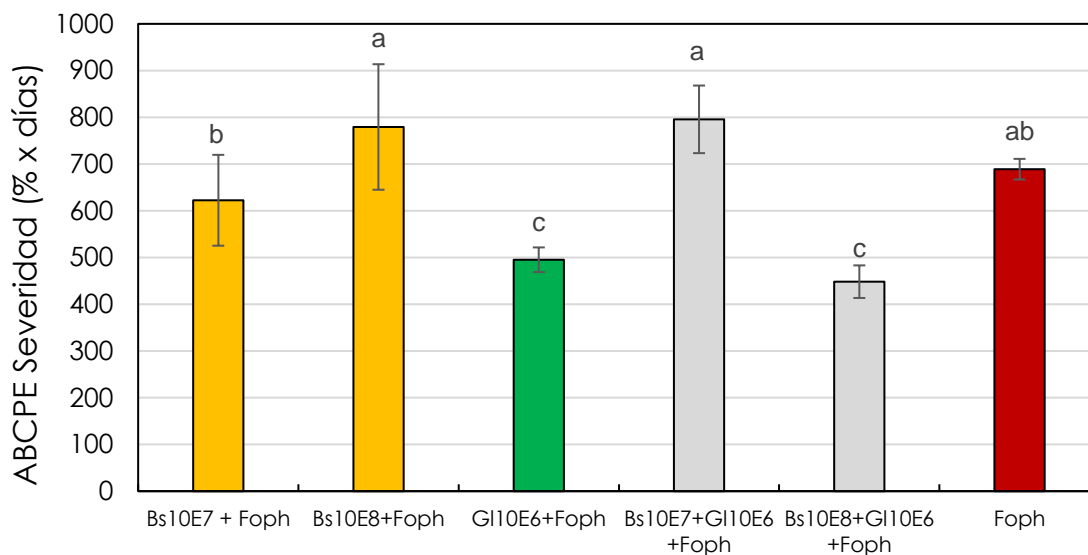


Figura 1-3. Área bajo la curva del progreso de la severidad de la enfermedad. El ABCPE (área bajo la curva) fue calculada con base en el registro de la severidad durante 50 días después de la aplicación de tratamientos, el suelo se inoculó con Foph-Map5 en concentración de 1×10^4 ufc.g⁻¹ de suelo. Las barras sobre las columnas representan la desviación estándar (n= 4). Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan ($\alpha= 0.05$), Bs=*B. velezensis* Bs006, GI=*T. virens* GI006

Tabla 1-2. Factor de sinergia de la eficacia del control de la incidencia y severidad del marchitamiento vascular en diferentes concentraciones de la mezcla ²

Tratamiento	Eficacia	Eficacia	SF	Interacción	Eficacia	Eficacia	SF	Interacción
	INC (%)	esperada			SEV (%)	esperada		
Bs10 ⁷	12,4	-	-	-	9,6	-	-	-
Bs10 ⁸	0,0	-	-	-	0,0	-	-	-
GI10 ⁶	15,2	-	-	-	28,0	-	-	-
Bs10 ⁷ +GI10 ⁶	11,1	25,7	0,4	Antagónica	0,0	34,9	0,0	Antagónica
Bs10 ⁸ +GI10 ⁶	19,1	15,2	1,3	Sinérgica	35,0	28,0	1,3	Sinérgica

² La eficacia fue calculada con base en los valores del área bajo la curva del progreso (ABCPE) de la incidencia (INC) y de la severidad (SEV) de la enfermedad al cabo de 50 días después de la aplicación de tratamientos SF: factor de sinergia

1.3.2 Interacción en medio líquido entre sobrenadantes y células de los agentes de control biológico

Crecimiento

Al embeber los conidios de *T. virens* GI006 durante 48 horas en solución estéril de sobrenadante de *B. velezensis* Bs006 libre de la bacteria, se observó que ninguna de las concentraciones de sobrenadante probadas (1 a 30%) afectaron negativa o positivamente el crecimiento de *T. virens* (Figura 1-4).

Durante las primeras 24 horas de exposición se observó que las concentraciones de 1 y 20% estimularon el crecimiento de *T. virens*, pero este efecto no se mantuvo hasta las 48 horas en donde no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, por lo tanto, los efectos positivos de estimulación o negativos sobre el crecimiento fueron transitorios y no se evidenciaron después de las 48 horas de exposición (Figura 1-5, Anexo 5).

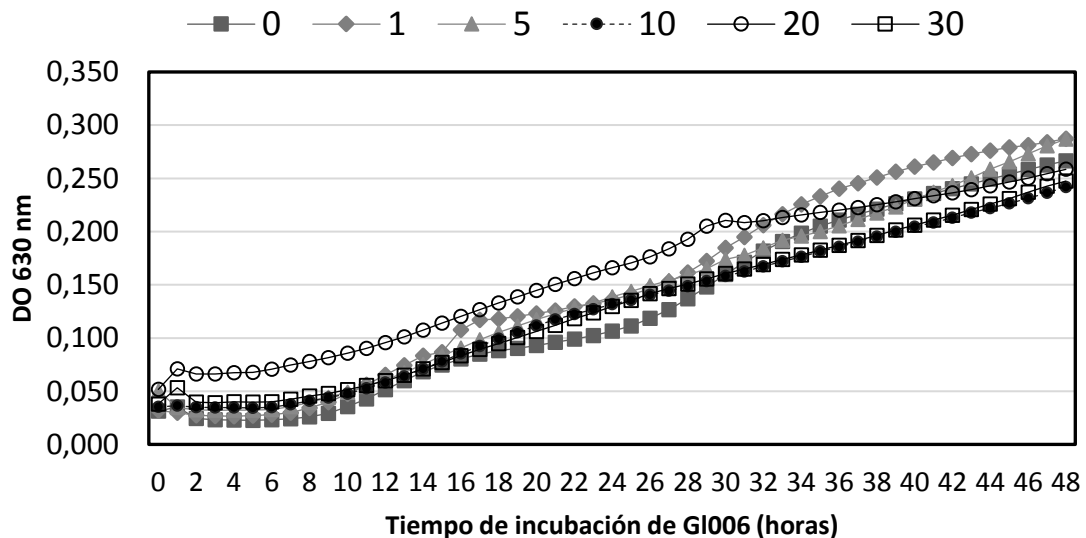


Figura 1-4. Crecimiento de *T. virens* GI006 en presencia de diferentes concentraciones del sobrenadante de *B. velezensis* Bs006. Sobrenadantes puros de Bs006 libres de células adicionados al medio PDB en 1, 5, 10, 20 y 30%. Crecimiento medido como densidad óptica (DO) en lector de microplacas durante 48 horas.

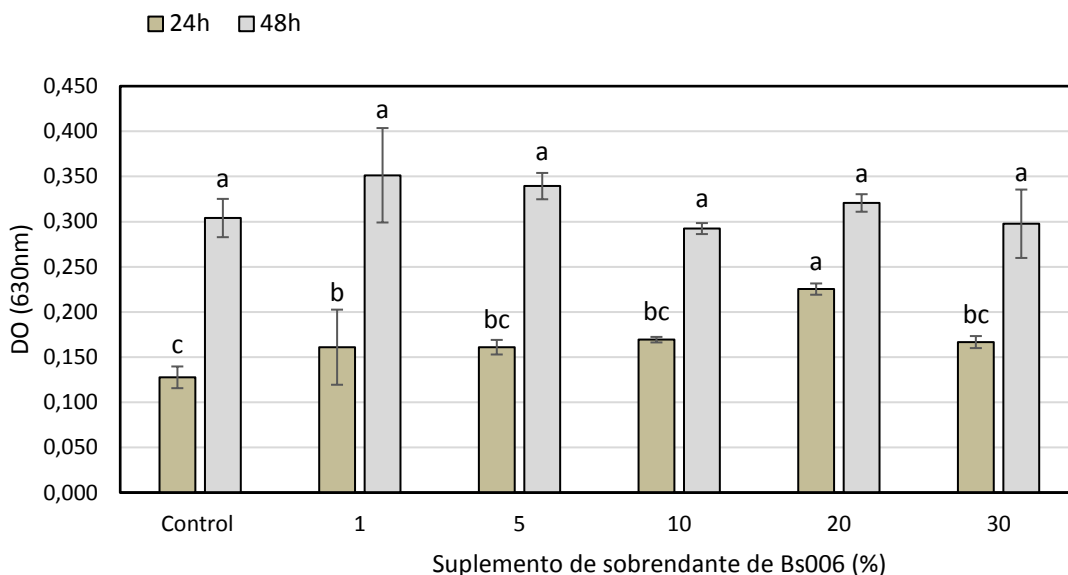


Figura 1-5. Crecimiento de *T. virens* GI006 expuesto a diferentes concentraciones de sobrenadante de *B. velezensis* Bs006. Sobrenadantes puros de Bs006 libres de células adicionados al medio PDB en 1, 5, 10, 20 y 30%. Crecimiento medido como densidad óptica (DO) en lector de microplacas durante 48 horas. Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para cada tiempo de evaluación. Barras sobre las columnas representan la desviación estándar de los datos (n=3)

En cuanto al crecimiento de Bs006 en presencia de sobrenadante de GI006, se observó que todas las concentraciones de sobrenadante evaluadas causaron retraso en el crecimiento de la bacteria a partir de ocho horas de fermentación (Figura 1-6). La disminución en el crecimiento fue proporcional a la concentración suplementada del sobrenadante, de acuerdo con las mediciones realizadas al cabo de 24 y 48 horas de exposición al sobrenadante (Figura 1-7). Se comprobó que el retraso en el crecimiento fue causado por los metabolitos de *T. virens* GI006 presentes en el medio de cultivo y no por acción del caldo PDB suplementado, teniendo en cuenta que la adición de caldo PDB no causó disminución en el crecimiento de la bacteria a las 24 horas de exposición (Anexo 4).

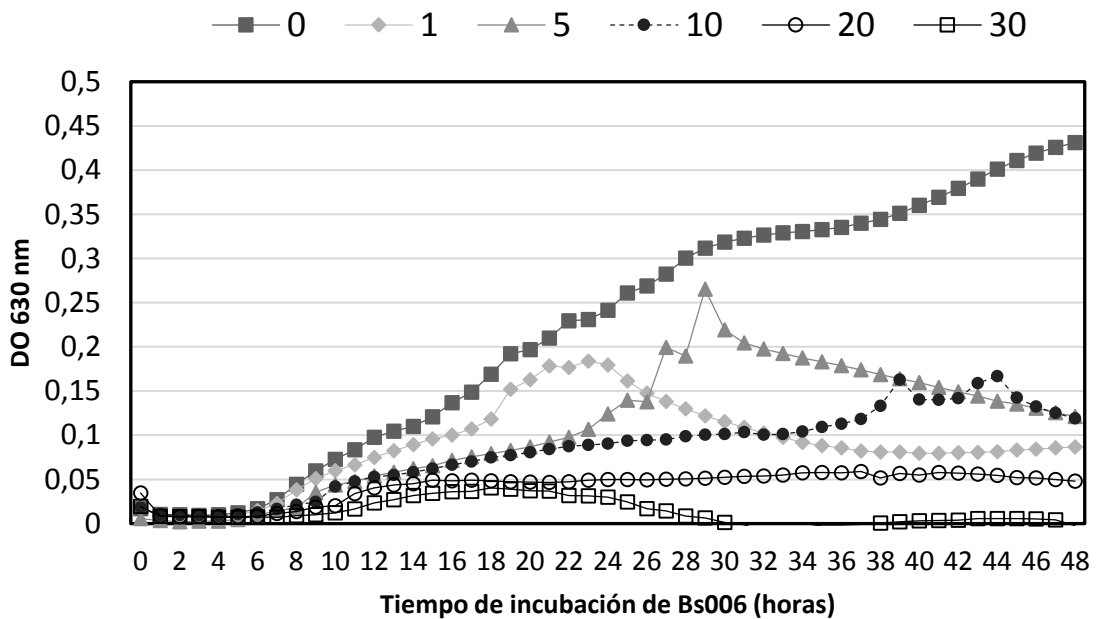


Figura 1-6. Crecimiento de *B. velezensis* Bs006 en presencia de diferentes concentraciones del sobrenadante de *T. virens* G1006. Sobrenadantes puros de G1006 libres de células adicionados al medio LB en 1, 5, 10, 20 y 30%. Crecimiento medido como densidad óptica (DO) en lector de microplacas durante 48 horas

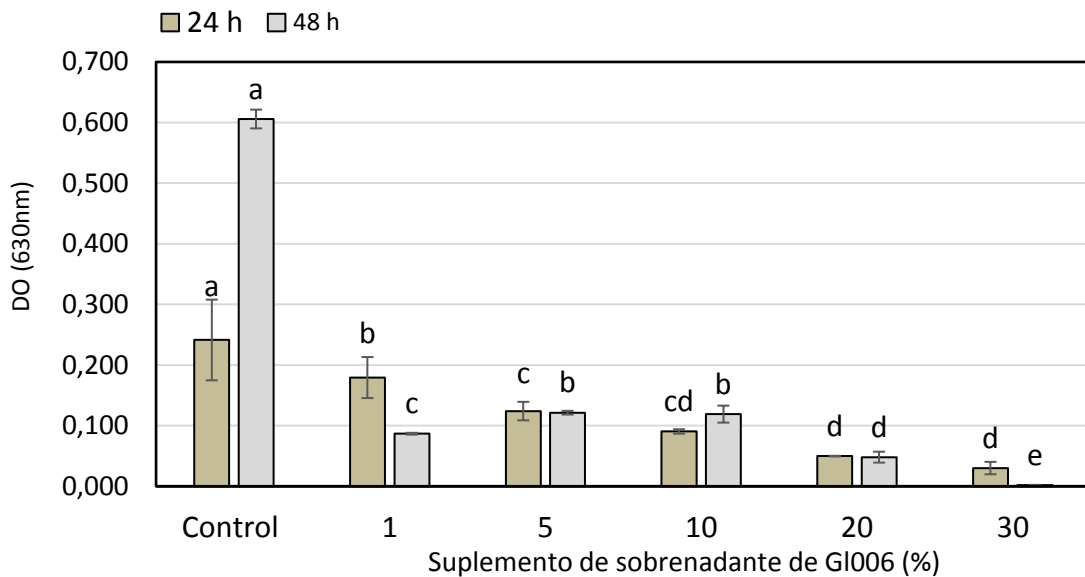


Figura 1-7. Crecimiento de *B. velezensis* Bs006 expuesto a diferentes concentraciones de sobrenadante de *T. virens* G1006. Sobrenadantes puros de G1006 libres de células adicionados al medio LB en 1, 5, 10, 20 y 30%. Crecimiento medido como densidad óptica (DO) en lector de microplacas a las 24 y 48 horas. Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para cada tiempo de evaluación. Barras sobre las columnas representan la desviación estándar de los datos (n=3)

Actividad antagónica

No se observó un efecto negativo sobre la actividad antagónica de *T. virens* GI006 después de someter sus conidios durante seis horas al sobrenadante de *B. velezensis* Bs006 en concentraciones de 1 a 30%, los valores de inhibición estuvieron en un rango de 76,3 a 78% (Figura 1-8). Resultados similares se observaron al someter las células de *B. velezensis* Bs006 al sobrenadante de *T. virens* GI006, ya que durante las seis horas de exposición directa no se afectó su actividad antagónica sobre Foph-Map5, la cual estuvo en un rango de 51,7 a 53,9% (Figura 1-9).

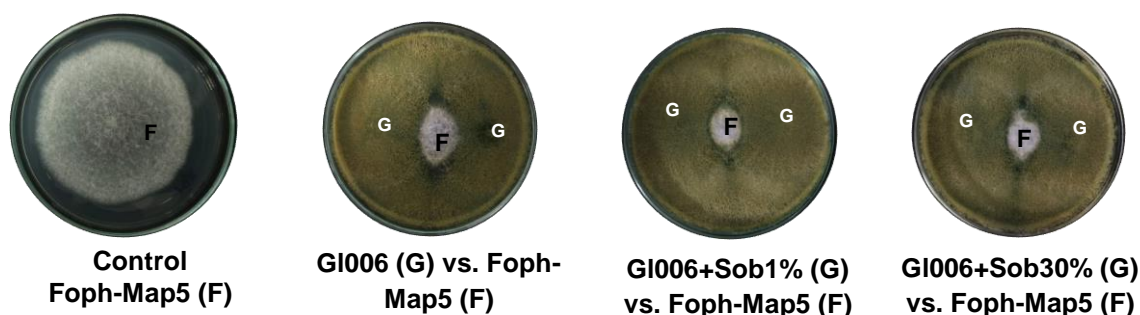


Figura 1-8. Actividad antagónica de *T. virens* GI006 expuesto al sobrenadante de Bs006 en enfrentamiento dual. Conidios de GI006 (G) expuestos durante seis horas a sobrenadantes puros de Bs006 libres de células en 1 y 30%. Inhibición medida de acuerdo con el crecimiento diametral de Foph-Map5 (control positivo - F) en medio PDA después de siete días de incubación a 25 °C.

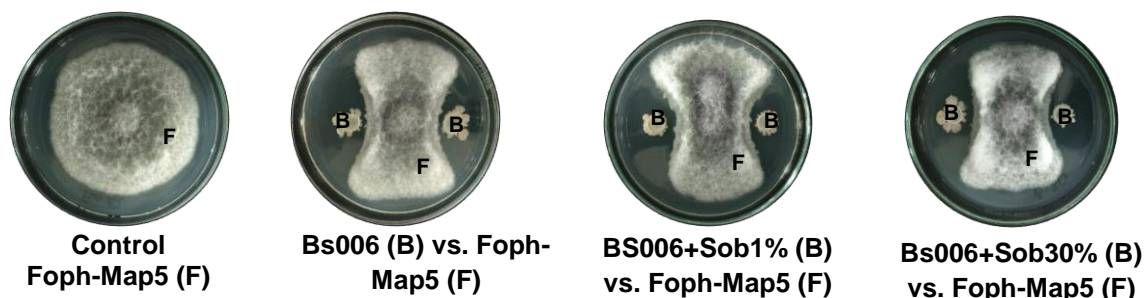


Figura 1-9. Actividad antagónica de *B. velezensis* Bs006 expuesto al sobrenadante de GI006. Células de Bs006 (B) expuestas durante seis horas a sobrenadantes puros de GI006 libres de células en 1 y 30%. Inhibición medida de acuerdo con el crecimiento diametral de Foph-Map5 (control positivo - F) en medio PDA después de siete días de incubación a 25 °C.

Germinación de conidios de GI006 y viabilidad de Bs006

Después de 24 horas de incubación, los conidios de *T. virens* GI006 expuestos al sobrenadante de Bs006 presentaron valores cercanos al 90% de germinación en agar agua, sugiriendo que ninguna de las concentraciones de sobrenadante de Bs006 causó

efectos negativos sobre los conidios de GI006 después de una y seis horas de exposición. En cuanto a la viabilidad de las células de Bs006 expuestas al sobrenadante de GI006, no se presentaron diferencias estadísticas y estas se mantuvieron en la misma concentración al ser expuestas durante una y seis horas (datos no mostrados).

Formación de biopelículas por Bs006

Se observó que la exposición de *B. velezensis* Bs006 durante 24 horas al sobrenadante de *T. virens* GI006 afectó la capacidad de la bacteria para formar biopelículas, en una forma dependiente de la concentración del sobrenadante del hongo. La exposición de células de Bs006 al 1% de sobrenadante de GI006 no mostró efectos negativos sobre la formación de biopelículas, pero concentraciones superiores la afectaron significativamente (Figura 1-10).

En relación con la evaluación de los co-cultivos entre GI006 con Bs006, se observó un efecto similar al anterior, también dependiente de la concentración de GI006 en el caldo de co-cultivo. La concentración más baja, 1×10^5 conidios. mL^{-1} no afectó la formación de biopelículas de Bs006, pero esta capacidad disminuyó cuando la bacteria creció en co-cultivo con GI006 en concentraciones de 1×10^6 y 1×10^7 conidios. mL^{-1} (Figura 1-11).

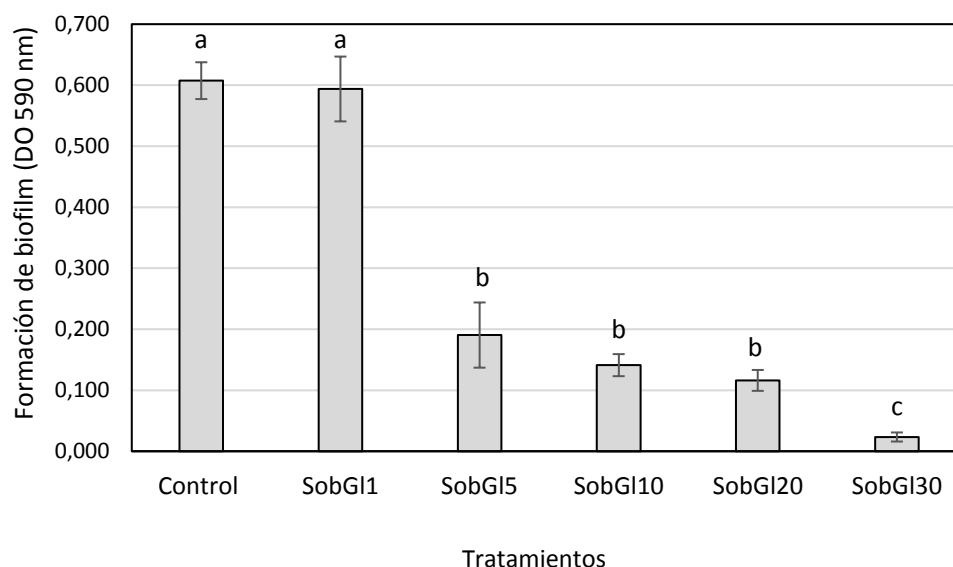


Figura 1-10. Formación de biopelículas de *B. velezensis* Bs006 en presencia del sobrenadante de *T. virens* GI006. *B. velezensis* Bs006 fue cultivado durante 24 h en caldo LB suplementado con sobrenadante de *T. virens* GI006 en concentraciones de 1 a 30% (SobGI1 – SobGI30). Control Bs006 sin adición de sobrenadante. Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha= 0.05$)

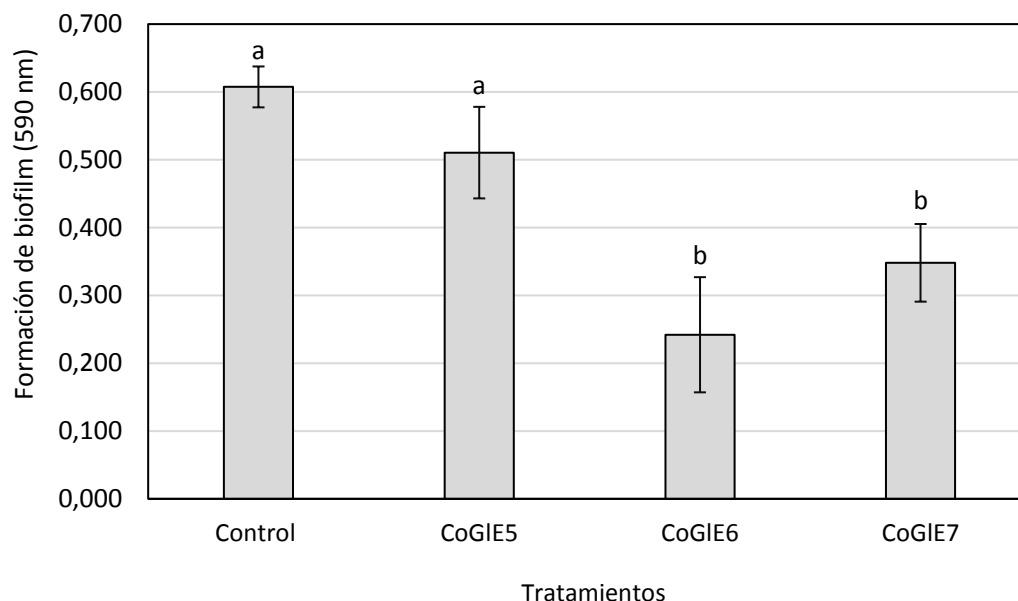


Figura 1-11. Formación de biopelículas de *B. velezensis* Bs006 crecida en co-cultivo con conidios de *T. virens* GI006. *B. velezensis* Bs006 fue cultivado durante 24 h en caldo LB suplementado con conidios viables de *T. virens* GI006 en concentraciones de 10^5 a 10^7 conidios.mL⁻¹ (CoGIE5 – CoGIE7). Control Bs006 solo sin conidios de GI006. Como control se utilizó el cultivo de Bs006 libre de conidios de GI006 (Control). Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha= 0.05$)

1.3.3 Interacción entre células en medio sólido

El mayor porcentaje de inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* Foph-Map5 en medio sólido fue causado por *T. virens* GI006 (>70%). Cuando se evaluó el enfrentamiento dual del co-cultivo de GI006 y Bs006 contra Foph se observó un efecto diferencial entre medios de cultivo. En LB, PDA y la combinación de LB con PDA el diámetro de la colonia de Foph-Map5 fue reducido de forma similar entre los tres tratamientos evaluados (GI006, Bs006 y la mezcla de GI006 con Bs006) (Figura 1-12), lo que sugiere que en esas condiciones hubo una interacción neutra entre los dos agentes de biocontrol.

En contraste, en los medios Suelo, Suelo-Exudados de raíz y Exudados de raíz, Bs006 no creció y no redujo el crecimiento de Foph-Map5, mientras que GI006 colonizó la superficie de estos medios e inhibió a *Fusarium*, en ambos tratamientos, cuando fue inoculado solo o como consorcio con Bs006 (Figura 1-12), lo que sugiere que el efecto de inhibición en dichas condiciones fue causado por GI006. En los medios que contenían exudados artificiales solos (EA) o preparados en solución de suelo (SEA), los tres tratamientos

redujeron el crecimiento de Foph-Map5 pero GI006 presentó la mayor inhibición (96 y 75% respectivamente), eficacia significativamente más alta que el consorcio, en el medio SEA, pero no en solo exudados artificiales EA (Figura 1-12), mientras que en estos dos medios Bs006 creció e inhibió el crecimiento de *Fusarium* entre 45 y 50%. En estas condiciones de evaluación, no se presentó un efecto aditivo o sinérgico en el tratamiento del consorcio, teniendo en cuenta que la eficacia más alta en estas pruebas de antagonismo fue presentada por *T. virens* GI006 en los medios que contenían suelo y/o exudados de uchuva (Figura 1-12).

La co-inoculación de Foph-Map5 con GI006 y Bs006 en la misma suspensión microbiana sobre medios sólidos, mostró un 100% de inhibición de Foph-Map5. Sin embargo, en los medios sintéticos solo *B. velezensis* Bs006 presentó crecimiento, mientras que en los que contenían solución de suelo y exudados artificiales, se observó el crecimiento de los dos agentes de biocontrol (Tabla 1-3 y Figura 1-13).

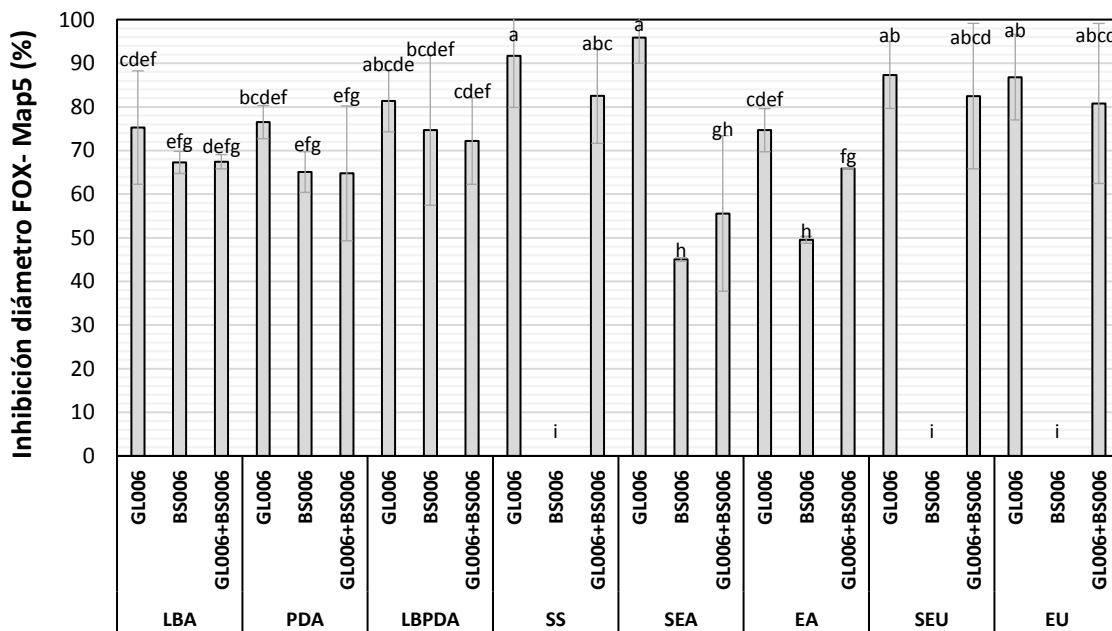


Figura 1-12. Inhibición del crecimiento de la colonia de Foph-Map5 en medio sólido por GI006, Bs006 y su mezcla. Las líneas verticales sobre las columnas representan la desviación estándar entre las unidades experimentales de tres réplicas en el tiempo (n=12). Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha= 0.05$)

Tabla 1-3. Crecimiento de microorganismos inoculados en mezcla en diferentes medios de cultivo³

Medio de cultivo	<i>T. virens</i> GI006	<i>B. velezensis</i> Bs006	Foph-Map5
EA	+	+	-
EU	+	-	-
SS	+	-	-
SEA	+	+	-
SEU	+	-	-
LBA	-	+	-
PDA	-	+	-
LBPDA	-	+	-

En las pruebas de enfrentamiento dual *T. virens* GI006 y *B. velezensis* Bs006, se encontró que en los medios sintéticos de uso regular PDB y LB, Bs006 inhibió el crecimiento de *T. virens* GI006 en 60%, mientras que en el medio suelo y exudados sintéticos la inhibición fue de 50%. En contraste, en los medios suelo y exudados de uchuva Bs006 no inhibió el crecimiento de *T. virens* (Figura 1-14).

³ Inoculación de una suspensión de 10 µL que contenía una mezcla de GI006 (1×10^6 conidios.mL⁻¹) y/o Bs006 (1×10^8 células.mL⁻¹) en mezcla con Foph-Map5 (1×10^5 microconidios.mL⁻¹) en el centro de una caja de Petri de 90 mm de diámetro con medio PDA, después de siete días de incubación a 25 °C.

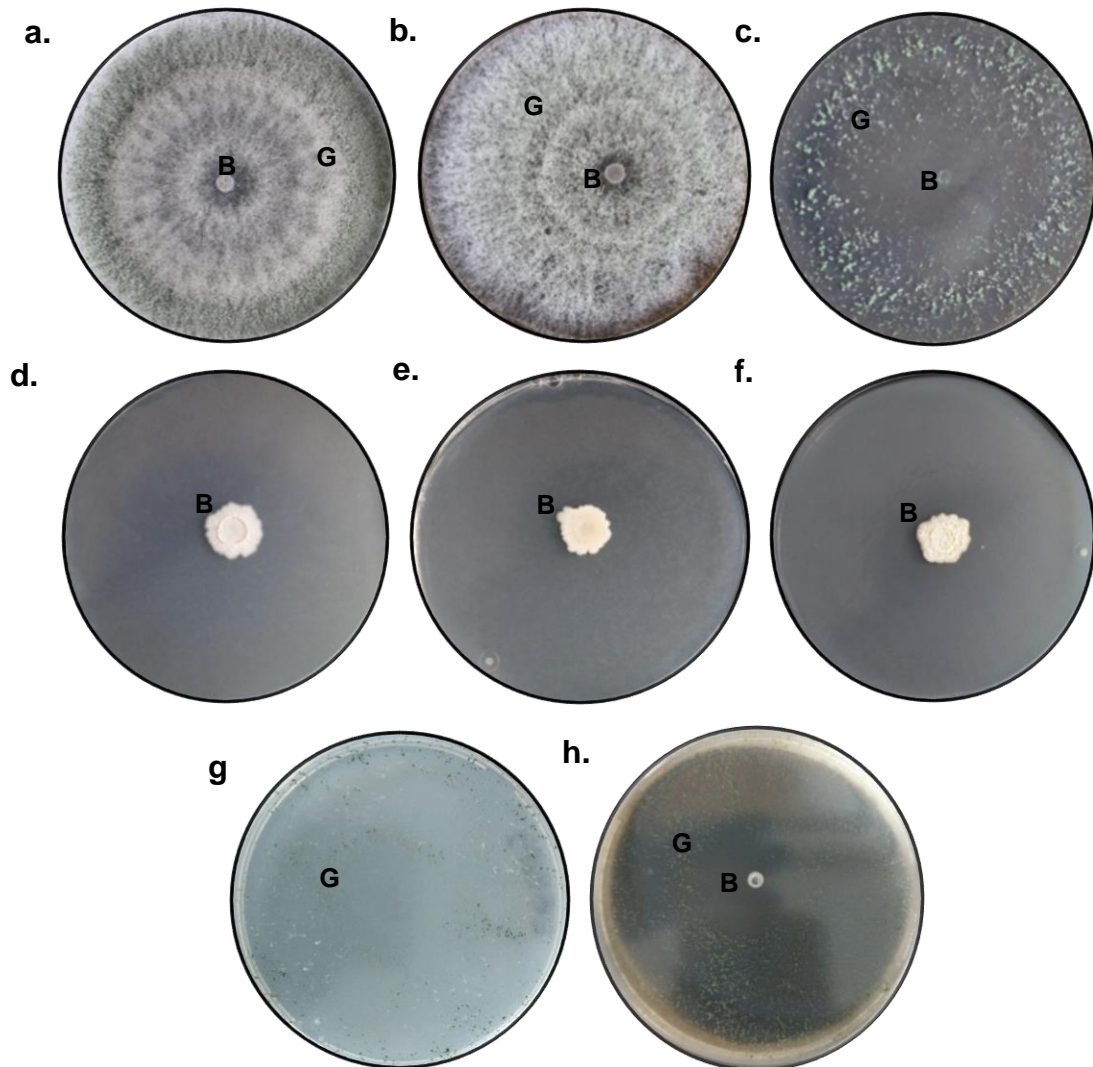


Figura 1-13. a. Crecimiento de microorganismos sobre diferentes medios de cultivo desde una suspensión de GI006 (G), Bs006 (B) y Foph-Map5 (F). Inoculación de una suspensión de 10 μL que contenía una mezcla de GI006 (1×10^6 conidios. mL^{-1}) y/o Bs006 (1×10^8 células. mL^{-1}) en mezcla con Foph-Map5 (1×10^5 microconidios. mL^{-1}) en el centro de una caja de Petri de 90 mm de diámetro con medio PDA, después de siete días de incubación a 25 °C. **a.** (EA), exudados radicales sintéticos. **b.** extracto de suelo+ exudados radicales sintéticos (SEA), **c.** extracto de suelo (SS), **d.** LBA, **e.** PDA, **f.** PDA (50%)+LBA (50%), **g.** exudados radicales de uchuva (EU), **h.** extracto de suelo+exudados (SEU)

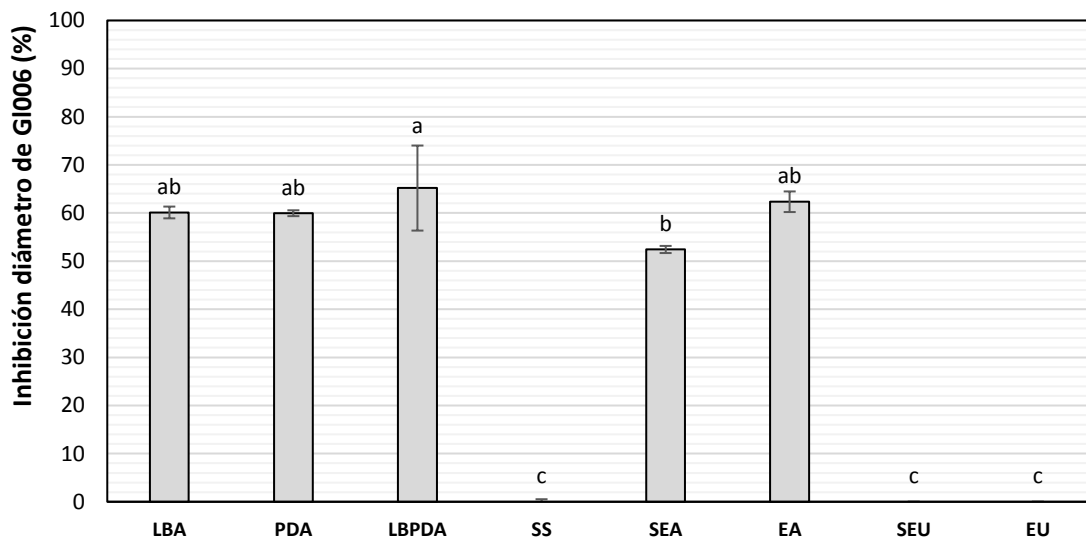


Figura 1-14. Inhibición del diámetro de la colonia de *T. virens* GI006 en pruebas de enfrentamiento dual con *B. velezensis* Bs006 en diferentes medios de cultivo. Bs006 (2 gotas de 10 μ L, 10^8 ufc.mL⁻¹, en puntos extremos) y GI006 (una gota de 10 μ L, 10^6 conidios.mL⁻¹ en el centro) se inocularon simultáneamente en las cajas de Petri. Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha= 0.05$). Las barras sobre las columnas representan la desviación estándar de los datos (n=5)

Interacción de GI006 y Bs006 en microcultivo

Al inocular los microorganismos *T. virens* GI006 y *B. velezensis* Bs006 sobre un soporte gelificado de exudados radicales de uchuva, se observó que los conidios de GI006 germinaron y sus hifas se extendieron hasta la zona de interacción (ZI) de los dos microorganismos. Se observó la presencia de esporas de Bs006 adheridas a los conidios no germinados (Figura 1-15) y germinados (Figura 1-16c y Figura 1-16d). Las células de Bs006 también se adherieron a las hifas de GI006 formando agregados a manera de biopelícula (Figura 1-16b).

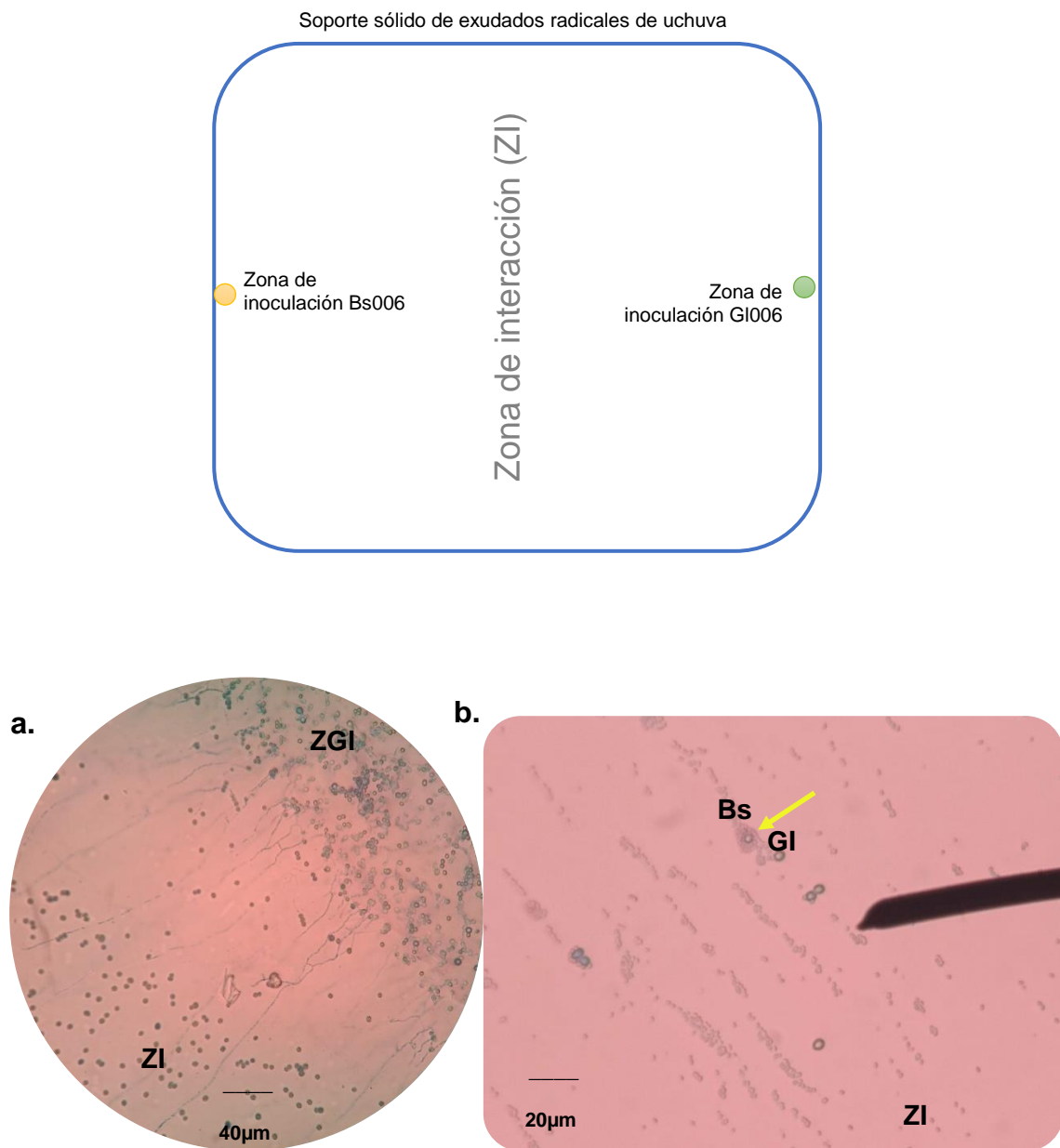


Figura 1-15. Interacción entre *T. virens* GI006 y *B. velezensis* Bs006 en soporte sólido de exudados radicales de uchuva bajo microscopio óptico. **a.** Zona de inoculación de *T. virens* GI006 **b.** Zona de interacción (ZI). Flechas amarillas indican formación de biopelícula de *B. velezensis* Bs006 sobre conidios de *T. virens* GI006 después de 72 horas de contacto. **Bs**= células de Bs006, **GI**= conidios de GI006

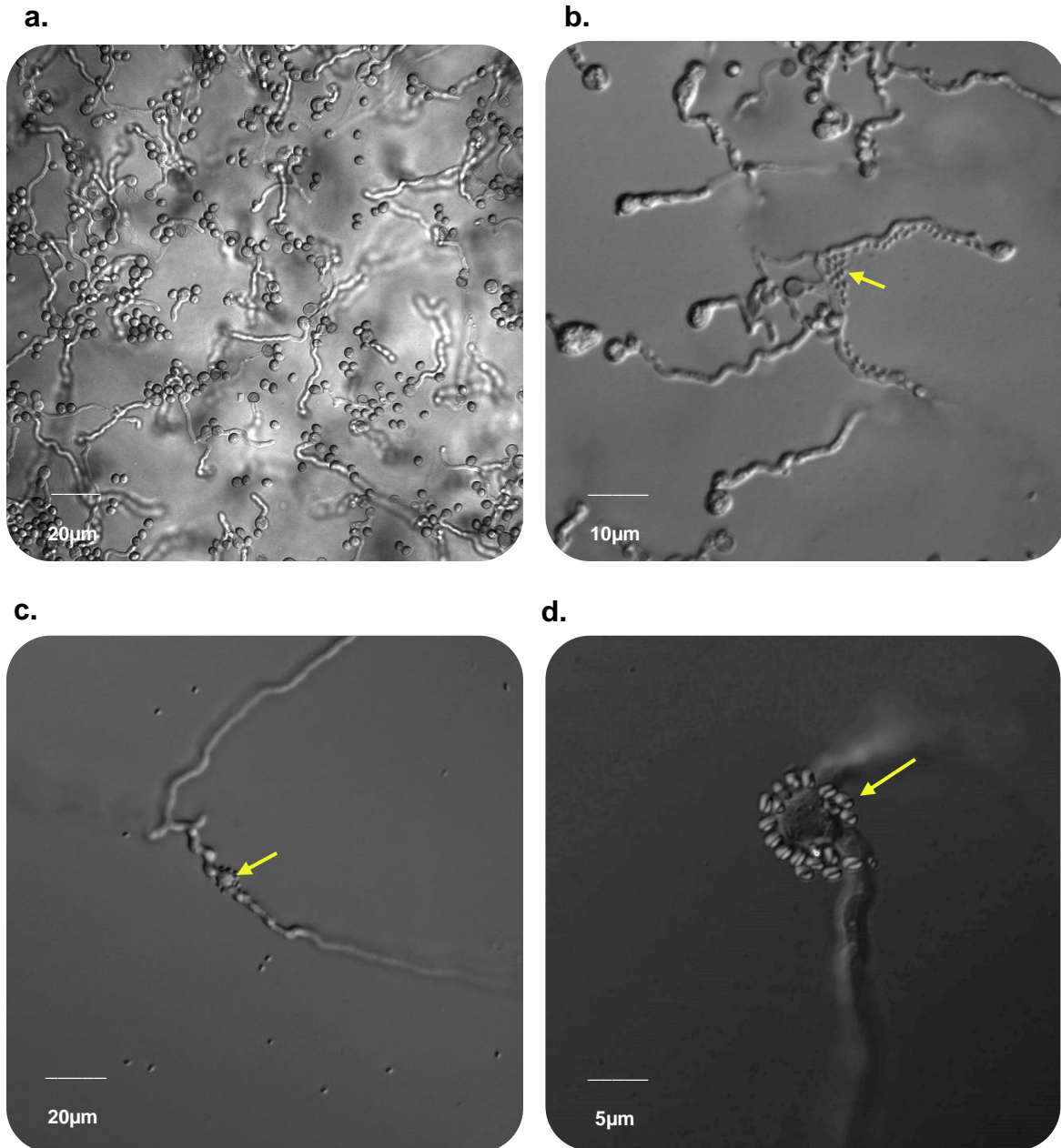


Figura 1-16. Interacción entre *T. virens* GI006 y *B. velezensis* Bs006 en soporte sólido de exudados radicales de uchuva bajo microscopio de fluorescencia. **a.** Conidios de *T. virens* GI006 germinados en ausencia de *B. velezensis*. **b, c y d.** Interacción entre conidios de GI006 y células de Bs006. Las flechas amarillas indican esporas Bs006 en inicio de formación de biopelícula sobre conidios germinados e hifas de GI006 después de 72 horas de contacto

1.3.4 Interacción entre sobrenadantes y células de GI006 y Bs006 en invernadero

Al evaluar el efecto sobre el progreso del marchitamiento vascular de la aplicación de células de *B. velezensis* Bs006 suspendidas en solución de sobrenadante de *T. virens* GI006 y viceversa, de la combinación de células de ambos microorganismos y de la combinación de sobrenadantes de ambos agentes de biocontrol, se encontró que los tratamientos de combinación de células de Bs006 y conidios de GI006, de los sobrenadantes de ambos microorganismos y el de la suspensión de conidios de GI006 en solución sobrenadante de Bs006 redujeron significativamente el progreso de la incidencia (Figura 1-17) y la severidad (Figura 1-18) de la enfermedad (Anexo 6), en comparación con el control negativo, mientras que la suspensión de células de Bs006 en la solución sobrenadante de GI006 aumentó el control de la enfermedad con respecto a sus controles células de Bs006 y sobrenadantes de GI006.

De forma interesante, se observó que el tratamiento de biocontrol de las células de Bs006 suspendidas en su sobrenadante redujo la eficacia de biocontrol del progreso de la enfermedad, en comparación con la aplicación del sobrenadante solo o de las células de Bs006 suspendidas en agua (Figura 1-17, Figura 1-18 y Tabla 1-4). La aplicación de los conidios de *T. virens* GI006 suspendidos en agua o en su sobrenadante o la aplicación del sobrenadante libre de células, redujeron significativamente el progreso de la enfermedad, de forma similar a la combinación de componentes de los dos agentes de biocontrol (Figura 1-17, Figura 1-18; y Tabla 1-4). La combinación de los componentes sobrenadante de Bs006 con conidios de GI006 presentó sinergia en la reducción de la severidad de la enfermedad 50 días después de la aplicación de tratamientos (Tabla 1-4).

Cuando se evaluaron las interacciones en el día 50 ddi, se observó que el tratamiento que contenía los caldos de los dos microorganismos presentó la eficacia de control más alta de la incidencia y la severidad (36 y 41%, respectivamente), seguido por el tratamiento de caldo de Bs006 y células de GI006 (18 y 22% respectivamente) y caldo y células de GI006 (9 y 25%, respectivamente), siendo estos los que presentaron una interacción sinérgica en el control de la enfermedad (Tabla 1-5). El tratamiento células de Bs006 combinado con el sobrenadante de GI006, aunque presentó una eficacia de 28%, no mostró una interacción aditiva o sinérgica de control de la enfermedad registrada el día 50 ddi (Tabla 1-5).

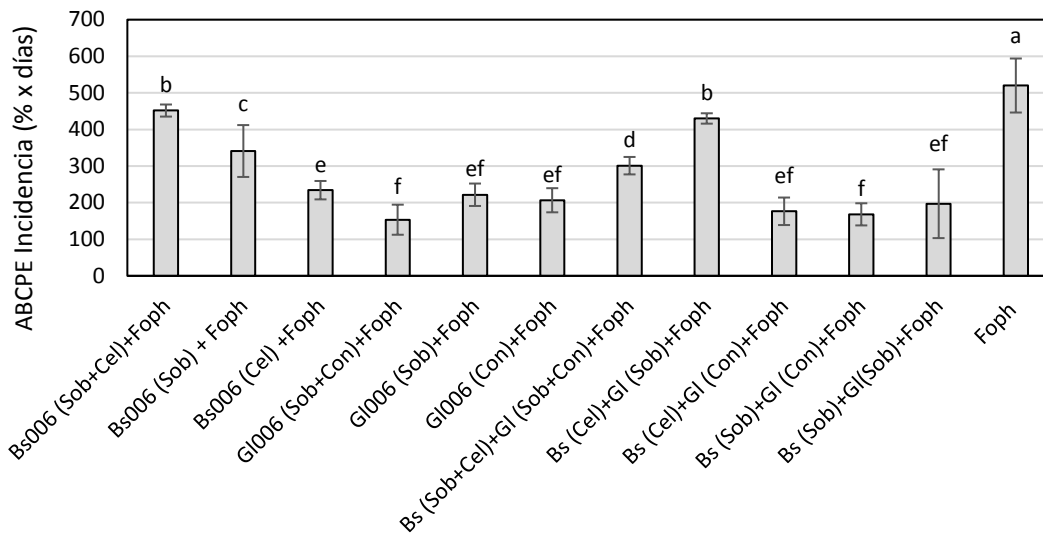


Figura 1-17. Efecto de la combinación de células y sobrenadantes de GI006 y Bs006 sobre el progreso de la incidencia de la enfermedad. Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba rango múltiple de Duncan ($\alpha= 0.05$). Con= Conidios, Cel= células, Bs=*B. velezensis*, Bs006, GI=*T. virens* GI006. Sob= sobrenadante libre de células.

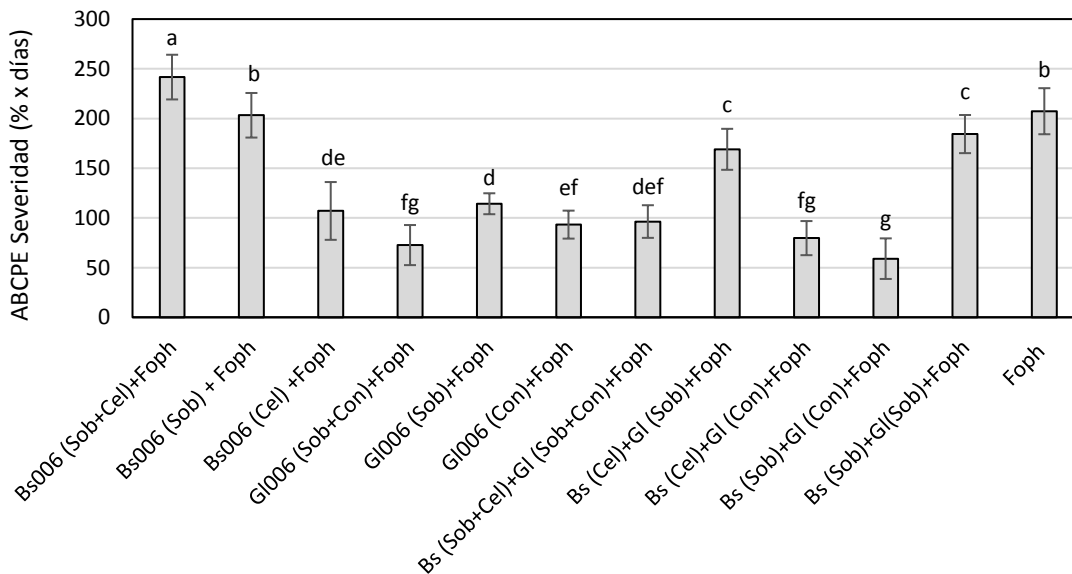


Figura 1-18. Efecto de la combinación de células y sobrenadantes de GI006 y Bs006 sobre el progreso de la severidad de la enfermedad. Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba rango múltiple de Duncan ($\alpha= 0.05$). Con= Conidios, Cel= células, Bs=*B. velezensis*, Bs006, GI=*T. virens* GI006. Sob= sobrenadante libre de células.

Tabla 1-4. Factor de sinergia de la eficacia de control del progreso de la incidencia y la severidad del marchitamiento vascular⁴

Tratamiento	ABCPE 50 ddi							
	Eficacia INC (%)	Eficacia esperada	SF	Interacción	Eficacia SEV (%)	Eficacia esperada	SF	Interacción
Bs006 (Sob+Cel)	13,1	70,5	0,18	Antagónica	0,0	49,4	0	Antagónica
Bs006 (Sob)	34,4	--	--	--	2,0	--	--	--
Bs006 (Con)	55,0	--	--	--	48,4	--	--	--
GI006 (Sob+Con)	70,5	83,1	0,85	Antagónica	65,0	75,2	0,9	Antagónica
GI006 (Sob)	57,4	--	--	--	44,9	--	--	--
GI006 (Con)	60,3	--	--	--	55,0	--	--	--
Bs (Sob+Cel)+GI (Sob+Con)	42,1	74,4	0,56	Antagónica	53,5	65,0	0,8	Antagónica
Bs (Cel)+GI (Sob)	17,3	80,8	0,21	Antagónica	18,5	71,6	0,3	Antagónica
Bs (Cel)+GI (Con)	66,1	82,1	0,80	Antagónica	61,6	76,8	0,8	Antagónica
Bs (Sob)+GI(Con)	67,7	74,0	0,91	Antagónica	71,5	55,9	1,3	Sinérgica
Bs (Sob)+GI(Sob)	62,1	72,1	0,86	Antagónica	11,1	46,0	0,2	Antagónica

Tabla 1-5. Factor de sinergia de la eficacia de control de la incidencia y la severidad del marchitamiento vascular registrados al finalizar el experimento (50 ddi)²²

Tratamiento	50 ddi							
	Eficacia INC (%)	Eficacia esperada	SF	Interacción	Eficacia SEV (%)	Eficacia esperada	SF	Interacción
Bs006 (Sob+Cel)	0,0	18,2	0	Antagónica	0,0	25,0	0,0	Antagónica
Bs006 (Sob)	0,0	--	--	--	0,0	--	--	--
Bs006 (Con)	18,2	--	--	--	25,0	--	--	--
GI006 (Sob+Con)	9,1	9,1	1	Aditiva	25,0	21,9	1,1	Sinérgica
GI006 (Sob)	9,1	--	--	--	21,9	--	--	--
GI006 (Con)	0,0	--	--	--	0,0	--	--	--
Bs (Sob+Cel)+GI (Sob+Con)	0,0	9,1	0	Antagónica	9,4	25,0	0,4	Antagónica
Bs (Cel)+GI (Sob)	9,1	25,6	0,4	Antagónica	28,1	41,4	0,7	Antagónica
Bs (Cel)+GI (Con)	9,1	18,2	0,5	Antagónica	21,9	25,0	0,9	Antagónica
Bs (Sob)+GI(Con)	18,2	0,0	18,2	Sinérgica	21,9	0,0	21,9	Sinérgica
Bs (Sob)+GI(Sob)	36,4	9,1	4	Sinérgica	40,6	21,9	1,9	Sinérgica

⁴ Los agentes de biocontrol *B. velezensis*: Bs006 y *T. virens*: GI006 se aplicaron en concentraciones de 10^8 ufc.mL⁻¹ y 10^6 conidios.mL⁻¹, respectivamente inmediatamente después del trasplante. La solución sobrenadante de Bs006 y GI006 se aplicaron en concentraciones de 8,5% y 0,25%, respectivamente. Con= Conidios, Cel= células, Bs=*B. velezensis*, Bs006, GI=*T. virens* GI006. Sob= sobrenadante libre de células.

1.3.5 Interacción de GI006 y Bs006 *in planta* (Microscopía ambiental de tejido vegetal)

En las muestras de la semilla inoculada con los microorganismos biocontroladores, se observó la colonización por parte de *T. virens* GI006, formando una red sobre la testa (Figura 1-19b). En la radícula se observó el micelio de *T. virens* alrededor de los pelos radicales. Sin embargo, se encontraron algunos conidios que en este tiempo no germinaron (Figura 1-20a). Por otra parte, las células de *B. velezensis* Bs006 se observaron formando una biopelícula sobre la superficie tanto de la semilla como de la radícula (Figura 1-19c y Figura 1-20b). Cuando se inocularon al mismo tiempo los dos microorganismos sobre el hospedero, se observó que los dos colonizaron la superficie del tejido vegetal, *T. virens* formando una red y *B. velezensis* formando una biopelícula (Figura 1-19 y Figura 1-20).

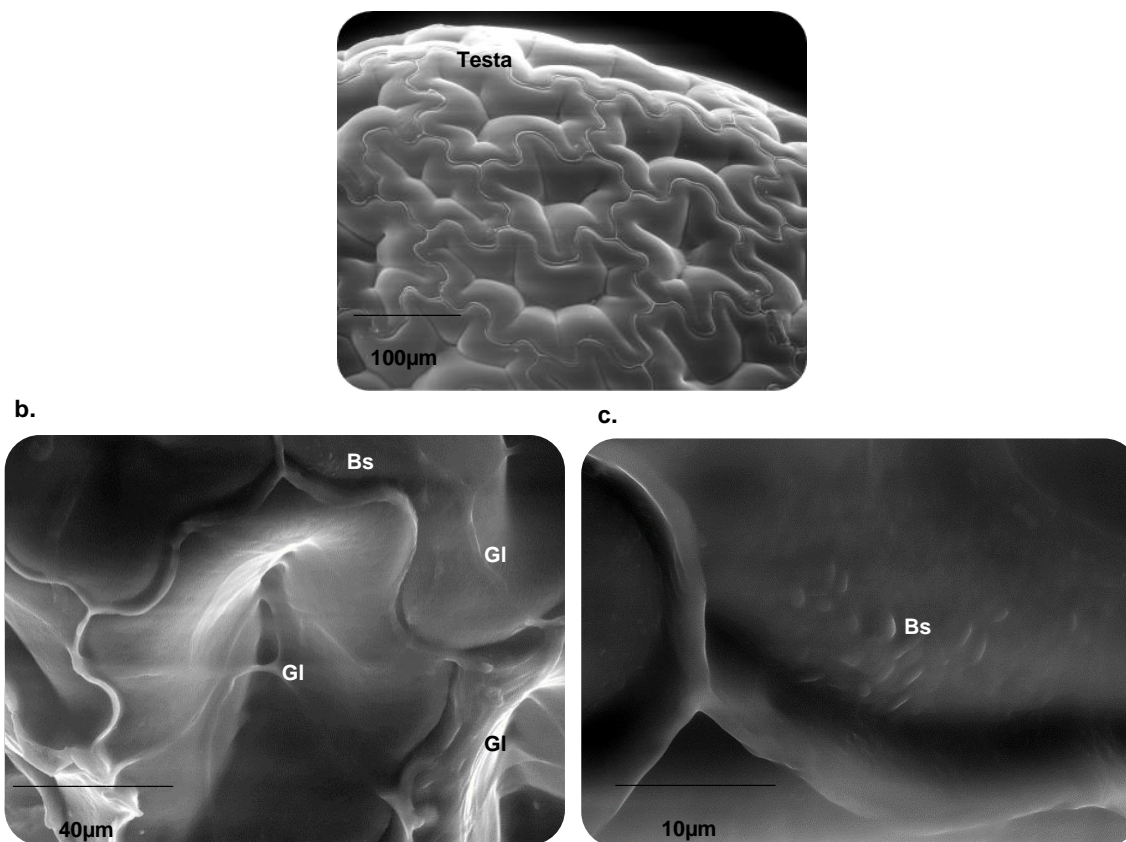


Figura 1-19. Imágenes de microscopía de barrido ambiental de tejido vegetal de semillas de uchuva inoculadas con *T. virens* GI006 y *B. velezensis* Bs006. **a.** Testa de semilla sin inocular, **b y c.** Semilla co-inoculada con GI006 y Bs006. **Bs:** células de *B. velezensis* Bs006, **GI:** hifas de *T. virens* GI006. Las muestras fueron observadas 24 horas después de la inoculación e incubación en cámaras húmedas a 25 °C

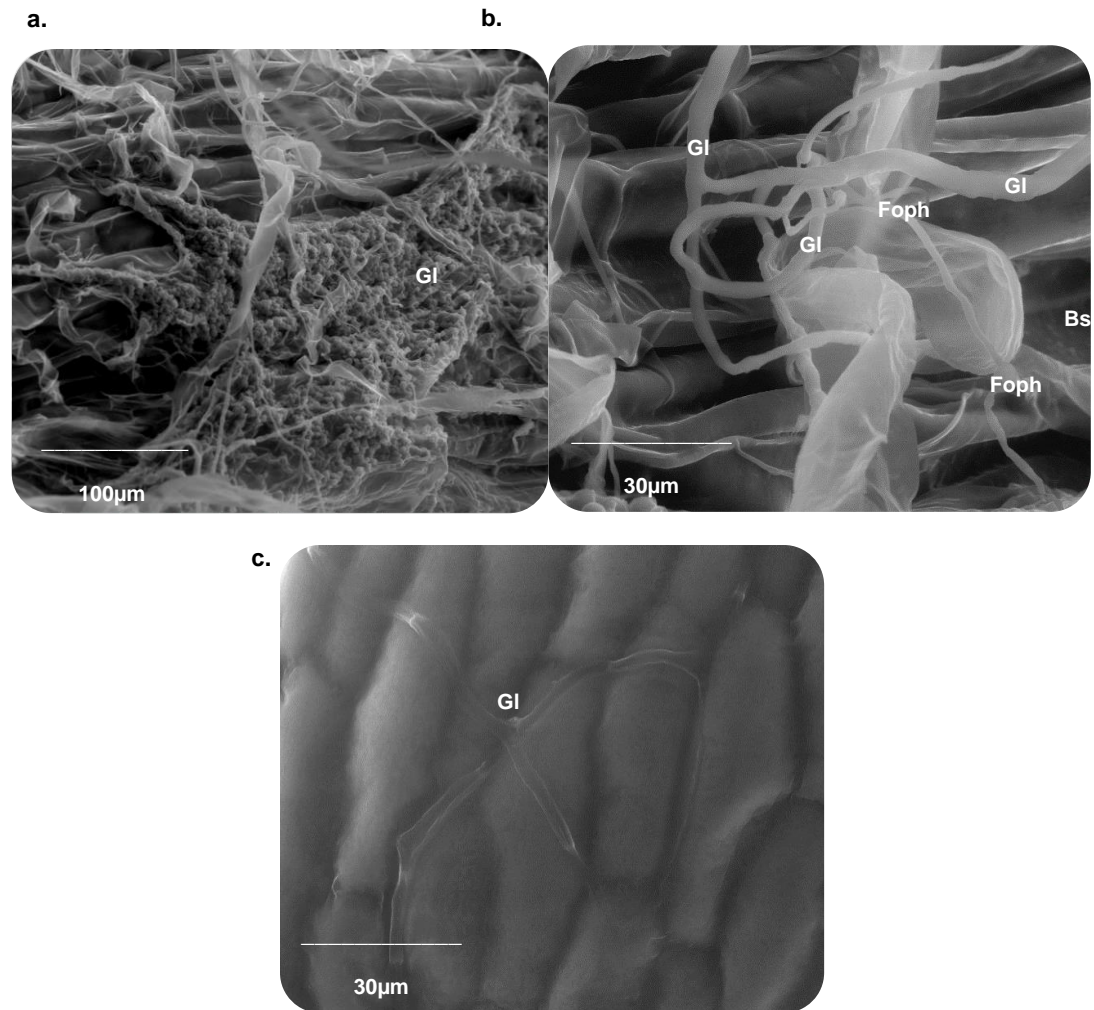


Figura 1-20. Imágenes de microscopía de barrido ambiental de tejido vegetal de semillas de uchuva germinadas e inoculadas con *T. virens* GI006 y *B. velezensis* Bs006. **a.** Red de conidios de *T. virens* GI006 sobre el cuello de la plántula de uchuva, **b.** Plántula co-inoculada con Bs006, GI006 y *Foph-Map5*, **c.** Hifas de GI006 sobre la superficie de la raíz principal, **Bs:** células de Bs006, **GI:** hifas de GI006, **Foph:** *F. oxysporum* f. sp. *physali-Map5*

1.4 Discusión

Aunque el uso de consorcios no siempre contribuye al aumento de la eficacia de control, su empleo podría reducir la variabilidad de los resultados de biocontrol (Guetsky et al., 2002; Xu et al., 2011). Algunos estudios han sugerido que el control biológico de fitopatógenos puede incrementarse, mediante el empleo de múltiples cepas o microorganismos, en particular cuando estos presentan diferentes modos de acción (Sylla et al., 2013).

También se han descrito resultados de consorcios que no presentan consistencia entre lo observado en condiciones de laboratorio, invernadero o en campo. Tal es el caso del estudio hecho por Duffy et al. (1996) en el que la evaluación de la combinación de *T. koningii*, con *P. fluorescens* QZ87 y *P. chlororaphis* 30-84 mostró mayor supresión de la pudrición radical que las cepas individuales en cámara húmeda, pero no en condiciones de campo.

En la mayoría de los trabajos publicados los tamizajes iniciales de mezclas de microorganismos se realizan en condiciones de laboratorio con medios sintéticos de uso regular para el crecimiento de bacterias y hongos, tales como medio nutritivo, PDA o LBA. De acuerdo con Weller (1988), los mejores controladores *in planta* no son los que muestran una mayor habilidad de inhibir el patógeno *in vitro* en agar y los que presentan los halos de inhibición más grandes y es por ello que se han diseñado ensayos *in vitro* con condiciones cercanas a las naturales, en las que se emplean los mismos fragmentos del hospedero en el que se quiere evaluar el biocontrolador. Por ello los experimentos bajo invernadero son más confiables para hacer la selección inicial de microorganismos biocontroladores.

En este trabajo encontramos que el medio de cultivo influyó en la respuesta de compatibilidad entre *T. virens* GI006 y *B. velezensis* Bs006, ya que favoreció el crecimiento de la bacteria, la cual inhibió completamente el crecimiento del hongo, lo cual no fue observado en los medios que contenían solución de suelo y exudados de la raíz de uchuva, en los cuales solo creció *T. virens*. Al respecto, se conoce que *Trichoderma* spp. coloniza ambientes pobres en nutrientes, incluso un estrés a nivel nutricional puede ser un

prerrequisito para la expresión de rasgos tan importantes en su actividad biocontroladora, como la producción de algunas enzimas degradadoras de la pared celular (Hjeljord, Stensvand y Tronsmo, 2001). A diferencia de lo encontrado en el medio solución de suelo, GI006 y Bs006 crecieron en los medios que contenían exudados radicales sintéticos, los cuales contienen mayor disponibilidad de nutrientes que el medio solución de suelo.

De otra parte, durante la construcción de consorcios es importante la proporción del inóculo con el fin de evitar el agotamiento de fuentes de energía por una especie dominante (Bhatia et al., 2018; Hibbing et al., 2010). En este estudio se evaluaron dos concentraciones de Bs006 que de acuerdo con la literatura presentaban eficacia de forma individual contra *Foph* (Moreno, 2017) encontrando mayor eficacia del consorcio cuando se empleó la concentración más alta de células de *B. velezensis* Bs006 (1×10^8 ufc.mL⁻¹) suspendidas en el sobrenadante del caldo fermentado. Teniendo en cuenta que el crecimiento de Bs006 en caldo LB llega a una concentración promedio de $1,2 \times 10^9$ ufc.mL⁻¹ después 48 horas, particularmente en el tratamiento mencionado (Bs006 1×10^8 ufc.mL⁻¹ de solución sobrenadante) se empleó 8.3% de sobrenadante libre de bacteria, mientras que para la concentración más baja (Bs006 1×10^7 ufc.mL⁻¹) se empleó 0,83% de sobrenadante.

Dado que la concentración de metabolitos antimicrobianos de *B. velezensis* FZB42 en la rizósfera es baja, su actividad directa en la supresión de fitopatógenos del suelo es dudosa (Chowdhury et al., 2015), lo cual podría explicar la ausencia de control de la enfermedad al adicionar los sobrenadantes simultáneamente con el patógeno. Sin embargo, en el presente trabajo ni la aplicación del sobrenadante de *B. velezensis* Bs006, ni de sus células acompañadas de su sobrenadante (0.83 y 8.3%), mostraron alta eficacia de control de la enfermedad, a pesar de aplicar concentraciones de metabolitos antimicrobianos más altas a las que probablemente se produzcan en la rizósfera. Sugiriendo que en la rizósfera o en la planta se encuentran otros factores que influyen en la función antagónica de estos metabolitos sintetizados por Bs006.

Otros autores han encontrado que dosis subletales de antibióticos en el suelo pueden presentar un efecto sobre el patógeno, modulando su transcriptoma en lugar de causar toxicidad o muerte. Estos antibióticos pueden persistir en el suelo actuando como moléculas señalizadoras, permitiendo las interacciones entre comunidades microbianas presentes allí (Arseneault y Fillion 2017), por lo que la actividad de los metabolitos no sería

directamente proporcional a su concentración ni tener un efecto directo eficaz sobre el patógeno como se mencionó anteriormente.

Palmieri et al. (2017) publicaron una eficacia de 93% en el biocontrol de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* con un consorcio conformado por *P. fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Rahnella aquatilis* y *B. amyloliquefaciens* aplicando un total de 1×10^6 ufc.g⁻¹ de suelo. En el presente estudio la dosis más efectiva del consorcio de *T. virens* GI006 y *B. velezensis* Bs006 (empleando células sin sobrenadantes), fue aquella en la que se empleó un total de 5×10^6 células.g⁻¹ de suelo, al adicionar en mezcla Bs006 1×10^6 ufc.g⁻¹ de suelo y GI006 5×10^4 ufc.g⁻¹ de suelo.

Hervás et al. (1998) encontraron que al emplear un consorcio de *T. harzianum* y *B. subtilis* en concentraciones de 1×10^5 y 1×10^6 ufc.g⁻¹ de suelo, respectivamente, controló eficientemente la enfermedad causada por *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* en garbanzo. Sin embargo, no presentó un efecto aditivo o sinérgico en el control de la enfermedad. De acuerdo con nuestro conocimiento este es el primer trabajo en donde se evalúa el efecto de diferentes dosis de los microorganismos dentro de un consorcio, sobre su actividad biocontroladora.

En el presente estudio, en condiciones *in vitro*, se encontró que el sobrenadante de *B. velezensis* libre de células adicionado al medio de cultivo en concentraciones de 1 y 20%, tendió a estimular el crecimiento de GI006 durante las primeras 24 h de exposición. Sin embargo, después de este tiempo no hubo ningún tipo de efecto sobre el crecimiento de GI006 (Figura 1-4 y Figura 1-5). Así mismo, la exposición de conidios de GI006 al sobrenadante de Bs006 hasta por seis horas, no afectó su actividad antagónica ni su viabilidad, sugiriendo alta compatibilidad entre GI006 con los compuestos antibióticos sintetizados por Bs006 y excretados al medio, e indicando también el alto potencial de uso de estos dos agentes de biocontrol en un consorcio.

El intercambio de metabolitos y señales de comunicación entre miembros de un consorcio podrían aumentar o mejorar el fin de un consorcio artificial (Bhatia et al. 2018). Sin embargo, en el presente estudio se observó que los metabolitos de Bs006 contenidos en su sobrenadante, no afectaron ni positiva ni negativamente la actividad de GI006. No

obstante, se observó que la exposición de Bs006 a los metabolitos de GI006 si afectó negativamente el crecimiento de la bacteria (Figura 1-6 y Figura 1-7) y su actividad biocontroladora (Figura 1-17 y Figura 1-18), en una forma dependiente de la concentración, aunque no afectó su viabilidad ni antagonismo *in vitro*. Lo que sugiere también que Bs006 puede llegar a cumplir con las funciones de biocontrol en la rizósfera en presencia de GI006, teniendo en cuenta que las concentraciones de compuestos antimicrobianos de *T. virens* o *Trichoderma* spp. de acuerdo con la dosis aplicada en suelo (0,25%) es mucho más baja que las empleadas.

El éxito de los bioplaguicidas a base de microorganismos depende en gran parte de la habilidad que estos tienen para colonizar activamente el sitio de aplicación (Polyanskaya et al. 2004). Dentro de las variables críticas en el proceso de colonización y sobrevivencia de un hongo en la rizósfera que favorecen su habilidad competitiva se encuentra la germinación (Mitchell y Dix 1975; Harman, 2000). En este trabajo encontramos que la exposición de conidios de *T. virens* GI006 a *B. velezensis* Bs006 no afectó su germinación, por lo que esta interacción directa no afectaría su establecimiento en el suelo.

Santos et al. (2018) encontraron que extractos etanólicos de *Trichoderma asperelloides* en concentraciones de $2.3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ presentaron un efecto en la formación de biopelículas sobre *Staphylococcus aureus* y su crecimiento afectando la pared celular y la membrana, lo que podría sugerir que los compuestos sintetizados por *T. virens* también podrían tener un efecto sobre *Bacillus* spp. Sin embargo, en los pocos estudios de compatibilidad entre *Trichoderma* spp. y *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*, no se ha descrito su compatibilidad en la rizósfera en estos términos, en el presente estudio se requirió de altas concentraciones de sobrenadante de *T. virens* para afectar a *B. velezensis*.

Si los compuestos producidos por *T. virens* afectan la formación de biopelículas de *B. velezensis* es importante tener en cuenta la incorporación como tratamientos de biocontrol evitando el contacto directo entre sobrenadantes y células en estas concentraciones, ya que se conoce que la formación de biopelículas por PGPR y específicamente por *B. velezensis*, está asociada con la colonización las raíces de la planta. Las bacterias asociadas a promoción de crecimiento o a biocontrol en los sitios en los que hay una alta concentración de exudados radicales forman microcolonias o biopelículas que permiten la

comunicación entre las células bacterianas para actuar de manera coordinada. Así mismo esto se ha visto relacionada con la inducción de resistencia (Choudhary y Johri 2009).

La formación de biopelículas por especies del complejo *B. subtilis/amyloliquefaciens* sobre las raíces está estrechamente relacionada con la biosíntesis de surfactinas (Bais et al., 2004) y ciertos polisacáridos (Beauregard., 2013). Se ha demostrado que la formación de biopelículas por *B. subtilis* durante el proceso de colonización de las raíces de *Arabidopsis thaliana* depende de los mismos genes requeridos para formarlas *in vitro* (Beauregard et al., 2013) por lo que estos resultados de la evaluación de biopelículas *in vitro* estarían estrechamente relacionados con la colonización de la raíz de la planta.

Teniendo en cuenta la proporción de la mezcla de *T. virens* (1×10^6 conidios.mL⁻¹) con *B. velezensis* Bs006, a partir de suspensiones del hongo que alcanzaron concentraciones de hasta 4×10^8 conidios.mL⁻¹, la proporción de *T. virens* sería aproximadamente del 0,25%. En este contexto, este trabajo mostró que el sobrenadante de GI006 en concentración de 1% no afectó la capacidad de Bs006 para formar biopelículas, concentraciones mayores presentaron un efecto negativo.

Triveni, Prasanna y Saxena (2012) comprobaron que el micelio de *T. viride* se puede comportar como una matriz que utilizan las bacterias *P. fluorescens*, *Azotobacter chroococcum* y *B. subtilis*, para que estas se adhieran y formen biopelículas, reportando que un proceso de adherencia a partir de los siete días y la separación de las células se registró desde los 16 días. Las observaciones al microscopio realizadas en el presente trabajo evidenciaron este mismo fenómeno, en el que las esporas de *B. velezensis* Bs006 se adhirieron a los conidios de *T. virens* GI006 después de tres días de contacto (Figura 1-16).

En algunos trabajos se ha descrito cómo los hongos pueden contribuir a la migración de bacterias como ayudantes, estimulando su adherencia y movimiento en el suelo, como el caso de *Burkholderia terrae* formando biopelículas sobre las hifas de *Lyophyllum* sp. (Warmink et al., 2011). Esta relación resulta benéfica para las bacterias, teniendo en cuenta que el movimiento de las bacterias en el suelo puede ser restringido debido a la presencia de aire entre las partículas de suelo y con esto pueden alcanzar nuevos microhábitats (Warmink y Van Elsas 2009; Warmink et al., 2011).

Se ha encontrado que en este proceso de formación de biopelículas de las bacterias sobre los hongos, las bacterias pueden adherirse con el fin de obtener nutrientes de los hongos a partir de exudados secretados o de inducción de lisis para liberar su contenido y consumirlo o bien los dos microorganismos podrían tener una acción sinérgica en la que los dos necesitan romper los sustratos complejos del suelo (Triveni, Prasanna y Saxena., 2012). De acuerdo con esto, las bacterias y los hongos podrían formar estas interacciones de adherencia en la que el hongo puede verse afectado o no. En este estudio encontramos que la interacción entre GI006 con Bs006 no fue negativa para el hongo, teniendo en cuenta que la adherencia de la bacteria no afectó su germinación, ni su crecimiento y tampoco se observaron daños sus estructuras.

En cuanto a la interacción bajo condiciones de invernadero, de forma individual se encontró que los sobrenadantes de *B. velezensis* Bs006 en mezcla con las células de la bacteria presentan un efecto negativo en el control de Foph, este fenómeno también fue descrito por Moreno (2017), quien encontró que una dosis alta de la bacteria que contenga elevada concentración de sobrenadante puede ser contraproducente para el control de la enfermedad. También se ha descrito que el grado de biocontrol de una enfermedad y la relación dosis respuesta es dependiente de la densidad del agente biocontrolador y de la densidad del patógeno (Jhonson, 1994), fenómeno que también fue descrito por Moreno (2017) en el sistema *B. velezensis* Bs006 – *F. oxysporum* f. fp. *physali* - uchuva.

En este trabajo la adición del caldo de fermentación de Bs006 tuvo una baja eficacia sobre el control de la enfermedad y tuvo un efecto negativo cuando se adicionó el caldo junto con las células de la bacteria, lo que podría traducirse en una interacción antagónica entre el caldo de Bs006 y sus células sobre el control del marchitamiento vascular. Incluso se observó que el efecto negativo de su propio caldo sobre las células fue mayor que el ocasionado por el caldo de GI006 ya que tuvo valores de eficacia sobre incidencia y severidad mayores que al estar presente en su propio caldo de fermentación.

En este trabajo se observó que las células libres de sobrenadante de Bs006 presentan una eficacia de 44% sobre la severidad del marchitamiento vascular en concentraciones de 1×10^8 células.mL⁻¹. Las células libres de sobrenadante no fueron evaluadas en una concentración más baja en el presente trabajo, por lo que sería conveniente evaluar sus células en la concentración de 1×10^7 células.mL⁻¹ e incluso en concentraciones más bajas.

Sin embargo, Moreno et al. (2017) observaron que ante una baja presión de inóculo patogénico (10^2 y 10^3 ufc.mL⁻¹), la dilución del caldo fermentado de Bs006 ajustado a una concentración de 1×10^7 ufc.mL⁻¹ redujo significativamente el marchitamiento vascular de la uchuva.

Raaijmakers et al. (1995) encontraron que una población de *Pseudomonas* spp. en concentración de 10^5 ufc.g⁻¹ de suelo es requerida para lograr un control significativo del marchitamiento vascular del rábano. Bashan y Levanony (1985) encontraron que al aplicar 30 mL en 1×10^7 células.mL⁻¹ de *Azospirillum brasilense* libre de caldo de fermentación en plantas de trigo, logró colonizar eficientemente la planta. Berger et al. (2015) encontraron que al aplicar una suspensión de la bacteria promotora de crecimiento *Kosakonia radicincitans* en una concentración de 1×10^7 ufc.mL⁻¹ sobre semillas de rábano fue más efectiva promoviendo el crecimiento que en concentraciones de 1×10^8 ufc.mL⁻¹ en planta. Estos hallazgos sugieren que las aplicaciones de altas concentraciones de agentes biológicos no siempre resultan en altas eficacias de biocontrol. Sin embargo, los factores responsables de estos efectos al interior de las poblaciones de rizobacterias no están claros todavía.

La sinergia en la eficacia del consorcio entre *T. virens* GI006 y *B. velezensis* Bs006 se podría atribuir a la acción directa de los metabolitos contenidos en el caldo de fermentación de Bs006 sobre el patógeno, que podrían actuar como un mecanismo complementario a la actividad de GI006 dando lugar a una interacción sinérgica con los conidios de *T. virens*. En el experimento de interacción entre caldos y células se observó que al eliminar las células de Bs006 del consorcio, es decir, combinando el sobrenadante de Bs006 con conidios de GI006 se obtuvo una alta eficacia de control de la severidad de la enfermedad (72%). Moreno (2017) encontró que el sobrenadante de la fermentación de Bs006 en caldo LB durante 48 horas, contenía compuestos homólogos de los lipopéptidos cíclicos fengycinas, iturinas y surfactinas, mientras que Guleria et al. (2016) también detectaron producción de enzimas como proteasas alcalinas por la cepa SP1 de *B. amyloliquefaciens*.

Particularmente, para Bs006 recientemente se ha reportado una alta producción de proteasas en caldo LB, Izquierdo et al. (sin publicar). Sin embargo, estos compuestos presentes en el caldo no son suficientes para controlar eficientemente Foph-Map5 teniendo

en cuenta que la adición de solo caldo redujo la incidencia en 34% y la severidad en 2% sobre severidad.

Los conidios de *T. virens* redujeron la incidencia en 60% y la severidad en 55%, actividad que podría estar asociada principalmente a la competencia con el patógeno por nutrientes y espacio, además de la acción directa de enzimas degradadoras de la pared celular. Por su parte, las células de Bs006 presentaron 55% de eficacia sobre la incidencia y 44% sobre la severidad, lo que permitió ver que, las células de GI006 y de Bs006 presentaron altos valores de eficacia de forma individual y en mezcla (66% sobre incidencia y 62% sobre severidad) pero el efecto sinérgico en el control de la enfermedad no se atribuyó a la presencia de las células de Bs006 en el consorcio.

Los resultados encontrados sugieren que la interacción de células-células y sobrenadantes-sobrenadantes de los dos microorganismos son compatibles pero que su actividad sinérgica en el control de la enfermedad solo pudo ser atribuido a la interacción directa del caldo de fermentación de Bs006 con los conidios de GI006, posiblemente debido a mecanismos de acción directos complementarios sobre el patógeno.

El éxito de un consorcio microbiano depende de la capacidad individual de los microorganismos y de su interacción mutua (Bhatia et al. 2018). Sin embargo, se ha encontrado que el efecto de biocontrol en un consorcio puede darse por un microorganismo predominante en la mezcla (Denoth, Frid y Myers, 2002). En este estudio, se encontró que ninguno de los dos microorganismos afectó al otro negativamente en condiciones de disponibilidad de nutrientes cercanas a la rizósfera evaluadas en exudados artificiales (Figura 1-12).

La actividad biocontroladora del consorcio fue más alta que la eficacia de GI006 y Bs006 aplicados individualmente en la mayoría de los experimentos, pero la eficacia de GI006 fue cercana, lo que sugiere que en este consorcio GI006 es el microorganismo predominante en la mezcla, lo cual a su vez podría estar fuertemente relacionado con la facilidad para estar activo bajo las condiciones nutricionales que ofrece la rizósfera de uchuva. Aunque ya se ha demostrado que Bs006 tiene la habilidad para colonizar la superficie de la raíz de uchuva y desde allí inhibir el crecimiento de Foph-Map5 en un modelo gnotobiótico (Moreno, 2017), probablemente la complejidad de la rizósfera presente limitaciones para

el exitoso desenvolvimiento de los rasgos biocontroladores de Bs006, si se tiene en cuenta que los efectos de sus rasgos promotores del crecimiento vegetal son fácilmente visibles en las mismas condiciones (Moreno, 2018).

Se determinaron ciertas condiciones en las que los dos microorganismos no podrían coexistir, como lo es en presencia de altas concentraciones de sus metabolitos, condiciones que afectaron principalmente a *B. velezensis* Bs006 en condiciones *in vitro*. Sin embargo, estas condiciones no se presentarían en un ambiente natural como la rizósfera, pero es importante ponerlas en consideración si se requiere de su presencia en conjunto o de sus derivados como principio activo en un bioproducto.

T. virens GI006 y *B. velezensis* Bs006 son dos microorganismos nativos habitantes naturales del suelo y la rizósfera y su compatibilidad como consorcio ha sido demostrada en este estudio, en donde es importante mantener las concentraciones tanto de células y/o sobrenadantes que favorecen esta compatibilidad. Se requiere realizar estudios adicionales para conocer cómo interactúan a nivel molecular y microscópico estos dos microorganismos en la rizósfera y cómo esta interacción puede favorecer su relación con la planta en la lucha contra fitopatógenos del suelo.

1.5. Conclusiones

- La adherencia de esporas de *B. velezensis* a los conidios de *T. virens* sin causar daños sobre el hongo sugiere una interacción compatible entre los dos agentes de biocontrol.
- Los sobrenadantes del caldo de cultivo de *B. velezensis* estimularon la actividad biocontroladora de *T. virens*, mientras que el sobrenadante de *T. virens* redujo el crecimiento de *B. velezensis*. Sin embargo, teniendo en cuenta que las concentraciones de los metabolitos sintetizados por los microorganismos en la rizósfera suelen ser inferiores, los resultados sugieren que metabolitos producidos por GI006 y Bs006 no afectan su desempeño de biocontrol.
- Los agentes de biocontrol *T. virens* GI006 y *B. velezensis* Bs006 crecieron de forma compatible sobre exudados artificiales, sobre exudados naturales de uchuva y en la superficie de las semillas y de la raíz de uchuva, sugiriendo que pueden utilizarse en consorcio, como tratamiento de biocontrol en las plantas de uchuva.

2. Modos de acción de *Trichoderma virens* GI006 y *Bacillus velezensis* Bs006: descifrando el arsenal del consorcio microbiano

L.F. Izquierdo-García^{a*}, A. González-Almario^b, C.A. Moreno-Velandia^a

^a Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA, Km 14
vía Bogotá – Mosquera, Colombia;

^b Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá,
Colombia.

Resumen

Entre las estrategias de control biológico está el uso de consorcios microbianos, los cuales podrían mejorar la consistencia del biocontrol del marchitamiento vascular de la uchuva. Es así como el consorcio de *Trichoderma virens* GI006 y *Bacillus velezensis* Bs006 fue seleccionado por presentar un efecto sinérgico en el control de esta enfermedad. Sin embargo, no se conocen los modos de acción implicados en la actividad biocontroladora del consorcio. El objetivo de este estudio fue caracterizar los modos de acción de GI006 y Bs006 individualmente y en consorcio. Se evaluaron modos de acción directos como la producción de enzimas degradadoras de la pared celular (EDPC) en co-cultivo, en varios medios de cultivo, caldo papa dextrosa (PDB) y Luria Bertani (LB), medio mínimo basal suplementado con micelio inerte de Foph-Map5, medio suelo exudados artificiales (SEA) en co-cultivo con Foph-Map5, medio solución de suelo-exudados radicales de uchuva (SEU) y en el suelo en presencia de la planta (SP) en condiciones de invernadero. Adicionalmente, se evaluó la sobrevivencia de GI006, Bs006 y Foph-Map5 en el suelo y la colonización del tejido vegetal en tallo y raíz como endófitos. Se observó que Bs006

presentó principalmente actividad proteasa, β -1,3-glucanasa y quitobiosidasa, mientras que GI006 y el consorcio presentaron β -N-acetilglucosaminidasa, quitobiosidasa, quitinasa total, β -1,3 glucanasa y proteasa. La producción de las diferentes enzimas varió de acuerdo con el medio de cultivo evaluado. La población de Foph-Map5 se redujo principalmente en los tratamientos que produjeron el total de enzimas evaluadas. En el medio SEA se observó una producción más prologada de las enzimas, lo que se relacionó con la disminución de la población de Foph. En el medio SEU y las muestras SP se observó un efecto fungistático sobre la población de Foph relacionado con la menor producción de EDPC en el último muestreo. En las muestras de suelo-planta (SP) el consorcio GI006-Bs006 redujo en 63% la población de Foph de forma sinérgica, mientras que GI006 redujo en 28%. Bs006 ingresó como endófito desde el día siete de evaluación cuando se aplicó de forma individual y en consorcio. Las poblaciones de GI006 y Bs006 en suelo no fueron afectadas negativamente en consorcio y este impidió el ingreso de Foph a la planta hasta el día 21. La aplicación de células de GI006, Bs006 de forma individual y en consorcio redujeron el número de plantas enfermas, que se atribuyó a la inducción de resistencia sistémica. Los resultados encontrados sugieren que el consorcio presenta modos de acción directos a través de EDPC e indirectos mediante inducción de resistencia.

Palabras clave: Modos de acción, actividad enzimática, inducción de resistencia, consorcios, co-cultivos

2.1. Introducción

El uso de agentes de control biológico (ACB) se ha generado como una alternativa sostenible para el control de fitopatógenos del suelo, debido a su mínimo impacto sobre el medio ambiente (Brimner y Boland, 2003) y actualmente representa la mejor opción con efectos duraderos y ha sido aceptada masivamente por la sociedad para el control fitosanitario (Cotes, 2018). El control biológico involucra el uso de organismos benéficos, así como sus metabolitos o productos celulares que afectan directamente a los fitopatógenos o reducen los efectos negativos de estos en las plantas a través de la inducción de respuestas de defensa (Vinale et al., 2008). El éxito de un agente de control biológico depende en gran medida de su habilidad para establecerse en el sitio de

aplicación y la capacidad de expresar diferentes modos de acción (Saravanakumar et al., 2016).

Algunos compuestos producidos por los agentes de control biológico pueden actuar directamente sobre los fitopatógenos, ejerciendo efectos de antibiosis y de parasitismo mediante la producción de metabolitos (Fesel y Zuccaro, 2016). La actividad parasítica del agente de control biológico contra hongos fitopatógenos implica un proceso complejo, el cual incluye el crecimiento del agente de control biológico en dirección del microorganismo blanco, su adherencia a la hifa del patógeno y finalmente el ataque y disolución de la pared celular de este mediado por enzimas, tales como quitinasas y glucanasas, las cuales pueden estar asociadas a la penetración de la pared celular (Harman, 2000; Bailey et al., 2008; Vinale et al., 2008) estas enzimas rompen enlaces específicos de la pared celular del patógeno degradando su contenido (Fesel y Zuccaro, 2016).

Compuestos como xilanasas (Cálderon et al., 1993) y otros inductores de resistencia (Djonovic et al., 2007) producidos por *Trichoderma* spp. estimulan respuestas de defensa en la planta. La inducción de resistencia junto con la competencia por nutrientes o espacio confieren protección a largo plazo, este último ha sido un mecanismo clásico asociado principalmente a *Trichoderma* (Harman, 2000), la competencia por espacio al colonizar la raíz impide la entrada del patógeno y la inducción de respuestas de defensa de la planta (Daguerre et al., 2014).

La pared celular de los hongos está compuesta por glucanos, quitina y glicoproteínas (Pontón, 2008), las manoproteínas constituyen más del 80% de la pared celular y se ubican en la superficie externa, debajo se ubica el β -glucano compuesto por enlaces frecuentes β -1,3 glucano (65% y 90%) y enlaces adicionales β -1,6-glucano (3 -10%) el cual crea una matriz de soporte para las manoproteínas y provee rigidez estructural a la pared celular, la quitina se ubica inter-espaciada con el β -glucano y representa del 10 al 20% del peso seco de la pared celular de los hongos filamentosos (Fesel y Zuccaro, 2016).

Se ha encontrado que la pared celular de *F. oxysporum* es más resistente a enzimas degradadoras de la pared celular que la de otros patógenos del suelo como *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*, esto podría estar relacionado con la especificidad que pueden presentar los ACB contra diferentes patógenos. Además, *F. oxysporum* presenta una alta relación de quitina-laminarina y mayor contenido de laminarina comparado con *S. rolfsii*

(Sivan y Chet, 1989), Schoffemeer et al. (1999) encontraron que las glicoproteínas conforman cerca del 50-60% de la masa de *F. oxysporum*, por lo que su alto contenido de proteína y quitina debe ser tomado en consideración cuando se realiza la selección de antagonistas contra este patógeno (Sivan y Chet, 1989).

Uno de los géneros de microorganismos antagonistas de fitopatógenos más estudiado es *Trichoderma* spp., el cual ha mostrado efecto en la reducción de enfermedades causadas por patógenos del suelo como *F. oxysporum* y *R. solani* (Kipngeno et al., 2015). Entre los mecanismos de acción caracterizados para varias cepas de *Trichoderma* spp. se encuentran la antibiosis, a través de la producción de compuestos antimicrobiales como alquilpironas, isonitrilos, policétidos, peptaiboles, diquetopiperazinas, sesquiterpenos y esteroides (Mukherjee et al., 2011; Degenkolb et al., 2012).

Particularmente para *T. virens* se ha reportado la producción de gliotoxina (Di Pietro et al., 1993; Scharf et al., 2016) y gliovirina (Zeilinger et al., 2016), el micoparasitismo, la producción de enzimas degradadoras de pared celular (EDPC) como quitinasas (Di Pietro et al., 1993; Lu et al., 2004) y β -1,3-glucanasa (Ait-Lahsen et al., 2001; Mukherjee et al., 2013).

Las quitinasas pueden ser tipo endoquitinasas, las cuales clivan la quitina al azar y sus productos finales son solubles y de bajo peso molecular como quitotetraosa, quitotriosa y di-acetilquitobiosa, o pueden ser de tipo exoquitinasas que actúan en el extremo de la microfibrilla de quitina conocidas como quitobiosidasa y β -1,4 N-acetilglucosaminidasa (Sahai y Manocha, 1993), las quitobiosidasas catalizan la reacción de diacetilquitobiosa empezando por los extremos no reducidos de las microfibrillas de quitina, mientras que las β -1,4 N-acetilglucosaminidasas, clivan los productos oligoméricos de endoquitinasas y quitobiosidasas generando monómeros de N-acetilglucosamina, la unidad monomérica de la quitina (Dahiya et al., 2006) y la inducción de respuestas de defensa en el hospedero (Harman, 2000).

Para el caso de bacterias, dentro de los modos de acción más importantes se ha reportado la antibiosis, la cual se manifiesta una vez la rizobacteria coloniza el sistema radical, liberando moléculas antibióticas cerca de ella (Choudhary y Johri 2009). A su vez, durante el proceso de colonización las rizobacterias biocontroladoras inducen respuestas sistémicas en el hospedero mediante sus productos bacterianos brindando protección en

toda la planta (Ongena y Jacques, 2008). La competencia por nichos o nutrientes ocurre mediante movimientos quimiotácticos para cazar de forma eficiente los componentes de los exudados radicales (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

Los patógenos son percibidos por dos sistemas de reconocimiento que inician la inmunidad asociada a patrones (PTI) asociada a patógenos (PAMPS) o microorganismos (MAMPS) y la inmunidad asociada a efectores (ETI), una vez la planta ha percibido el patógeno induce diferentes mecanismos de defensa (Bigeard et al., 2015). La inducción de resistencia sistémica es una resistencia de amplio espectro en plantas contra varios tipos de patógenos inducida por microorganismos o por estrés abiótico, es una respuesta promovida por un estímulo.

Para bacterias se han reportado como elicitores de resistencia compuestos volátiles como 2,3 butanodiol y acetoina que activan la vía dependiente de etileno (Kloepper, et al., 2004), además de sideróforos y lipopéptidos cíclicos como surfactina específicamente para la especie *B. velezensis* (Cawoy et al., 2014; O'Brien, 2017). En *Trichoderma* spp. se han descrito proteínas con actividad enzimática como xilanasas y celulasas que actúan como elicitores de respuesta hipersensible, inducen la expresión de proteínas relacionadas con patogénesis (PR) y de fitoalexinas (Cálderon et al., 1993). Para el caso de *T. virens* se ha reportado la proteína Sm1 que induce la formación de especies reactivas de oxígeno en plantas de arroz y algodón contra el patógeno foliar *Colletotrichum* sp. (Djonovi et al., 2006).

En la caracterización de modos de acción de consorcios microbianos para el control de fitopatógenos, solo unas pocas especies con limitado modo de acción han sido exploradas y solo en los últimos años se han centrado principalmente en identificar y utilizar esos microorganismos en consorcios que puedan mediar la inducción de resistencia sistémica (Sarma et al., 2015). La eficacia del uso combinado de ACB depende en particular de los modos de acción involucrados. Por lo tanto, para evaluar el desempeño de la combinación de ACB es vital conocer el modo de acción predominante de cada uno de los componentes (Xu et al., 2011).

El consorcio conformado por *Trichoderma virens* GI006 y *Bacillus velezensis* Bs006 fue seleccionado por presentar sinergia y disminuir la variabilidad del control del marchitamiento vascular de la uchuva bajo condiciones de invernadero (Izquierdo et al., en

elaboración). Sin embargo, se desconocen sus modos de acción empleados en el control de la enfermedad. Los objetivos de este trabajo fueron determinar los modos de acción de los agentes de control biológico *T. virens* GI006 y *B. velezensis* Bs006 individualmente y en consorcio. Para lograr esto se evaluaron los modos de acción directos mediante la capacidad de producción de EDPC e indirectos mediante la inducción de resistencia, así mismo se evaluó la persistencia en la rizósfera y colonización del tejido vegetal de estos como endófitos.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Microorganismos y condiciones de cultivo

Se utilizó la cepa Map5 del fitopatógeno *F. oxysporum* (Foph-Map5) aislada de plantas de uchuva con síntomas característicos de la enfermedad y es conocida por su alta virulencia sobre este hospedero (Rodríguez, 2010). Los agentes de control biológico (ACB) evaluados fueron las cepas de *Trichoderma virens* (GI006) y *Bacillus velezensis* (Bs006) y el patógeno Foph-Map5, los cuales fueron proveídos por el Banco de Germoplasma de AGROSAVIA, los cuales se encuentran conservados a -80 °C en solución de glicerol (30%) y peptona (0,1%). Foph-Map5 fue reactivado en agar-papa-dextrosa (PDA, Oxoid®) y se usó el segundo pase para la producción del pre-inóculo en caldo papa-dextrosa (PDB, Difco®).

La producción del inóculo patogénico para los experimentos se hizo en 300 mL de PDB, en Erlenmeyer de 1000 mL de capacidad, con una concentración inicial de 1×10^6 microconidios.mL⁻¹. Se incubó durante 7 días con agitación continua en Shaker a 125 rpm y 25 °C. El caldo fermentado se filtró con muselina estéril (poro de 0,5 mm) y la concentración se ajustó mediante conteo en cámara de Neubauer en 1×10^6 microconidios.mL⁻¹ con agua destilada estéril (ADE) para los ensayos *in vitro* y con agua de grifo para los ensayos en invernadero.

La cepa de *T. virens* se reactivó en PDA y se tomó el segundo pase de siete días de crecimiento para la obtención del inóculo mediante raspado y suspensión de conidios en ADE. *B. velezensis* (Bs006) se reactivó en medio de cultivo Agar Luria Bertani (LBA:

Triptona 10 g, NaCl 10 g, extracto de levadura 5 g y agar 18 g /L). Con el segundo pase en LBA de 24 h de edad, se preparó una suspensión como pre-inóculo para iniciar la fermentación en caldo LB con una concentración inicial de 5×10^6 ufc.mL⁻¹. El cultivo de Bs006 se mantuvo en agitación continua en Shaker a 125 rpm y 25°C durante 48 horas.

2.2.2. Material vegetal

Se empleó semilla comercial de uchuva de la casa comercial Semicol®. Para los ensayos bajo invernadero se emplearon plántulas de 60 días de edad, crecidas sobre turba estéril, en bandejas de germinación de 72 alvéolos. Antes de la siembra, las semillas se lavaron con agua de grifo para eliminar el fungicida, se desinfectaron con solución NaOCl (3%) durante 20 minutos y posteriormente se hicieron tres lavados consecutivos con agua destilada estéril (ADE). El trasplante se hizo sobre sustrato suelo:cascarilla de arroz (3:1, v/v) en bolsas de polipropileno color negro con 600 g de sustrato.

2.2.3. Caracterización de la actividad enzimática de GI006 y Bs006

▪ Actividad enzimática semicuantitativa en medio sólido

Se evaluó de forma semicuantitativa la actividad quitinasa, proteasa y celulasa de los agentes de control biológico *T. virens* GI006 y *B. velezensis* Bs006 en medio sólido. Para la producción de inóculos, los dos agentes de biocontrol se cultivaron en medio sólido LBA para *B. velezensis* y PDA para *T. virens*. Se preparó una suspensión de células y de conidios respectivamente en ADE, mediante raspado de la colonia con ayuda de un asa bacteriológica estéril, las suspensiones fueron ajustadas a cada una de las concentraciones evaluadas.

Actividad quitinasa

Para evaluar la biosíntesis de quitinasa por los agentes de control biológico se siguió el protocolo descrito por Agrawal y Kotasthane (2012). Inicialmente se preparó quitina coloidal a partir de quitina comercial grado reactivo (Sigma®). La hidrólisis de quitina se realizó adicionando gradualmente 30 g de quitina en 200 mL de HCl al 36% a 4 °C, manteniendo esta mezcla en agitación continua (125 rpm) durante la noche. Posteriormente se realizó la extracción de quitina coloidal (neutralización de etanol)

añadiendo 1800 mL de etanol (95%) frío (4°C) y se mantuvo a 26°C durante la noche. Esta mezcla fue centrifugada a 3000 rpm por 20 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el sedimento obtenido se resuspendió en agua destilada estéril, se centrifugó nuevamente a 3000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se realizaron estos lavados del pellet hasta eliminar el olor del etanol y el sedimento final obtenido se almacenó a 4°C hasta su uso.

Para la preparación del medio de detección de quitinasa se preparó el medio mínimo basal (4.5 g/L quitina coloidal, 0.3 g/L MgSO₄·7H₂O, 3 g/L (NH₄)SO₄, 2 g/L KH₂PO₄, 1 g/L ácido cítrico monohidratado, 18 g/L Agar, 0,15 g/L púrpura de bromocresol, 200 µL/L Tween 80) ajustado a pH 5.3 y esterilizado en autoclave. El medio se sirvió en cajas de Petri (90 mm) y se almacenó a 4°C hasta su uso. Cada suspensión de los tratamientos evaluados se inoculó en el centro de la caja de Petri (10 µL) y se llevó a incubación a 28°C. La biosíntesis de quitinasa por los agentes de control biológico inoculados, está indicada por la presencia de un halo de color púrpura en el área de crecimiento de la colonia del microorganismo. Se registró el diámetro del halo diariamente durante cuatro días con un pie de rey (Fisher®).

Actividad celulasa

Utilizando el modelo descrito antes, se evaluó la actividad celulasa de los agentes de control biológico sobre el medio estéril carboximetilcelulosa (agar-CMC) (1.0 g/L KH₂PO₄, 0.5 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.5 g/L NaCl, 0.01 g/L FeSO₄·7H₂O, 0.01 g/L MnSO₄·H₂O, 0.3 g/L NH₄NO₃, 10 g/L carboximetilcelulosa, 18 g/L agar) (Teather y Wood, 1982). El medio estéril se sirvió en microplacas de seis pozos (Falcon®) adicionando 3 mL por pozo. El medio de cultivo se almacenó a 4°C hasta su uso. Inmediatamente antes de la inoculación de los tratamientos se utilizó un sacabocados de 5 mm de diámetro para abrir un pozo en el centro de cada medio gelificado. Luego, se dispusieron 50 µL de inóculo de cada tratamiento y se llevó a incubación a 25°C durante tres días. Después de este tiempo se adicionó 2 mL de solución de rojo Congo (0.5%) durante 20 min y luego se adicionó 2 mL de NaCl 1M incubando por 20 min. La formación de un halo amarillo alrededor de la colonia fue indicador de la reacción positiva de la enzima celulasa sobre el sustrato, el diámetro de este halo fue medido de igual manera que en el medio quitinasa.

Actividad proteasa

La actividad proteasa se evaluó en medio mínimo basal estéril (0,7 g/L K_2HPO_4 , 0,3 g/L KH_2PO_4 , 0,5 g/L $MgSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,01 g/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,001 g/L $ZnSO_4$, 0,001 g/L $MnCl_2$, 18 g/L agar bacteriológico), suplementado con leche descremada al 3% (Sokol et al., 1979), este medio se sirvió en microplacas de seis pozos (Falcon®), se inoculó de igual manera que en el medio CMC y se llevó a incubación durante 24 h. Después de este periodo de incubación se midió el diámetro del halo de hidrólisis (halo transparente) formado alrededor de la colonia de cada microorganismo.

▪ **Actividad enzimática cuantitativa en co-cultivos en medio líquido y suelo**

Obtención de co-cultivos

Se midió el efecto del co-cultivo de los agentes de control biológico GI006 y Bs006 sobre la biosíntesis de enzimas degradadoras de la pared celular: quitinasa, proteasa y β -1,3-glucanasa. La respuesta de estos tratamientos se comparó con la producción del cultivo individual de los agentes de biocontrol. La actividad enzimática fue cuantificada en los siguientes medios de crecimiento: medio sintético (MS) PDB y LB, medio solución de suelo suplementado con exudados radicales artificiales (SEA) (Nihorimbere et al., 2012), medio solución de suelo suplementado con exudados radicales de uchuva (SEU) (Moreno, 2017) y medio mínimo basal (MMB) suplementado con micelio inerte (autoclavado y liofilizado) de Foph-Map5 (M-Foph).

Para la evaluación en medio MS se empleó PDB para *Trichoderma* sp. y caldo LB para *B. velezensis* y para el co-cultivo de los dos agentes de control biológico se empleó una mezcla al 50% de PDB y 50% de LB, respectivamente. La solución de suelo empleada en los medios SEA y SEU fue obtenida mezclando 500 g de suelo:cascarilla con 1000 mL de agua de grifo. Se llevó a agitación rotatoria a 125 rpm durante una hora a temperatura ambiente (18°C). Posteriormente se filtró con tela muselina con tamaño de poro de 0.5 mm, luego se pasó por filtros de 0.8 μ m y 0.22 μ m. El medio SEA fue preparado de acuerdo con lo descrito por Nihorimbere et al. (2012). Sin embargo, en este caso se empleó solución de suelo como el solvente de los reactivos.

Para el medio SEU, se utilizaron exudados radicales de plantas de uchuva de 30 días de edad, crecidas en bandejas de enraizamiento, sobre sustrato turba. Al cabo de 30 días después de la siembra, las plantas se desarraigaron del sustrato y se lavaron con agua de

grifo y jabón líquido suave. Posteriormente la parte aérea de la planta (tallo y hojas) fue sumergida durante dos segundos en solución NaOCl (2%) mientras que las raíces se sumergieron durante cinco minutos. Después de esto se realizaron cuatro lavados consecutivos con ADE para eliminar los residuos de hipoclorito de sodio. Las plantas obtenidas se dispusieron en tubos Falcon (Falcon®) estériles de 50 mL de capacidad con las raíces sumergidas en 40 mL de solución de suelo. Las plantas se mantuvieron a 15 °C durante cinco días (12 horas luz artificial – 12 horas oscuridad).

El medio mínimo basal mencionado, corresponde al mismo MMB descrito previamente, suplementado con biomasa de M-Foph en concentración de 1.2 % (p/v) la cual fue obtenida a partir de una fermentación líquida de Foph-Map5 en PDB durante siete días a 125 rpm y 28 °C. Posteriormente se filtró con tela muselina estéril y se liofilizó durante 48 horas en un liofilizador (Thermo Scientific®).

La producción de inóculos para la cuantificación de actividad enzimática se realizó en fermentación líquida en Erlenmeyer de 125 mL con 25 mL de los medios de cultivo mencionados, estos fueron inoculados con cada microorganismo en una concentración inicial de 5×10^4 conidios.mL⁻¹ para *T. virens* GI006, 5×10^6 células.mL⁻¹ para *B. velezensis* y 1.1×10^5 microconidios.mL⁻¹ para Foph-Map5 (manteniendo la proporción de las concentraciones de los microorganismos empleada en los bioensayos bajo invernadero). Los medios líquidos inoculados se incubaron durante cinco días a 125 rpm y 28°C. Al cabo de dos y cinco días de fermentación, se tomaron muestras del sobrenadante libre de biomasa mediante centrifugación a 15000 rpm durante 15 minutos y filtrado por membranas de 0,20 µm (Sartorius®), esta muestra constituyó el extracto enzimático.

La viabilidad de los tres microorganismos en los co-cultivos después del tiempo de incubación, se midió mediante siembra de diluciones seriadas en cajas de Petri por triplicado y conteo de colonias en medio sólido PDA suplementado con solución Tritón X-100 (0.1%) y Cloranfenicol para Foph-Map5 y GI006 y en medio LBA para Bs006. Para las muestras de Bs006 se realizó un choque térmico a 90°C durante 15 minutos previo a la realización de las diluciones. Los hongos fueron incubados por cinco días a 28°C y las bacterias por 24 horas a 30°C. El experimento se montó dos veces en el tiempo y la unidad experimental fue un Erlenmeyer de 125 mL y se contó con tres repeticiones.

Obtención de muestras de suelo

Se tomaron muestras de la rizósfera de plantas de uchuva crecidas de 60 días de edad las cuales estaban en turba canadiense en bandejas de semillero de 72 alvéolos bajo invernadero. Posteriormente se eliminó cuidadosamente el cepellón y se trasplantaron en sustrato no estéril (suelo:cascarilla de arroz 3:1) y fueron tratadas inmediatamente con los biocontroladores *T. virens* (1×10^6 conidios.mL⁻¹) y *B. velezensis* (1×10^8 ufc.mL⁻¹) de forma individual y en consorcio, los tres tratamientos se inocularon en presencia de Foph-Map5 (2.22×10^6 microconidios.mL⁻¹) el cual fue aplicado simultáneamente. Se aplicaron 30 mL de suspensión de cada tratamiento.

Las muestras de rizósfera se tomaron en los días uno, dos y siete después de la inoculación. Se contó con un testigo patógeno (plantas inoculadas solamente con Foph-Map5) y un testigo absoluto (plantas no inoculadas). Las muestras fueron conservadas a -20°C hasta su procesamiento, para la obtención del extracto enzimático se siguió la metodología descrita por Jackson et al. (2013) disponiendo 6 g de suelo en 6 mL de buffer acetato de sodio pH 5.1 (proporción 1:1 v/v) el líquido viscoso obtenido fue el extracto enzimático que se empleó para las pruebas de actividad enzimática (conservando los gránulos de suelo dentro de cada reacción), este fue agitado vigorosamente en vórtex a máxima velocidad durante 30 segundos una vez se iba a procesar cada muestra. Cada tratamiento contó con tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas para la evaluación de actividad enzimática quitinasa, proteasa y β -1,3-glucanasa. El experimento se realizó dos veces en el tiempo.

Actividad quitinasa total

Para cuantificar la actividad quitinasa se utilizó quitina coloidal como sustrato y N – Acetil-D-Glucosamina como estándar. La curva de calibración se realizó a partir de una concentración de 0.05 mg/mL a 0.2 mg/mL de N – Acetil-D-Glucosamina como estándar para calcular la concentración de azúcares reductores. Para determinar la actividad quitinasa se mezcló 1 mL de sobrenadante (extracto enzimático) con 0.3 mL de buffer acetato de Sodio 1M (pH 4.6) y 0.2 mL de quitina coloidal. Esta mezcla se incubó a 40 °C por 20 horas Agrawal y Kotasthane (2012) y luego se centrifugó a 13000 rpm durante cinco minutos a 6°C.

Posteriormente se tomaron 0.25 mL de sobrenadante, se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se adicionaron 0.25 mL de solución de ácido dinitrosalicílico (DNS) al 1% y fueron incubadas en baño de María a 100 °C durante cinco minutos deteniendo la reacción incubándola en hielo. Las muestras se sirvieron en microplacas de 96 pozos (Greiner®) y posteriormente se leyó la absorbancia en un lector de microplacas (Biotek® - Software Gen5) a una longitud de onda de 540 nm. Para determinar la concentración de azúcares simples liberados, se usó la ecuación de la curva de calibración con N-acetil-D-glucosamina (NAG). Una unidad de actividad quitinasa (U) se definió como la cantidad de enzima que produjo 1 μ mol de N-acetil-D-glucosamina equivalente a partir de quitina coloidal por minuto bajo las condiciones de la prueba.

Actividad exoquitinasa

Se evaluó la actividad exoquitinasa usando como sustrato nitrofenil N, N-diacetil β -D-quitobiosa para la detección de actividad quitobiosidasa y 4-Nitrofenil N-acetil- β -D-glucosamina para la cuantificación de actividad β -N-acetilglucosaminidasa. Para esto se empleó el kit quitinasa ref: CS0980 (Sigma-Aldrich®).

Actividad proteasa

Para cuantificar la actividad proteasa se utilizó caseína como sustrato y tirosina como estándar empleando el protocolo descrito por Cupp-enyard (2008). La curva de calibración de L-tirosina se realizó preparando una solución de L-tirosina en concentración de 1.1 mM en agua ultrapura, a partir de la cual se realizaron cinco puntos a diferentes concentraciones. Se adicionó cada estándar de tirosina seguido de 625 μ L de carbonato de sodio y 125 μ L del reactivo F-C. La mezcla se agitó y se incubó durante 30 minutos. Posteriormente, se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 660 nm.

Para determinar la actividad proteasa, se mezclaron 25 μ l de extracto filtrado por 0,22 μ m con 130 μ L de solución de caseína al 0.65% en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Para el blanco se adicionaron 25 μ L del diluyente. Posteriormente se mezcló e incubó a 37°C por 10 minutos. Para detener la reacción se adicionaron 130 μ L de solución de ácido tricloroacético (110 mM), se homogeneizó y se incubó a 37°C por 20 minutos. Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm. Se tomaron 250 μ LI del sobrenadante y se adicionaron 625 μ L de solución carbonato de sodio (500 mM) y 125 μ L del reactivo F-C

(0,5 M). Se agitó e incubó a 37°C por 30 minutos. Se sirvieron 200 μ L en microplacas de 96 pozos y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 660 nm.

Actividad β -1,3-glucanasa

Se empleó la metodología descrita por (Ramada et al., 2010), para ello se tomaron 10 μ L de extracto enzimático, se adicionaron 20 μ L de laminarina (Sigma®) al 0.75% (p/v) diluida en buffer acetato de sodio 50 mM. Se llevó a 45°C durante 15 minutos en baño termostático y se adicionaron 100 μ L de DNS como se describió anteriormente. También se cuantificaron los azúcares reductores, sin adición de laminarina al extracto enzimático, para obtener la diferencia de los azúcares reductores obtenidos a partir de la reacción enzimática. Una unidad (U) de actividad β -1,3-glucanasa se definió como la cantidad de enzima que produce 1 μ mol de azúcares reductores por minuto bajo las condiciones descritas.

Para la evaluación de la actividad enzimática de todos los co-cultivos se contó con tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas; los experimentos fueron realizados dos veces en el tiempo.

2.2.4. Inducción de resistencia

Para determinar la capacidad de inducción de resistencia de los agentes GI006, Bs006 y del consorcio contra el marchitamiento vascular de la uchuva, se realizó un bioensayo de acuerdo con Moreno et al. (2009) empleando el modelo de raíces divididas. Para ello se inoculó cuidadosamente una porción de la raíz de la planta con los ACB en consorcio aplicando 30 mL de cada inóculo, GI006 se inoculó en una concentración de 1×10^6 conidios.mL⁻¹, Bs006 en 1×10^8 ufc.mL⁻¹ y en la otra porción de raíz se inoculó el patógeno Foph-Map5 (30 mL a una concentración de 2.22 microconidios.mL⁻¹) después de tres días de la inoculación de los ACB.

Se contó con testigos de los microorganismos aplicados en forma individual, un testigo patógeno y un testigo absoluto. Las variables medidas fueron incidencia, expresada como el porcentaje de plantas enfermas del total de plantas en la unidad experimental y severidad de la enfermedad de acuerdo con la escala descrita por Moreno et al. (2017) y se presentó como el índice de intensidad de la enfermedad, calculado con la ecuación

$IIE = (\sum Si * Ni) \div (5 * N)$, donde Si es el nivel de severidad de los síntomas, Ni es el número de plantas en cada nivel de severidad Si , y N es el número total de plantas de la unidad experimental (Hervás et al., 1998).

El registro de las variables de enfermedad se realizó cada cuatro días a partir de la expresión de los primeros síntomas y con estos datos se calculó el área bajo la curva de progreso de la incidencia y del índice de intensidad de la enfermedad. El porcentaje de eficacia de los tratamientos para reducir la enfermedad se determinó con base en los valores de área bajo la curva de progreso de la enfermedad mediante la ecuación $E = ((a - b) \div a) \times 100$, donde a representa el valor de la enfermedad en el control negativo y b representa la enfermedad en un tratamiento dado (Abbott, 1925).

2.2.5. Colonización y sobrevivencia

- Seguimiento a la población de los agentes de control biológico en la rizósfera, el suelo y en el tejido vegetal de plantas crecidas en sustrato estéril

Para evaluar la colonización y sobrevivencia de los ACB en semillero y trasplante se realizaron dos experimentos independientes, aplicando 5 mL en semillero y 30 mL en trasplante de suspensiones en las concentraciones de 1×10^6 conidios.mL⁻¹ para *T. virens* GI006 y 1×10^8 ufc.mL⁻¹ para *B. velezensis* Bs006. Se tomaron muestras del sustrato turba (semillero) y suelo (trasplante) en tiempo cero (T0) y de sustrato y tejido a los 15 días (en semillero) y a los 7 y 21 días (en trasplante). Cada vez que se tomaba la muestra se garantizó que el suelo tuviera la misma humedad que en T0, aplicando el volumen de agua igual al aplicado en el inóculo (5 mL/planta en semillero y 30 mL/planta en trasplante).

Para la desinfección de las muestras de tejido vegetal se siguió el protocolo descrito por Li et al. (2012) para aislamiento de microorganismos endófitos (lavado con detergente y desinfección con hipoclorito de sodio al 3% durante 10 minutos, seguido de cuatro lavados consecutivos con ADE). Luego se tomó 7 cm de tallo o raíz y fueron pesados en balanza analítica previo a su incorporación en la solución.

Las muestras de peso conocido fueron procesadas de acuerdo a la metodología de Garrido-Jurado et al. (2011) con modificaciones, estas fueron maceradas en 7 mL de

solución Tween 80 (0.1%) estéril, el líquido obtenido fue empleado para la siembra en los medios de cultivo medio PDA+ suplementado con Tritón X-100 y Cloranfenicol para el conteo de colonias de Foph-Map5 y GI006 y el medio LBA para el conteo de colonias de Bs006 con previo choque térmico (95°C durante 15 minutos). Para las muestras de suelo o turba se tomó 1 g de muestra en 9 mL de solución Tween 80 (0.1%) estéril, se realizaron diluciones seriadas de las muestras y se sembraron en cajas de Petri con los medios de cultivo descritos anteriormente.

2.2.6. Análisis estadístico

Los datos se sometieron a pruebas de normalidad de acuerdo con la prueba de Shapiro Wilk ($P > 0.05$) y homogeneidad de varianzas con la prueba de Levene. La significancia se determinó por el análisis (ANOVA) usando un modelo lineal generalizado GLM. Se emplearon las pruebas de rango múltiple de Duncan, de diferencia mínima significativa de Fisher (LSD) y de Tukey ($P=0.05$) para realizar la comparación de medias entre tratamientos. El análisis se realizó empleando el programa estadístico S.A.S (versión 9.4: SAS Institute, Cary, NC)

2.3. Resultados

2.3.1. Actividad enzimática semicuantitativa

La evaluación en medio sólido mostró que *T. virens* GI006 sintetizó quitinasa (Figura 2-1), mientras que *B. velezensis* Bs006 proteasa (Figura 2-2) y celulasa (Figura 2-3). La intensidad del halo indicador de la actividad enzimática de cada microorganismo presentó una relación directa con la concentración de la suspensión inoculada en el medio de cultivo, en la cual, una mayor concentración de los microorganismos generó un halo de mayor diámetro.

Cuando se inocularon los dos microorganismos en consorcio sobre la superficie de los medios de cultivo, se observó que la actividad celulasa de Bs006 fue inhibida; la actividad quitinasa de GI006 disminuyó significativamente cuando Bs006 fue inoculada en altas concentraciones (10^7 y 10^8 ufc.mL⁻¹) y GI006 fue inoculado en la concentración más baja (10^5 conidios.mL⁻¹). La actividad proteasa de Bs006 fue reducida por la presencia de GI006

en todas las concentraciones probadas, pero este efecto fue más marcado en la concentración más alta de GI006 (10^7 conidios.mL⁻¹) (Figura 2-2 y Tabla 2-1).

2.1.1. Actividad enzimática cuantitativa

Actividad enzimática en co-cultivo

Al evaluar la producción de enzimas degradadoras de la pared celular (EDPC), en los caldos de cultivo de uso regular para el crecimiento de microorganismos en laboratorio, se detectó actividad β -1,3-glucanasa en PDB en el cual creció *T. virens* GI006. Sin embargo, esta actividad glucanasa no fue detectada en el co-cultivo de GI006 con *B. velezensis* Bs006, indicando un efecto inhibitorio en su producción por GI006 debido a la presencia de la bacteria en el mismo medio.

La actividad quitinasa total fue detectada tanto en el caldo de crecimiento de GI006 solo como en el co-cultivo con la bacteria. No obstante, en el caldo LB fermentado por Bs006 no se encontró actividad quitinasa, sugiriendo que la enzima detectada en el co-cultivo fue producida por GI006. Finalmente, la actividad proteasa fue detectada solamente en el caldo fermentado por Bs006, pero no en de GI006, mientras que la actividad celulasa se presentó en Bs006 y se redujo significativamente en consorcio (Tabla 2-2).

Tabla 2-1. Efecto del co-cultivo de GI006 y Bs006 en medio sólido sobre su perfil enzimático⁵

Tratamiento	Halo de diámetro de hidrólisis (mm)		
	Celulasa	Quitinasa	Proteasa
GI006 1x10 ⁵	-	78,57±0,76 ab	-
GI006 1x10 ⁶	-	84,43 ± 0 a	-
GI006 1x10 ⁷	-	84,43 ± 0 a	-
Bs006 1x10 ⁶	6,05 ± 0,49 c	-	4,35± 0,61 e
Bs006 1x10 ⁷	8,93± 0,05 b	-	8,02 ± 0,58 bc
Bs006 1x10 ⁸	11,3 ± 0,23 a	-	10,3 ± 0 a
GI006 1x10 ⁵ - Bs006 1x10 ⁶	-	84,43 ± 0 a	5,26 ± 0,42 e
GI006 1x10 ⁵ - Bs006 1x10 ⁷	-	70,01± 4,7 b	6,69 ± 0,44 d
GI006 1x10 ⁵ - Bs006 1x10 ⁸	-	71,13± 7,16 b	8,59 ± 0,06 b
GI006 1x10 ⁶ - Bs006 1x10 ⁶	-	84,43 ± 0 a	5,00± 0,78 e
GI006 1x10 ⁶ - Bs006 1x10 ⁷	-	84,43 ± 0 a	7,32 ± 0,21 cd
GI006 1x10 ⁶ - Bs006 1x10 ⁸	-	84,43 ± 0 a	8,57 ± 0,07 b
GI006 1x10 ⁷ - Bs006 1x10 ⁶	-	84,43 ± 0 a	2,58 ± 0,08 f
GI006 1x10 ⁷ - Bs006 1x10 ⁷	-	84,43 ± 0 a	4,63 ± 0,14 e
GI006 1x10 ⁷ - Bs006 1x10 ⁸	-	84,43 ± 0 a	6,75 ± 0,12 d

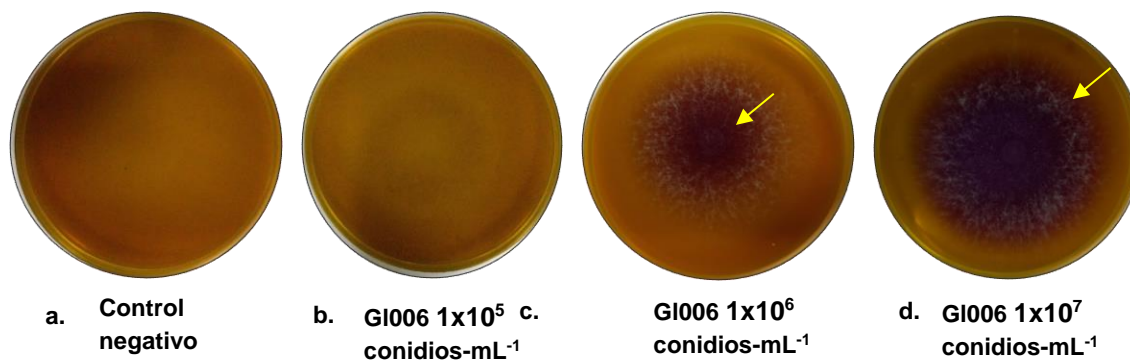


Figura 2-1. Halos de hidrólisis de quitina en medio sólido para evaluación de quitinasa producidos por *T. virens* GI006 (10 µL). a. Control negativo (ADE), b. GI006 de 1 x 10⁵ concentración de conidios.mL⁻¹, c. 1x10⁶ conidios.mL⁻¹ y d. 1x10⁷ conidios.mL⁻¹ cuatro días después de inoculación. Las flechas amarillas indican la formación del halo púrpura y la formación de micelio sobre el medio

⁵ Los tratamientos corresponden a las diferentes concentraciones empleadas de células de *B. velezensis* Bs006 o conidios de *T. virens* GI006, inoculados en medio celulasa (CMC), proteasa o quitinasa. ± desviación estándar entre 4 repeticiones. Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

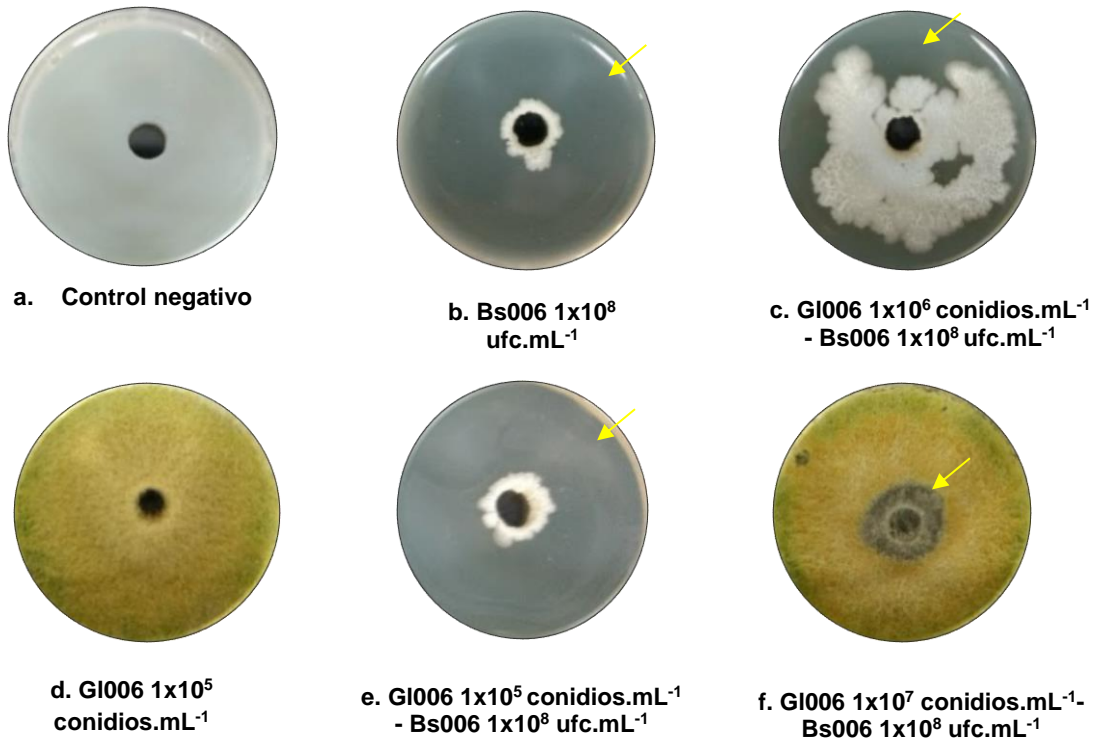


Figura 2-2. Halos de hidrólisis de proteína en medio sólido para evaluación de proteasa inoculado con *B. velezensis* Bs006 y/o *T. virens* GI006 cuatro días después de inoculación. a. Control negativo (ADE), b. Bs006 en concentración de 1×10^8 ufc.mL⁻¹, c. GI006 en concentración de 1×10^6 conidios.mL⁻¹ y Bs006 en 1×10^8 ufc.mL⁻¹, d. GI006 en concentración de 1×10^5 conidios.mL⁻¹, e. GI006 en 1×10^5 conidios.mL⁻¹ y Bs006 en 1×10^8 ufc.mL⁻¹ y f. GI006 en 1×10^7 conidios.mL⁻¹ y Bs006 en 1×10^8 ufc.mL⁻¹. El indicador de actividad proteasa se nota por la claridad que toma el medio sólido.

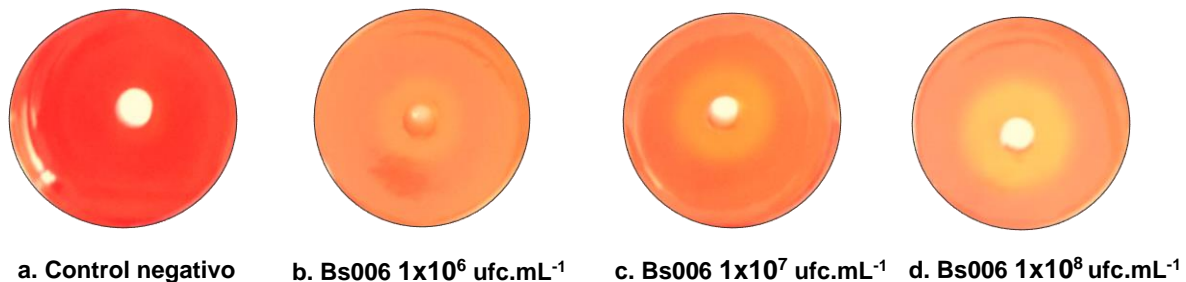


Figura 2-3. Halos de hidrólisis de carboximetilcelulosa en medio CMC producidos por *B. velezensis* Bs006 ($10 \mu\text{L}$ en 1×10^6 a 1×10^8 ufc.mL⁻¹) cinco días después de inoculación. a. control negativo, b. Bs006 en concentración 1×10^6 ufc.mL⁻¹, c. Bs006 en concentración 1×10^7 ufc.mL⁻¹, Bs006 en concentración 1×10^8 . Los halos de coloración amarilla en el medio sólido son indicadores de actividad celulosa.

Tabla 2-2. Perfil de EDPC producidas por GI006, Bs006 y su co-cultivo en medio LB-PDB⁶

Actividad	U.mL ⁻¹			
	β -1,3-glucanasa	Quitinasa	Proteasa	Celulasa
GI006	41.31±10.7	0,0014±0,001 a	-	-
Bs006	-	-	1,09± 0,05	4.07 ± 1.2 a
GI006+Bs006	-	0,0003 ±0,0009 ab	-	0.96 ± 0.60 b

Cuando se determinó la producción de EDPC por GI006 y Bs006 en medio mínimo basal suplementado con micelio inerte de *F. oxysporum* f. sp. *physali* cepa Map5 (M-Foph), se observó en general, una menor producción de glucanasa y quitinasa por GI006 creciendo sola y en co-cultivo con Bs006, en comparación con la producción encontrada en el medio PDB.

En el medio mínimo basal suplementado con M-Foph se detectó actividad β -1,3-glucanasa producida por GI006 creciendo sola, desde el segundo día de crecimiento, pero esta actividad no se detectó cuando GI006 creció en ausencia de M-Foph. Sin embargo, en el co-cultivo la actividad β -1,3-glucanasa fue detectada tardíamente, y disminuyó en comparación con lo observado en el cultivo individual de GI006 (Tabla 2-3). Resultados contrastantes fueron observados en la actividad quitinasa total la cual fue detectada tempranamente en el co-cultivo de GI006 con Bs006 y con valores más altos que los encontrados en el cultivo individual de GI006 (Tabla 2-3).

En el caso del cultivo de la bacteria Bs006 crecida en el medio mínimo sin suplemento y suplementado con M-Foph no presentó ni actividad glucanasa ni quitinasa (Tabla 2-3). Estos resultados sugirieron que las actividades β -1,3-glucanasa y quitinasa total fueron inducidas por el micelio de Foph-Map5. Las actividades exoquitinasa, quitobiosidasa y β -N-acetilglucosaminidasa se detectaron en algunos tratamientos en ausencia de micelio de Foph.

⁶ Perfil enzimático de co-cultivos de *T. virens* GI006, *B. velezensis* Bs006 y Foph-Map5 en medio líquido. GI006 fue inoculado en concentración de 5×10^4 conidios.mL⁻¹ y Bs006 en 5×10^6 ufc.mL⁻¹. Los datos corresponden al promedio de 4 repeticiones \pm la desviación estándar. U.mL⁻¹ = (μ mol de reacción x volumen de la prueba) / (volumen de la muestra x tiempo de reacción x volumen probado). Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

La actividad quitobiosidasa fue detectada en el día dos en todos los tratamientos, con excepción de Bs006 sin suplemento de M-Foph. En el día cinco se observó un comportamiento similar y adicionalmente en el tratamiento control M-Foph tampoco fue detectada actividad quitobiosidasa. La actividad β -N-acetilglucosaminidasa fue detectada en el cultivo de GI006 y en el co-cultivo con Bs006.

Al evaluar el co-cultivo de los tres microorganismos GI006, Bs006 y Foph-Map5 en medio SEA, (Tabla 2-4) no se detectó actividad quitinasa total, pero si se detectó actividad exoquitinasa (quitobiosidasa y β -N-acetilglucosaminidasa). La actividad quitobiosidasa fue observada al día dos en los cultivos de los ACB de forma individual y en el co-cultivo en ausencia de Foph. Mientras que en presencia de Foph solo el cultivo de Bs006 presentó actividad quitobiosidasa (Tabla 2-4). Cinco días después del crecimiento en medio líquido en el medio SEA se observó que el consorcio en ausencia de Foph no presentó actividad quitobiosidasa, Bs006 no presentó actividad β -N-acetilglucosaminidasa, mientras que en el tratamiento de GI006 en ausencia de Foph no se presentó actividad proteasa. El consorcio presentó todas las enzimas evaluadas a excepción de quitinasa total, que no se detectó en ningún tratamiento por el protocolo empleado.

Tabla 2-3. Perfil de EDPC en medio mínimo basal suplementado con micelio inerte de Foph-Map5⁷

Días después de inoculación	Tratamiento	U.mL ⁻¹				
		β 1,3 glucanasa	Quitinasa total	Quitobiosidasa	β-N-acetilglucosaminidasa	Proteasa
2	GI006	-	-	0.001108	0.000022	-
	Bs006	-	-	-	-	1.11 ± 0.251 c
	GI006+Bs006	-	-	0.017421	-	0.74 ± 0.481 c
	GI006+M-Foph	0.0489 ± 0.1335	0.0004 ± 0.0001 c	0.079432	0.002519	4.63 ± 1.180 a
	Bs006+M-Foph	-	-	0.000033	-	24.80 ± 3.395 a
	GI006+Bs006+M-Foph	-	0.0006 ± 0.0003 a	0.079434	0.002631	4.88 ± 1.531 b
	M-Foph	-	-	0.000022	-	-
	Control	-	-	-	-	-
5	GI006	-	-	0.005986	-	-
	Bs006	-	-	-	-	-
	GI006+Bs006	-	-	0.017461	-	-
	GI006+M-Foph	3.84 ± 1.603 a	-	0.080376	0.002519	2.82 ± 0.596 b
	Bs006+M-Foph	-	-	0.000055	-	4.77 ± 1.58 a
	GI006+Bs006+M-Foph	0.1182 ± 0.3546 b	0.0001 ± 0.00004	0.078603	0.002519	1.92 ± 0.657 b
	M-Foph	-	-	-	-	-
	Control	-	-	-	-	-

⁷ Perfil enzimático de co-cultivos de *T. virens* GI006 y *B. velezensis* Bs006 en medio mínimo suplementado con micelio inerte de Foph-Map5 (M-Foph). GI006 fue inoculado en 5×10^4 conidios.mL⁻¹ y Bs006 en 5×10^6 ufc.mL⁻¹. U.mL⁻¹ = (μmol de reacción x volumen de la prueba) / (volumen de la muestra x tiempo de reacción x volumen probado). ± desviación estándar (n= 9). Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey (α =0.05)

Tabla 2-4. Perfil de EDPC en medio solución de suelo – exudados artificiales de raíz (SEA)⁸

Días después de inoculación	Tratamiento	U.mL ⁻¹				
		β 1,3 glucanasa	Quitinasa total	Quitobiosidasa	β -N-acetilglucosaminidasa	Proteasa
2	GI006	0.8370 \pm 1.8866 a	-	0.000299	0.001744	-
	Bs006	1.1849 \pm 1.8836 a	-	0.004373	-	16.71 \pm 1.606 a
	GI006+Bs006	0.0683 \pm 0.2048 a	-	0.000066	0.000168	13.4 \pm 2.725 bc
	GI006+Foph	1.0173 \pm 0.9023 a	-	-	0.002435	2.02 \pm 3.224 d
	Bs006+Foph	0.2976 \pm 0.4498 a	-	0.000199	-	12.83 \pm 0.715 c
	GI006+Bs006+Foph	0.2586 \pm 0.7758 a	-	-	0.001161	15.23 \pm 0.578 ab
	Foph	0.0267 \pm 0.0538 a	-	-	0.001924	-
	Control	-	-	-	-	1.16 \pm 0.271 d
5	GI006	0.1549 \pm 0.4647 c	-	0.004345	0.011790	0.29 \pm 0.708 b
	Bs006	-	-	0.009800	-	-
	GI006+Bs006	-	-	-	0.001644	12.21 \pm 2.005 a
	GI006+Foph	2.9987 \pm 1.957 a	-	0.080376	0.002789	0.96 \pm 0.830 b
	Bs006+Foph	1.9730 \pm 1.6589 ab	-	0.000055	-	0.97 \pm 1.474 b
	GI006+Bs006+Foph	0.2867 \pm 0.6006 c	-	0.078603	0.001908	0.97 \pm 1.921 b
	Foph	0.9199 \pm 0.0538 bc	-	0.000055	0.003849	1.91 \pm 1.601 b
	Control	-	-	-	-	-

⁸ Perfil enzimático de co-cultivos de *T. virens* GI006, *B. velezensis* Bs006 y Foph-Map5 en medio líquido. GI006 fue inoculado en 5×10^4 conidios.mL⁻¹, Bs006 en 5×10^6 ufc.mL⁻¹ y Foph-Map5 en 1.1×10^5 microconidios.mL⁻¹. U.mL⁻¹ = (μ mol de reacción x volumen de la prueba) / (volumen de la muestra x tiempo de reacción x volumen probado). \pm desviación estándar (n=9). Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

Tabla 2-5. Perfil de EDPC en medio solución de suelo y exudados de raíz de uchuva (SEU)⁹

Días después de inoculación	Tratamiento	U.mL ⁻¹				
		β 1,3 glucanasa	Quitinasa total	Quitobiosidasa	β-N-acetilglucosaminidasa	Proteasa
2	GI006	-	-	0.000005	0,000005	0.0229 ± 0.0687 b
	Bs006	-	-	-	-	0.0096 ± 0.0253 b
	GI006+Bs006	-	-	0.000011	0,000016	0.0557 ± 0.1106 b
	GI006+Foph	-	-	-	-	-
	Bs006+Foph	-	-	0.000011	-	0.0014 ± 0.0041 b
	GI006+Bs006+Foph	-	-	0.000066	-	0.4305 ± 0.9814 b
	Foph	-	-	-	-	-
	Control	-	-	-	-	29.2265 ± 4.520 a
5	GI006	-	-	0.000011	0,000005	0.2577 ± 0.4332 b
	Bs006	-	-	-	-	0.0285 ± 0.0657 b
	GI006+Bs006	-	-	-	0,000011	0.1083 ± 0.1881 b
	GI006+Foph	-	-	-	0,000067	0.0257 ± 0.0658 b
	Bs006+Foph	-	-	0.000011	-	0.0262 ± 0.0786 b
	GI006+Bs006+Foph	-	-	-	0,000005	0.0176 ± 0.0527 b
	Foph	-	-	-	0,000033	0.0550 ± 0.0776 b
	Control	-	-	-	-	1.0169 ± 1.0311 a

⁹ Perfil enzimático de co-cultivos de *T. virens* GI006, *B. velezensis* Bs006 y Foph-Map5 en medio líquido SEU. GI006 fue inoculado en 5x10⁴ conidios.mL⁻¹, Bs006 en 5x10⁶ ufc.mL⁻¹ y Foph-Map5 en 1.1x10⁵ microconidios.mL⁻¹. U.mL⁻¹= (μmol de reacción x volumen de la prueba) / (volumen de la muestra x tiempo de reacción x volumen probado). ± desviación estándar (n= 9). Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey (α =0.05)

En el medio SEU (Tabla 2-5) no se detectó actividad β -1,3-glucanasa ni quitinasa total. La actividad quitobiosidasa se detectó en el día dos después de crecimiento en el consorcio de GI006 y Bs006, con y sin Foph, también en Bs006+Foph y GI006 sin Foph (Tabla 2-5). En el día cinco después de incubación, la actividad quitobiosidasa se detectó solamente en GI006 y Bs006+Foph. La actividad β -N-acetilglucosaminidasa se detectó en el tratamiento GI006 y en el co-cultivo de los agentes de biocontrol en ausencia de Foph. Al día cinco se detectó en todos los tratamientos, menos en aquellos en los que se evaluó Bs006 de forma individual y en consorcio, indicando un efecto negativo de Bs006 sobre la producción de la enzima por GI006. La actividad proteasa se presentó desde el segundo día de evaluación. Sin embargo, no fue detectada en el tratamiento GI006+Foph ni en Foph y los mayores valores fueron presentados en el tratamiento control (Tabla 2-5).

Población de los microorganismos GI006, Bs006 y Foph-Map5 en co-cultivo

Cuando *T. virens* GI006 y *B. velezensis* Bs006 se inocularon en medio mínimo basal suplementado con micelio inerte de Foph-Map5, los dos agentes de control biológico presentaron una densidad de población similar entre el segundo y el quinto día después de incubación. En contraste, la población de Bs006 fue reducida en el co-cultivo con GI006 en el medio mínimo en ausencia del micelio inerte de Foph después de cinco días de incubación (Figura 2-4). En general, se observó que la bacteria presentó una densidad de población significativamente más baja durante el co-cultivo con GI006 en presencia del micelio inerte de Foph, comparado con su población cultivada de forma individual. Sin embargo, esto no se observó en el medio mínimo sin micelio de Foph. En contraste, GI006 presentó una densidad de población similar durante el co-cultivo y creciendo de forma individual en el medio suplementado con micelio de Foph y esta fue significativamente más alta que su densidad de población en el medio sin micelio de Foph (Figura 2-4).

En el medio SEU (Figura 2-5) Bs006 creció durante las primeras 48 h de incubación y mantuvo esta densidad de población hasta los cinco días de evaluación en todos los tratamientos, con excepción del co-cultivo con GI006 en ausencia de Foph-Map5, el cual presentó un descenso leve de la viabilidad de la población teniendo en cuenta que no se presentaron diferencias estadísticas significativas (Figura 2-5). En cuanto a la población de Foph-Map5, se observó que durante las primeras 48 horas de co-cultivo con cada agente de biocontrol (Bs006 y GI006), la población viable de Foph se redujo a menos de 10 ufc.mL⁻¹. Sin embargo, este efecto fue transitorio y en el día cinco Foph mantuvo su población en todos los co-cultivos (Figura 2-5).

En el medio SEA la población de la bacteria Bs006 a las 48 horas de incubación fue similar en co-cultivo con GI006 e incubada de forma individual, tanto en ausencia como en presencia de inóculo de *Fusarium* (Foph). Sin embargo, después de 5 días de incubación la población viable de Bs006 se redujo significativamente en co-cultivo con GI006 y con Foph (Figura 2-6). Por su parte, la viabilidad de los conidios de GI006 se vio afectada en este medio de cultivo durante las primeras 48 horas de incubación y se redujo significativamente cuando creció en co-cultivo con Bs006 y con Foph. Aunque, después de cinco días de incubación su viabilidad fue recuperada en los co-cultivos (Figura 2-6) indicando un posible efecto fungistático en este medio de cultivo. En contraste, la población de Foph disminuyó hasta 50 y menos de 10 ufc.mL⁻¹ cuando se inoculó junto con GI006 y Bs006 respectivamente. Por otra parte, la población de Foph-Map5 crecido solo, fue similar en los dos momentos de evaluación (48 horas y cinco días después de inoculación).

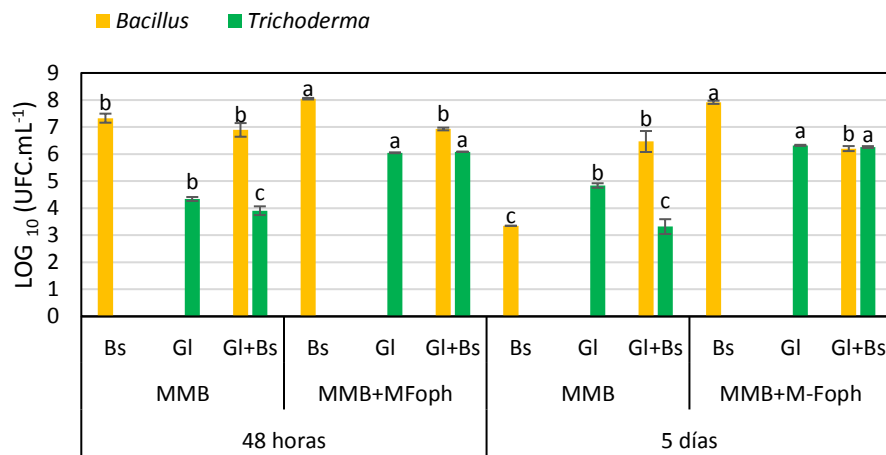


Figura 2-4. Poblaciones de *T. virens* (GI006) y *B. velezensis* (Bs006) en co-cultivo en medio mínimo basal líquido (MMB) suplementado con micelio inerte de *F. oxysporum* f. sp. *physali* cepa Map5 (M-Foph). GI006 fue inoculado en 5x10⁴ conidios.mL⁻¹, Bs006 en 5x10⁶ ufc.mL⁻¹. Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

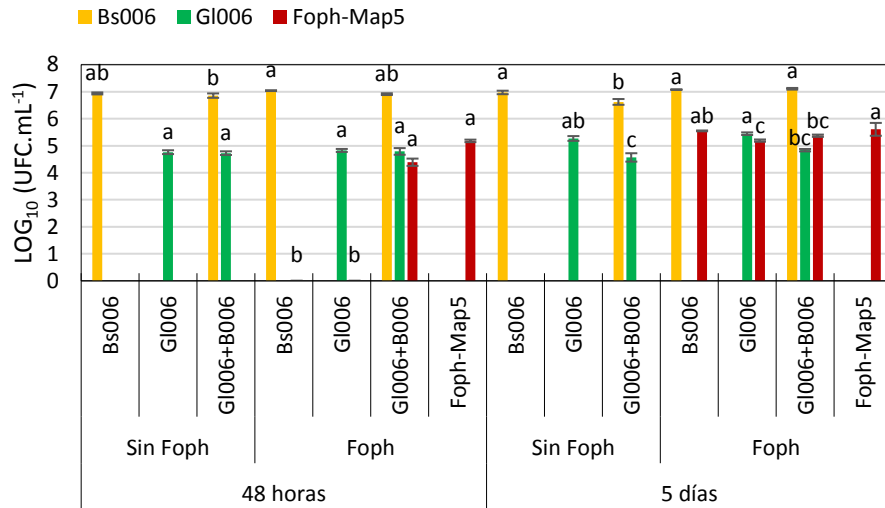


Figura 2-5. Poblaciones de *T. virens* (GI006), *B. velezensis* (Bs006) y *F. oxysporum* f. sp. *physali* cepa Map5 (Foph-Map5) en co-cultivo en medio líquido solución de suelo y exudados de raíz de uchuva (SEU). GI006 fue inoculado en 5×10^4 conidios.mL⁻¹, Bs006 en 5×10^6 ufc.mL⁻¹ y Foph-Map5 en 1.1×10^5 microconidios.mL⁻¹. Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

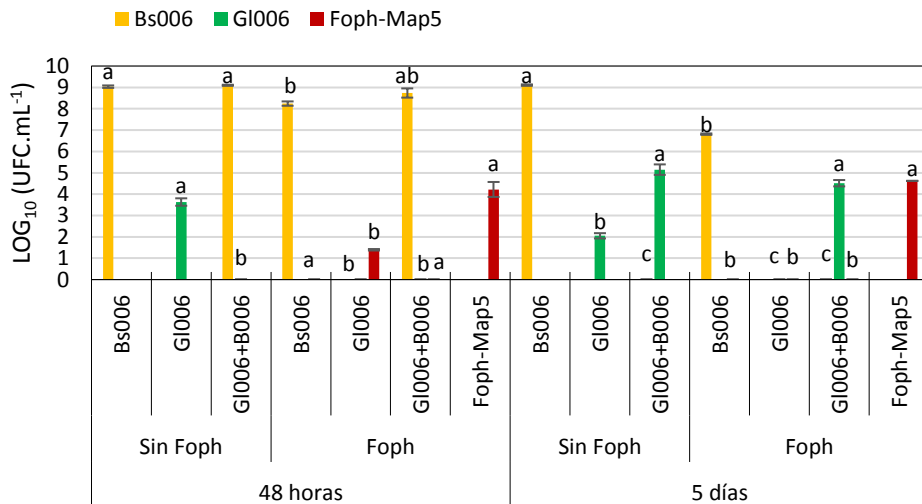


Figura 2-6. Poblaciones de *T. virens* (GI006), *B. velezensis* (Bs006) y *F. oxysporum* f. sp. *physali* cepa Map5 (Foph-Map5) en co-cultivo en caldo estéril solución de suelo y exudados artificiales de raíz (SEA). GI006 fue inoculado en 5×10^4 conidios.mL⁻¹, Bs006 en 5×10^6 ufc.mL⁻¹ y Foph-Map5 en 1.1×10^5 microconidios.mL⁻¹. Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

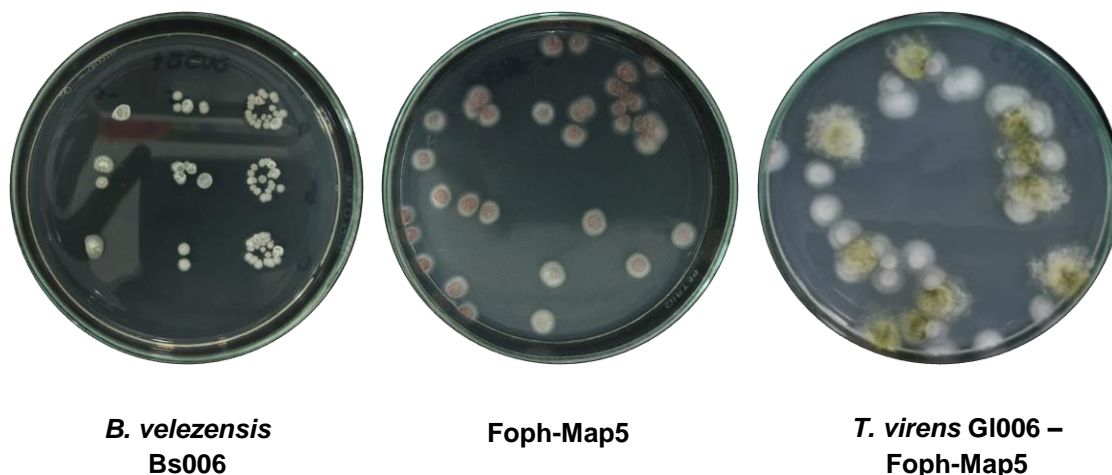


Figura 2-7. Colonias de *T. virens* GI006 y Foph-Map5 en PDA suplementado con Tritón y cloranfenicol y *B. velezensis* Bs006 sembrado en microgota (20 μ L) en medio LB (con choque térmico previo – 90°C durante 15 minutos) provenientes de muestras de co-cultivos en medio líquido a las 48 horas de fermentación.

Actividad enzimática en suelo

En las muestras de suelo se detectaron las cuatro actividades enzimáticas evaluadas (Tabla 2-6). La actividad β -1,3-glucanasa se detectó en los dos tiempos evaluados (día uno y dos después de inoculación), siendo más alta en el control y en las muestras de suelo inoculado con Bs006+Foph y GI006+Bs006+Foph. Mientras que las muestras de suelo tratadas con GI006 y Foph mostraron actividad β -1,3-glucanasa significativamente más bajas que el control.

Por otra parte, la actividad quitinasa total se detectó a partir del día uno en las muestras de suelo control y en aquellas que incluyeron inoculación con GI006 con valores similares, pero no en las muestras de suelo tratadas con Bs006 y con Foph. Sin embargo, dos días después de la inoculación se detectó la actividad quitinasa total en estos últimos tratamientos. En este tiempo se observó que las muestras de suelo tratadas con GI006 presentaron actividad quitinasa significativamente mayor en comparación con los demás tratamientos, seguido por el consorcio y el tratamiento de Foph, mientras que el control presentó los valores más bajos de actividad quitinasa total (Tabla 2-6).

Siete días después de la inoculación se observó que la actividad quitinasa disminuyó en la mayoría de los tratamientos excepto en el suelo inoculado con Bs006, en donde tendió a ser más alta. La actividad exoquitinasa-quitobiosidasa y β -N-acetilglucosaminidasa fue

presentada en todos los tratamientos (Tabla 2-6). La actividad proteasa en el día uno solo fue presentada en el tratamiento de Bs006. Sin embargo, en el día dos se detectó la actividad proteasa en los demás tratamientos, con excepción del suelo inoculado con los tres microorganismos. El suelo no tratado presentó la actividad proteasa más alta siete días después de la inoculación y mantuvo la tendencia a presentar la mayor actividad proteasa, en comparación con los demás tratamientos. En el consorcio en presencia de Foph solo se detectó actividad proteasa en el día siete (Tabla 2-6).

En las muestras de suelo empleadas para la cuantificación de actividad enzimática, se observó que al día siete después de inoculación, las poblaciones de Foph solo disminuyeron significativamente en el tratamiento correspondiente al consorcio de GI006 y Bs006 (Tabla 2-7) presentando un 63% de eficacia y un SF de 2.21 indicando una interacción sinérgica, a diferencia de GI006 que en forma individual redujo en 28.4% la población de Foph y Bs006 presentó una eficacia negativa, en este tiempo tres tratamientos biológicos presentaron valores similares de actividad quitinasa y proteasa. Las poblaciones de los dos agentes de control biológico se mantuvieron solos y aplicados en consorcio (Tabla 2-8).

Tabla 2-6. Perfil de EDPC detectadas en el suelo inoculado con agentes de control biológico y *F. oxysporum*¹⁰

Días después de inoculación	Tratamiento	U.g ⁻¹ de suelo seco				
		β 1,3 glucanasa	Quitinasa total	Quitobiosidasa	β-N-acetilglucosaminidasa	Proteasa
1	GI006+Foph	90.3 ± 66.4 b	0.0025 ± 0.0005 a	NE	NE	-
	Bs006+Foph	99.4 ± 90.1 ab	-	NE	NE	1.59 ± 1.046
	GI006+Bs006+Foph	165 ± 29.3 ab	0.0021 ± 0.0001 a	NE	NE	-
	Foph	67.9 ± 34.1 b	-	NE	NE	-
	Control	204.7 ± 64.4 a	0.0024 ± 0.0008 a	NE	NE	-
2	GI006+Foph	12.8 ± 6.9 b	0.0079 ± 0.0006 a	0,0066	0,0003	2.74 ± 0.386 b
	Bs006+Foph	39.3 ± 26.9 ab	0.0011 ± 0.0004 d	0,0090	0,0002	1.66 ± 0.65 c
	GI006+Bs006+Foph	35.2 ± 16.4 ab	0.0031 ± 0.0015 b	0,0028	0,0001	-
	Foph	56.7 ± 26.1 ab	0.0021 ± 0.0006 bc	0,0068	0,0001	1.07 ± 1.185 c
	Control	96.7 ± 68.3 a	0.0017 ± 0.0007cd	0,0161	0,0005	5.45 ± 1.265 a
7	GI006+Foph	NE	0.0012 ± 0.0004 bc	NE	NE	2.21 ± 0.770 b
	Bs006+Foph	NE	0.0020 ± 0.0013 a	NE	NE	2.66 ± 0.069 b
	GI006+Bs006+Foph	NE	0.0015 ± 0.0009 ab	NE	NE	1.73 ± 0.867 b
	Foph	NE	0.0008 ± 0.0002 c	NE	NE	-
	Control	NE	0.0015 ± 0.0005 ab	NE	NE	5.96 ± 2.43 a

¹⁰ Perfil enzimático en muestras de suelo inoculado con Foph-Map5 (30 mL en 2.2x10⁶ microconidios.mL⁻¹) y con aplicación de *T. virens* GI006 (30 mL en 1x10⁶ conidios.mL⁻¹) y *B. velezensis* Bs006 (30 mL en 1x10⁸ ufc.mL⁻¹). ± desviación estándar (n= 9). Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey (α= 0.05)

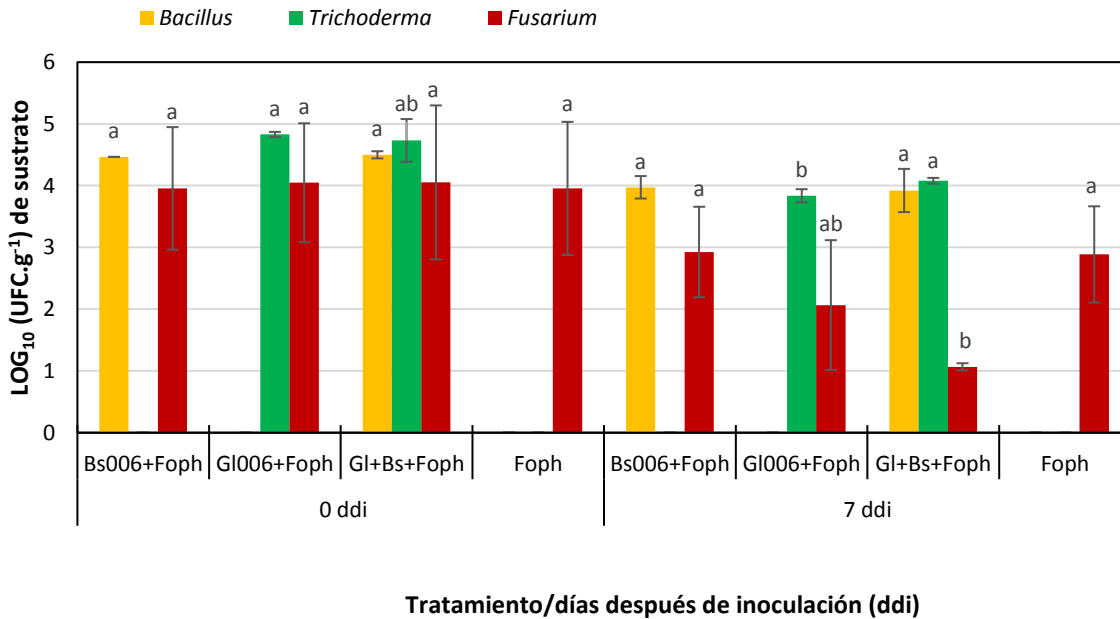


Figura 2-8. Poblaciones de *T. virens* (GI006), *B. velezensis* (Bs006) y *F. oxysporum* f. sp. *physali* cepa Map5 (Foph) en muestras de suelo inoculadas de forma individual y en consorcio. 0 ddi: tiempo inicial y 7 ddi: tiempo final de muestreo. Las muestras de suelo corresponden a las muestras empleadas para cuantificación de actividad enzimática. Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

Tabla 2-7. Factor de sinergia de eficacia del control de la población viable de Foph en suelo siete días después de inoculación¹¹

Tratamiento	Eficacia observada (%)	Eficacia esperada (%)	SF	Interacción
Bs006	0	-	-	-
GI006	28.4	-	-	-
GI006+Bs006	63.0	28.4	2,21	Sinérgica

¹¹ SF: factor de sinergia

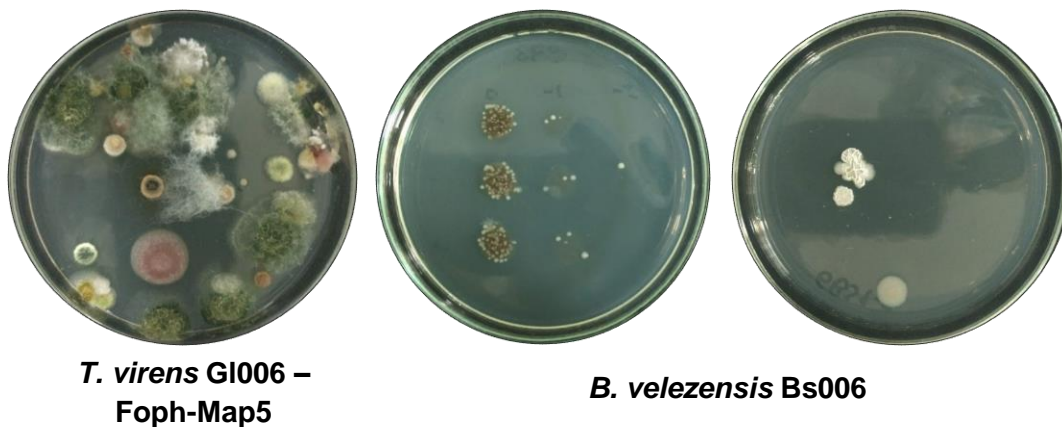


Figura 2-9. Colonias de *T. virens* GI006 y Foph-Map5 en PDA suplementado con Tritón y cloranfénicol y de *B. velezensis* Bs006 en medio LB (con choque térmico previo a 90°C durante 15 minutos) provenientes de muestras de suelo a los 21 ddi.

2.1.1. Inducción de resistencia

La aplicación de las células y los sobrenadantes de los cultivos de GI006 y Bs006 en medio líquido a una porción de la raíz de las plantas de uchuva, permitió observar efectos de reducción de la enfermedad atribuibles al fenómeno de inducción de resistencia. Los tratamientos de células tanto individuales como en consorcio disminuyeron significativamente el progreso de la incidencia del marchitamiento vascular de la uchuva comparado con el control negativo (Foph) (Anexo 7).

Por su parte, la aplicación del sobrenadante de GI006 redujo significativamente el progreso de la enfermedad, contrario al sobrenadante de Bs006 que no lo hizo (Figura 2-10) los valores del área bajo la curva del progreso de la incidencia del marchitamiento vascular fueron similares para los tres tratamientos de células, pero en el caso del área de la curva del progreso de la severidad el tratamiento de células de GI006 fue el único que disminuyó la severidad de la enfermedad (Figura 2-11). En este experimento, la aplicación de ambos agentes de control biológico no mostró un efecto sinérgico o aditivo en la eficacia de control de la enfermedad (Figura 2-8).

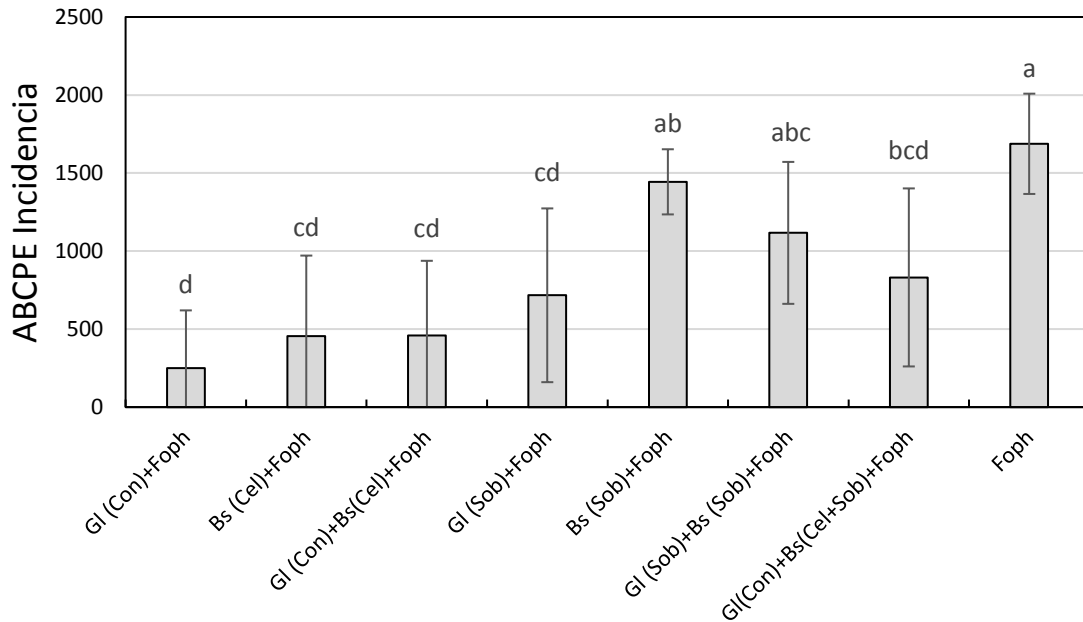


Figura 2-10. Efecto de la aplicación de *T. virens* GI006 (Gl) y *B. velezensis* Bs006 (Bs) solos y en consorcio, sobre el progreso de la incidencia del marchitamiento vascular de la uchuva causado por *F. oxysporum* f. sp. *physali* cepa Map5 (Foph) en el modelo de raíces divididas. El área bajo la curva del progreso de la incidencia (ABCPE-Incidencia) fue calculada con base en el registro de la incidencia durante 50 días después de la aplicación de los tratamientos. El suelo se inoculó con Foph en concentración de 1×10^4 ufc.g⁻¹ de suelo en una porción de la raíz dividida. Las barras sobre las columnas representan la desviación estándar de los datos (n= 4). Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan ($\alpha=0.05$). Con: Conidios, Cel: Células, Sob: Sobrenadante

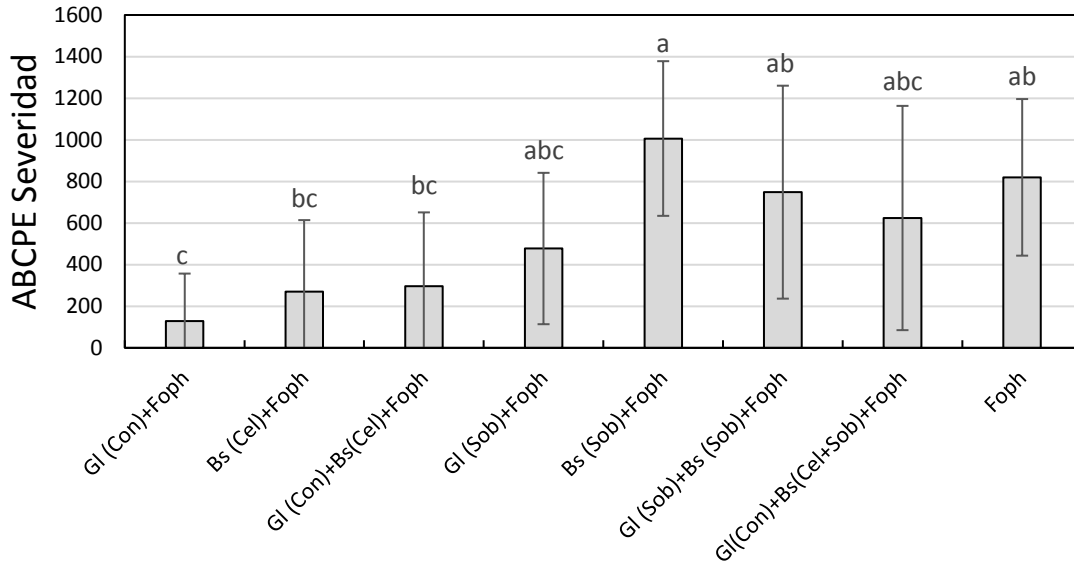


Figura 2-11. Efecto de la aplicación de *T. virens* GI006 (GI) y *B. velezensis* Bs006 (Bs) solos y en consorcio sobre el progreso de la severidad del marchitamiento vascular de la uchuva causado por *F. oxysporum* f. sp. *physali* cepa Map5 (Foph) en el modelo de raíces divididas. El valor del área bajo la curva del progreso de la severidad fue calculado con base en el registro de la severidad al cabo de 50 días después de la aplicación de los tratamientos. El suelo se inoculó con Foph en concentración de 1×10^4 ufc.g⁻¹ de suelo en una porción de la raíz dividida. Las barras sobre las columnas representan la desviación estándar de los datos (n= 4). Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan ($\alpha= 0.05$). Con: Conidios, Cel: Células, Sob: Sobrenadante.

Tabla 2-8. Factor de sinergia de eficacia del control de la incidencia y severidad del marchitamiento vascular en el modelo de raíces divididas¹²

Tratamiento	ABCPE 50 ddi							
	Eficacia INC (%)	Eficacia esperada	SF	Interacción	Eficacia SEV (%)	Eficacia esperada	SF	Interacción
GI (Con)+Foph	85.2	-	-	-	84.3	-	-	-
Bs (Cel)+Foph	73.1	-	-	-	67.1	-	-	-
GI (Con)+Bs(Cel)+Foph	72.8	96.0	0.76	Antagónica	63.9	94.8	0.67	Antagónica
GI (Sob)+Foph	57.5	-	-	-	41.7	-	-	-
Bs (Sob)+Foph	14.4	-	-	-	-22.8	-	-	-
GI (Sob)+Bs (Sob)+Foph	33.8	63.7	0.53	Antagónica	8.7	28.5	0.31	Antagónica
GI(Cel)+Bs(Cel+Sob)+Foph	50.7	-	-	-	23.8	-	-	-

¹² INC: Incidencia de la enfermedad. SEV: severidad de la enfermedad. SF=Factor de sinergia

2.1.2. Colonización y sobrevivencia

Población de microorganismos en semillero

Al aplicar los agentes de control biológico *B. velezensis* Bs006 y *T. virens* GI006 solos y en consorcio, a las plantas de uchuva en semillero y en fase de pos-trasplante, se observó que los dos microorganismos en mezcla mantuvieron la densidad de población similar a la inoculada al sustrato al comienzo del experimento (8×10^4 y 2×10^4 ufc.g⁻¹ de sustrato) durante el tiempo de evaluación (15 días después de inoculación). Se observó también que la presencia de uno no afectó la densidad de población del otro en el sustrato (Figura 2-12). Sin embargo, se evidenció que en el día 15 después de inoculación individual de Bs006, su población disminuyó con respecto al tiempo 0. Por otra parte, se identificó la presencia de Bs006 como endófito de tallo (Figura 2-13.) y raíz principal (Figura 2-14), pero esta población no se vio afectada significativamente por la aplicación de GI006.

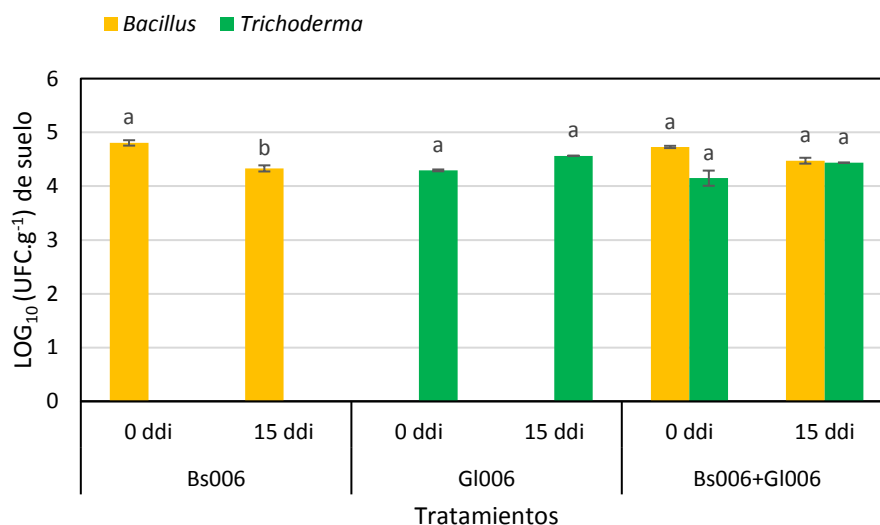


Figura 2-12. Población de microorganismos en sustrato aplicados solos y en consorcio en etapa de semillero (5 mL). GI006 fue aplicado en 1×10^6 conidios.mL⁻¹, Bs006 en 1×10^8 ufc.mL⁻¹. Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba LSD ($\alpha = 0.05$)

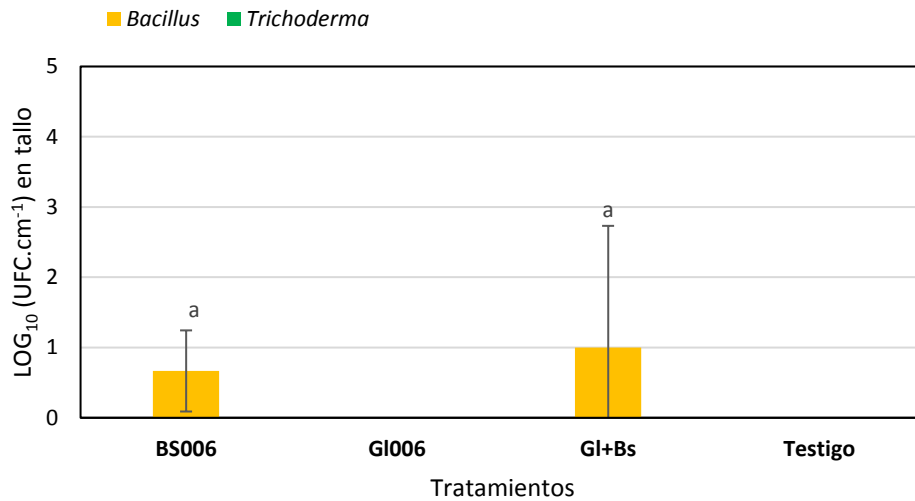


Figura 2-13. Población endófitas de *T. virens* (GI006) y *B. velezensis* (Bs006) en el tallo de plántulas de uchuva durante la etapa de semillero. GI006 fue aplicado en 1×10^6 conidios.mL⁻¹, Bs006 en 1×10^8 ufc.mL⁻¹. Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba LSD ($\alpha = 0.05$)

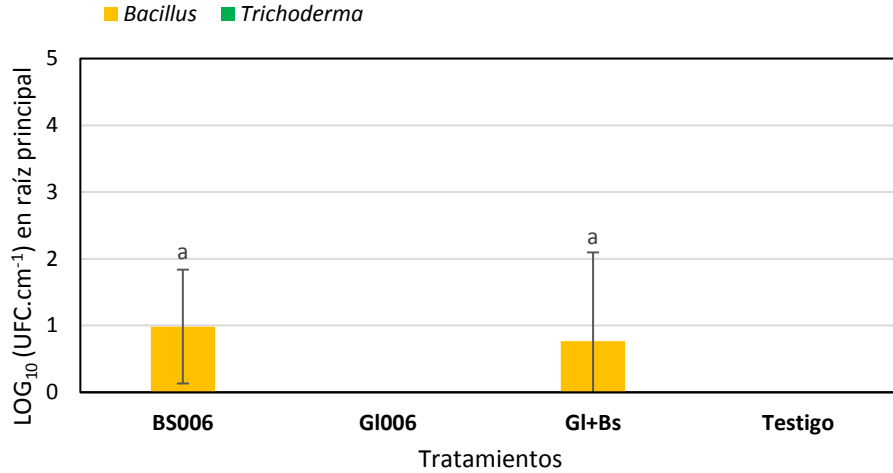


Figura 2-14. Población endófitas de *T. virens* (GI006) y *B. velezensis* (Bs006) en la raíz de plántulas de uchuva en la fase de semillero. GI006 fue aplicado en 1×10^6 conidios.mL⁻¹, Bs006 en 1×10^8 ufc.mL⁻¹. Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba LSD ($\alpha = 0.05$)

Población de microorganismos en trasplante

La aplicación de *T. virens* GI006 y *B. velezensis* Bs006 en consorcio con respecto a Foph, disminuyó la población a los siete ddi. Sin embargo, a los 21 ddi la población de Foph aumentó y mantuvo valores similares en todos los tratamientos (Figura 2-15). Con respecto a los ACB, no se observó un efecto negativo sobre las poblaciones de los biocontroladores a los siete días después de la inoculación individual y en consorcio. De forma interesante, la población de GI006 fue mayor en consorcio que en la aplicación individual en este tiempo de evaluación, resultados similares fueron observados en Bs006 a los 21 días (Figura 2-15). Bs006 mantuvo su población endófito en todos los tratamientos tanto en tallo como en raíz a partir de los siete días después de inoculación (Figura 2-16 y Figura 2-17), mientras que GI006 solo se aisló de la raíz principal en el día 21, cuando este fue aplicado de forma individual (Figura 2-17). Por su parte, Foph solo se encontró como endófito en el tallo y en la raíz principal de la planta a los 21 días después de inoculación, en el tratamiento en el que se aplicó Bs006 de forma individual (Figura 2-16 y Figura 2-17).

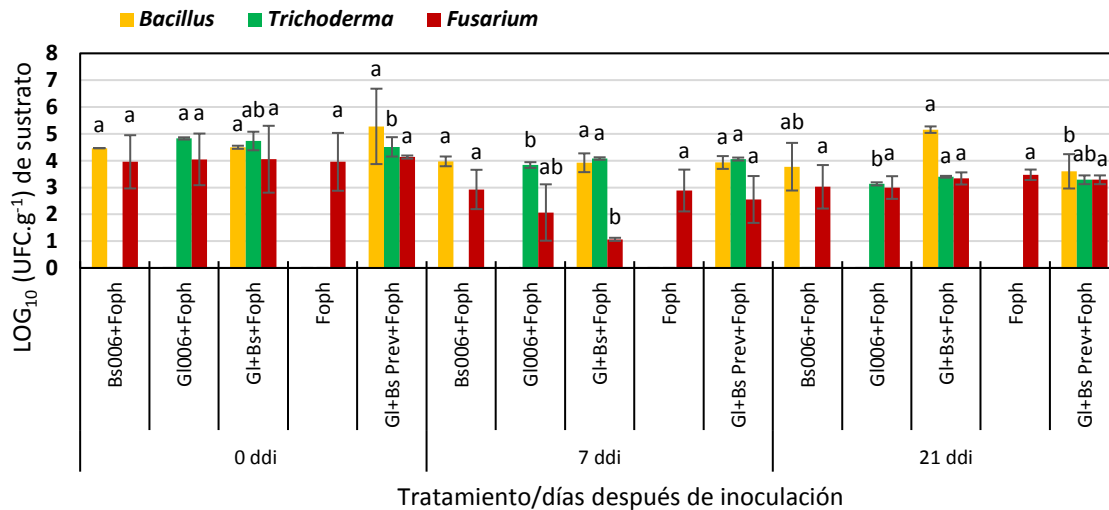


Figura 2-15. Población de microorganismos en el suelo aplicados solos y en consorcio en la fase de trasplante (30 mL). GI006 fue aplicado en 1×10^6 conidios. mL^{-1} , Bs006 en 1×10^8 ufc. mL^{-1} y Foph-Map5 en 2.22×10^6 microconidios. mL^{-1} . GI+Bs Prev+Foph indica una aplicación preventiva del consorcio en etapa de semillero adicional a la aplicación en trasplante. Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba LSD ($\alpha = 0.05$)

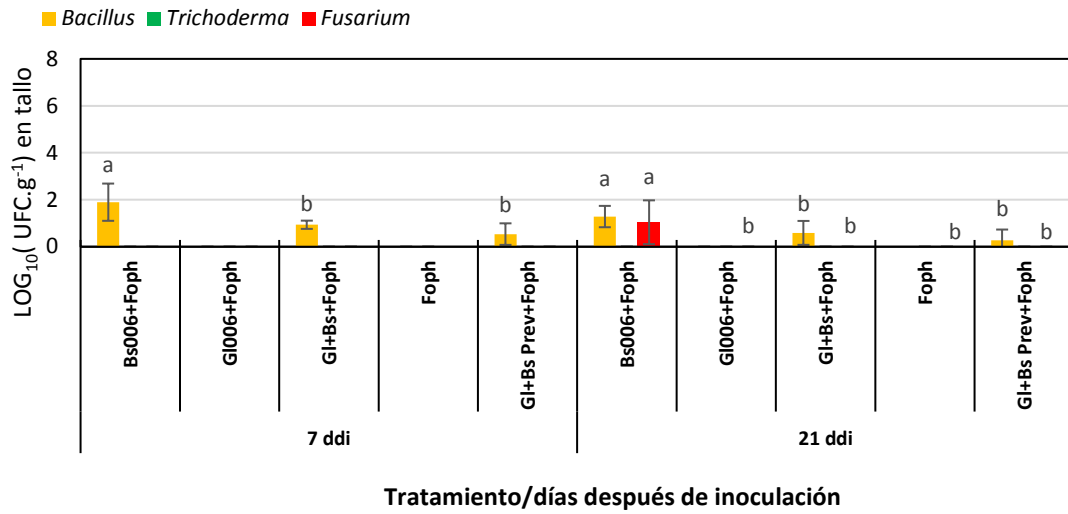


Figura 2-16. Población endófitas (tallo) de microorganismos aplicados al sustrato solos y en consorcio en la etapa de trasplante (30 mL). GI006 fue aplicado en 1×10^6 conidios.mL⁻¹, Bs006 en 1×10^8 ufc.mL⁻¹ y Foph-Map5 en 2.22×10^6 microconidios.mL⁻¹. Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con el test de LSD ($\alpha = 0.05$).

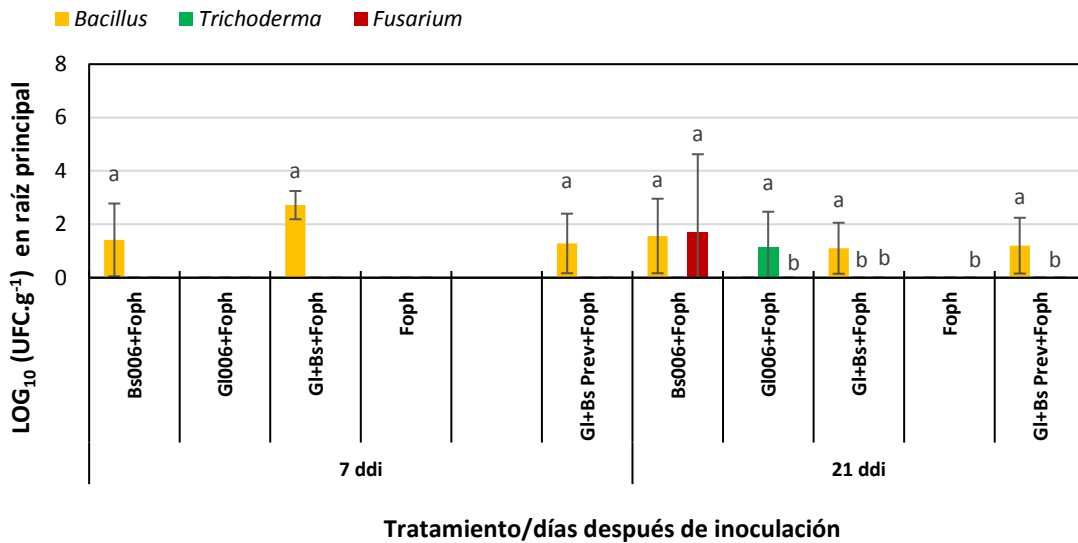


Figura 2-17. Población endófitas (raíz principal) de microorganismos aplicados solos y en consorcio al sustrato en la etapa de trasplante (30 mL). GI006 fue aplicado en 1×10^6 conidios.mL⁻¹, Bs006 en 1×10^8 ufc.mL⁻¹ y Foph-Map5 en 2.22×10^6 microconidios.mL⁻¹. Columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba LSD ($\alpha = 0.05$).

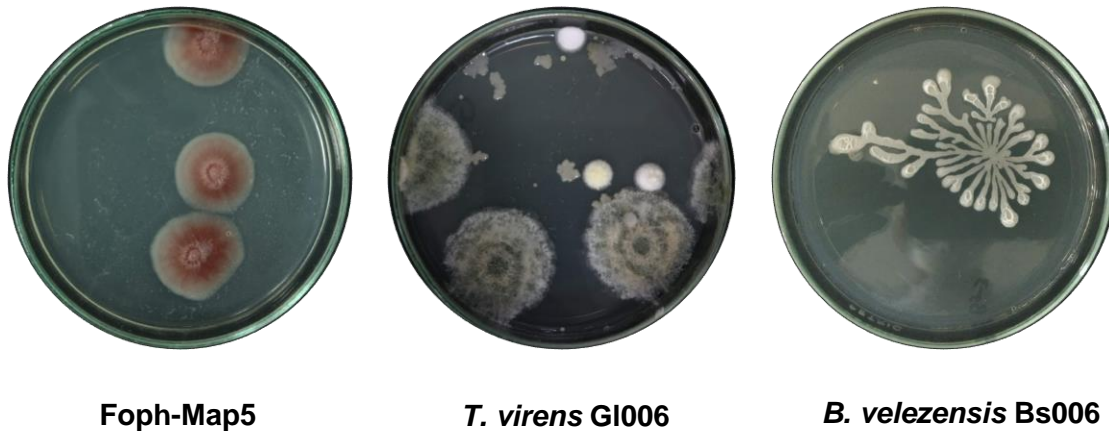


Figura 2-18. Colonias de microorganismos obtenidas de muestras de tejido a los 21 ddi procesadas para el aislamiento de endófitos. *T. virens* GI006 y Foph-Map5 en PDA suplementado con Tritón y cloranfénicol y *B. velezensis* Bs006 en medio LB (con choque térmico previo – 90°C durante 15 minutos).

2.2. Discusión

La interacción directa entre los ACB y los fitopatógenos es un proceso que se lleva a cabo en varias etapas. En el caso de cepas biocontroladoras de *Trichoderma* spp. y los hongos que parasita, este proceso se lleva a cabo en dos fases. En la primera en el ACB produce constitutivamente enzimas hidrolíticas y en la fase segunda detecta la presencia de moléculas resultantes de la degradación enzimática y activa la cascada de expresión génica (Vinale et al., 2008). Lu et al. (2004) en el patosistema *R. solani*-frijol/pepino observaron que *T. atroviride* empezó a colonizar el suelo dentro de las primeras 24 horas presentó una expresión de los genes *nag1* (exoquitinasa - N-acetil- β -D-glucosaminidasa) y *ech42* (endoquitinasa) en *T. atroviride* en esta primera fase en interacción con *R. solani* encontrando que las endo y exoquitinasas están relacionadas no solo con la degradación de la pared celular del patógeno blanco, sino también con los primeros estados de interacción entre el ACB y el fitopatógeno.

Adicionalmente, la expresión de estos genes en *T. atroviride* se mantuvo hasta el séptimo día después de la inoculación del ACB en el suelo, tiempo después del cual la intensidad de expresión génica disminuyó (Lu et al., 2004). En el presente estudio encontramos que la actividad enzimática de *T. virens* GI006 en el suelo se mantuvo activa desde el día uno hasta el día siete después de la inoculación (Tabla 2-6), coincidiendo con la descripción

génica hecha por Lu et al. (2004). Durante este período GI006 provocó una reducción de la población viable de *F. oxysporum* f. sp. *physali* cepa Map5 (Foph-Map5) en el suelo, pero posterior a los 21 días después de inoculación la población viable de Foph se recuperó a sus niveles basales encontrados en el tiempo cero (Figura 2-15).

Durante el co-cultivo de *T. atroviride* y *R. solani* en medio mínimo, Lu et al. (2004) encontraron que la mayor expresión de los genes *nagl* y *ech42* se presentó a las 48 horas de incubación, al igual que en el medio mínimo suplementado con quitina coloidal, mientras que en los controles en medio mínimo basal sin suplemento, la mayor expresión de los genes mencionados fue observada a las 72 y 96 horas, siendo más prolongada su expresión pero en menor concentración.

En el presente estudio *T. virens* GI006 presentó actividad β -N-acetilglucosaminidasa en medio mínimo basal suplementado con micelio inerte de Foph y, de forma interesante, esta actividad no se vió afectada cuando GI006 estuvo en co-cultivo con *B. velezensis* Bs006 (Tabla 2-3), lo que permite suponer que el modelo de expresión génica descrito por Lu et al. (2004) para *T. atroviride* – *R. solani* podría aplicar también en el sistema *T. virens* GI006 – *F. oxysporum* f. sp. *physali* y se podría suponer que *B. velezensis* no afecta la biosíntesis de quitinasas en *T. virens*, no obstante estas hipótesis merecen ser probadas en estudios adicionales y así mismo para entender a qué se debe que la biosíntesis de estas enzimas se detenga.

Hirsch (2018) encontraron que la cepa de *Bacillus subtilis* más eficaz en el control de *Fusarium* spp. presentó actividad quitinasa y metabolitos volátiles; Ramyabharathi & Thiruvengadam (2014), reportaron a la cepa EPCO16 de *B. subtilis* con actividad biocontroladora contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) con capacidad de síntesis de quitinasa, β 1,3 glucanasa y actividad proteolítica. En el presente estudio encontramos que bajo ciertos medios de cultivo *B. velezensis* Bs006 sintetiza proteasa y quitobiosidasa y estas actividades se mantienen en el consorcio con GI006 (Tabla 2-3, Tabla 2-4 y Tabla 2-5).

De acuerdo con O'Brien (2017) aunque las enzimas producidas por los agentes de control biológico son capaces de degradar la pared celular de las hifas de hongos fitopatógenos *in vitro*, esto no prueba que estas enzimas sean las responsables de la actividad biocontroladora *in planta*. En este trabajo encontramos que en los co-cultivos en los que

la población de Foph se redujo en mayor concentración y su efecto fue más prolongado fue en el medio de cultivo solución de suelo y exudados de raíz artificiales (SEA), en contraste con los medios SEU y las muestras de suelo (Figura 2-4, Figura 2-5 y Figura 2-6). En el medio SEA el efecto directo sobre la población de Foph si se mantuvo hasta los cinco días, en este medio los tratamientos de consorcio y Bs006 disminuyeron la población de Foph desde las 48 horas hasta los cinco días. Lo cual sugiere que la producción prolongada de estas actividades pueden ser las responsables de un efecto más duradero sobre la disminución de las poblaciones viables de Foph.

En el medio SEU solo se detectó actividad β -N-acetilglucosaminidasa y proteasa y no se detectó actividad β -1,3-glucanasa ni quitobiosidasa (solo en el tratamiento de Bs006) (Tabla 2-5). En las muestras de suelo provenientes del bioensayo *in planta* bajo invernadero se encontró un efecto similar al observado por los biocontroladores de forma individual en el medio SEU sobre la población de Foph en el que su efecto fue transitorio, esto pudo ser atribuido a un efecto fungistático, ya que la menor población de Foph en el suelo se observó en el tratamiento del consorcio GI006+Bs006 (Figura 2-8 y Figura 2-15).

En el día uno y siete se observó mayor actividad quitinasa total con respecto a Foph y presentó los mayores valores de quitobiosidasa, sorpresivamente la actividad proteasa solo se detectó a partir del día siete en donde se presentó una alta reducción de la población viable de Foph.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Han et al. (2015) donde las cepas de *Bacillus* más eficientes para controlar a *Colletotrichum* presentaron actividad quitinasa y proteasa mientras que la cepa de *B. amyloliquefaciens* LB01 que no fue eficiente en el control del patógeno solo presentó fuerte actividad proteasa y actividad celulasa, mostrando que los aislamientos más eficientes son aquellos que presentan proteasa y quitinasa. Las proteasas juegan un papel importante en la lisis ya que se unen a la capa de manoproteínas de la pared celular y abren la estructura exponiendo el glucano interno y las microfibrillas de quitina. Lo cual sugiere que la alta producción de proteasa puede favorecer y facilitar la actividad quitinasa y glucanasa al dejar expuesto su sustrato.

En las muestras de suelo procedentes del bioensayo bajo invernadero (Tabla 2-6), se observó que el tratamiento control presentó una alta actividad β -1,3-glucanasa y proteasa con respecto a los demás tratamientos que incluían a Foph solo o en co-inoculación con

los biocontroladores, atribuido posiblemente a un estímulo inicial al realizar el trasplante, producido por los exudados de la planta de uchuva sobre la microbiota de la rizósfera. En el suelo las plantas depositan cerca del 40% del carbón fijado fotosintéticamente a través de sus raíces siendo un estímulo para la microbiota del suelo que se siente atraída por ese porcentaje de carbón fijado, llevando a un aumento en las poblaciones (Pieterse et al., 2014), este estímulo sobre la población microbiana pudo estimular de igual manera la actividad enzimática de la microbiota del suelo desde el primer tiempo de muestreo, lo que generó altos valores de estas dos enzimas en el tratamiento control.

En este trabajo se encontraron resultados contrastantes en los co-cultivos en medio SEA, SEU y MMB suplementado con Foph y las muestras de suelo *in planta* con el co-cultivo en medio PDB y LB en el que los ACB se limitaron a producir β -1,3-glucanasa y quitinasa por GI006 y proteasa por Bs006, mientras que el consorcio solo presentó actividad quitinasa, encontrando que en los otros medios evaluados el repertorio de enzimas fue más amplio para los dos microorganismos de forma independiente y en consorcio.

De acuerdo con Bhatia et al. (2018) el empleo de co-cultivos interreinos de especies distantes filogenéticamente como es el caso de GI006 y Bs006 hongo y bacteria, puede aumentar la funcionalidad y la eficiencia. En este estudio se encontró que el consorcio fue eficiente en el medio SEA reduciendo la población de Foph que en el medio SEU y la rizósfera. Se observó que en el medio SEU que contiene solución de suelo y exudados radicales de uchuva, aunque se podría dar un acercamiento a las condiciones encontradas *in vivo* no se observó el mismo efecto del consorcio sobre la población viable de Foph y en este medio no fue posible detectar actividad quitinasa y β -1,3-glucanasa, mientras que en las muestras de suelo SP sí se determinaron.

Esto podría ser por dos razones: la primera, a que efectivamente no se produjo quitinasa total en cantidades detectables por este protocolo y esta actividad fue la encargada de reducir la población del patógeno en suelo en donde si fue detectada o la segunda puede ser que debido al protocolo empleado para la obtención del extracto enzimático de los dos tipos de muestra, teniendo en cuenta que para el medio SEU se empleó el protocolo para la obtención de extractos enzimáticos a partir de fermentaciones líquidas en el que se eliminó el precipitado que contenía algunos gránulos de suelo, mientras que el protocolo propuesto por Jackson et al. (2013) sugiere que para el procesamiento de muestras de suelo es importante mantener los gránulos dentro de la reacción enzimática

ya que dentro de ellos pueden haber enzimas atrapadas que están involucradas en las actividades evaluadas. Probablemente debido a los bajos valores de actividad quitinasa total y β -1,3-glucanasa estos no fueron detectados en el sobrenadante del medio SEU, mientras que la técnica empleada para quitobiosidasa y β -N-acetilglucosaminidasa es más sensible teniendo en cuenta que se empleó el kit quitinasa (sigma®) el cual contiene como sustratos puros sustrato nitrofenil N, N-diacetil β -D-quitobiosa para detección de actividad quitobiosidasa, 4-Nitrofenil N-acetil- β -D-glucosamina para la cuantificación de actividad β -N-acetilglucosaminidasa, mientras que en la cuantificación de la actividad quitinasa total se empleó quitina coloidal, por esto esta técnica pudo ser más sensible.

En cuanto al efecto transitorio de los biocontroladores sobre la población de Foph tanto en el medio SEU como en las muestras de suelo *in planta*, posiblemente la población de Foph que toleró los efectos de GI006 y el consorcio, germinó hasta alcanzar nuevamente su población con respecto al control Foph. En el caso específico del medio SEA a las 48 horas Foph también pudo causar un efecto negativo sobre los conidios de GI006 probablemente a causa de un efecto fungistático, causando una disminución en la población de GI006 y de Foph en el día cinco de evaluación en donde se presentaron valores menores a 10 ufc.mL^{-1} de los dos microorganismos.

De forma interesante, se observó la estimulación o aumento de la población de Bs006 en el consorcio con respecto a su aplicación individual en el co-cultivo en medio mínimo basal a los cinco días de inoculación y en el sustrato de semillero a los 15 ddi (Figura 2-12), Este fenómeno podría estar relacionado la adhesión de las células de Bs006 a las estructuras de GI006, observadas previamente lo cual pudo facilitar el movimiento de las bacterias en el medio o bien tomar los exudados excretados al medio por GI006 de acuerdo a lo reportado por Triveni, Prasanna y Saxena, (2012) en donde se ha encontrado que en este proceso de formación de biopelículas de las bacterias sobre los hongos, las bacterias pueden adherirse con el fin de obtener nutrientes de los hongos a partir de exudados secretados. Otros trabajos han encontrado estímulos en el aumento en las poblaciones de un ACB en presencia de otro microorganismo en consorcio, como el trabajo descrito por Dandurand y Knudsen (1993) en donde encontraron que *Pseudomonas fluorescens* 2-79-B46 aumentó la densidad de población de *T. harzianum* sobre la semilla de arveja.

Adicional a la actividad de enzimas degradadores de la pared celular, la inducción de resistencia sistémica es uno de los modos de acción asociado con los ACB en el control de patógenos del suelo (Pieterse et al., 2014). Los tres tratamientos de ACB evaluados (Bs006, GI006 y Bs006+GI006) redujeron la incidencia del marchitamiento vascular de la uchuva en el modelo de raíces divididas cuando se aplicaron sus células, encontrando que no hubo un mayor control de la enfermedad en el tratamiento del consorcio con respecto a GI006 y Bs006 (Figura 2-10, Figura 2-11 y Tabla 2-8).

GI006 fue el tratamiento de biocontrol más eficaz en el control de Foph, el cual podría ser por la producción de elicitors que pueden activar la respuesta que inducen defensa en las plantas como fragmentos de paredes celulares o proteínas purificadas (Djonovi et al., 2006), como xilanasas y celulasas, para el caso de la especie *T. virens* se han reportado elicitors específicos de defensa como Sm1 (un elicitor de origen proteínico no enzimático), en maíz contra *Colletotrichum graminicola* y es secretado en estados tempranos de la interacción activando la producción de ácido jasmónico después de 18 días de la inoculación del ACB y cuatro días después de la aplicación del patógeno Djonovi et al. (2006). También se ha encontrado que *T. virens* causó acumulación de especies reactivas de oxígeno y compuestos fenólicos en plantas de algodón como mecanismo de defensa (Djonovi et al., 2006).

La resistencia inducida con *Bacillus spp.* se ha asociado al compuesto volátil 2,3-butanediol (Choudhary et al., 2007), la respuesta inducida es elicitada por diferentes microorganismos y por lo tanto son diversas vías las que se promueven en la planta, para el caso de cepas de *Bacillus spp.* la vía activada es dependiente de la cepa y la planta hospedero y en algunos casos del patógeno evaluado (Choudhary y Johri, 2009), también se ha asociado a este modo de acción la producción de lipopéptidos cíclicos como surfactina (Ongena y Jacques, 2008).

En cuanto a la colonización endófito del tejido vegetal, se encontró que *B. velezensis* ingresó en semillero y trasplante a partir del séptimo día después de inoculación (Figura 2-13, Figura 2-14, Figura 2-16 y Figura 2-17). GI006 y Bs006 mantuvieron sus poblaciones en suelo, los microorganismos benéficos endófitos comúnmente ingresan a la raíz a través de aberturas naturales de las raíces laterales emergidas o utilizando los pelos radicales y la zona apical como puntos de entrada, mediante el uso de enzimas degradadoras de la pared celular (Pieterse et al., 2014)

Se encontró que la aplicación de células y sobrenadante de Bs006 podría favorecer el ingreso de Foph, efecto que se podría explicar por la producción de celulasas en su sobrenadante de fermentación en caldo LB, para su ingreso a la planta Foph necesita de enzimas degradadoras de la pared celular vegetal tales como: celulasas, poligalacturonasas, xilanasas y pectinasas (Di Pietro et al., 2003).

Sin embargo, se encontró que al aplicar Bs006 en consorcio con GI006, no ingresó Foph al tejido vegetal, esto se podría explicar por la producción de compuestos fenólicos pueden inhibir las celulasas (Ximenes et al., 2011) producidas por Bs006, es bien conocido que *Trichoderma* spp. produce compuestos fenólicos o puede inducir su producción por parte de la planta (Nawrocka y Malolepsza, 2013) estos compuestos fenólicos pudieron inhibir las celulasas presentadas en el caldo de fermentación de Bs006 o las producidas por Foph, impidiendo el ingreso de Foph al tejido vegetal, teniendo en cuenta que se observó que en medio sólido GI006 inhibió la actividad celulasa de Bs006 y en fermentación líquida en co-cultivo la disminuyó significativamente.

Los resultados sugieren que se podría atribuir el efecto sinérgico o aditivo del consorcio a una combinación entre los modos de acción directos e indirectos. Sin embargo, podría haber una tendencia a que principalmente los modos directos estén involucrados con el efecto sinérgico del consorcio, teniendo en cuenta que solo se observó este efecto en la disminución de la población viable de Foph en el suelo presentando 67% de eficacia, frente a 28,5% de eficacia de GI006 y una eficacia negativa de Bs006 obteniendo un SF de 2.21, aumentando en 38.5% la eficacia de los ACB de forma individual (Tabla 2-7).

Aunque en este trabajo no se evaluó la producción de lipopéptidos por parte de Bs006, estudios realizados por Moreno (2017) encontraron que en el sobrenadante del caldo de cultivo de 48 horas de crecimiento en medio LB el cual fue el inóculo empleado en este estudio, contiene los lipopéptidos surfactinas, iturinas y fengycinas, principalmente este último juega un rol importante en la acción directa contra el patógeno perforando su pared celular (Ongena y Jacques, 2008; Moreno, 2017) y estos mecanismos también podrían presentarse en el consorcio. Adicionalmente, los dos ACB probados en este estudio, solos y en mezcla, indujeron resistencia en la uchuva contra Foph.

Debido a que se encontró que en suelo las cantidades de actividad enzimática producidas fueron mínimas comparado con los co-cultivos en medio mínimo basal suplementado con

el micelio de Foph, pero al evaluar el medio SEU y SEA se encontraron tendencias más cercanas a las encontradas *in planta*, estos medios serían ideales para evaluar la actividad enzimática que puede presentarse en el suelo bajo condiciones de laboratorio con algunos ajustes requeridos en la concentración de suelo y exudados empleados en el medio SEU con el fin de obtener valores más cercanos a los encontrados *in planta*.

El modo de acción predominante de *B. velezensis* Bs006 sobre Foph podría ser indirecto, actuando como un inductor de resistencia cuando sus células son aplicadas libres de sobrenadante. Sin embargo, se observó que su aplicación de forma individual no fue eficaz en la disminución de la población viable del patógeno en suelo y su eficacia relacionada con modos de acción directos sobre el control del marchitamiento vascular disminuyó al adicionar el sobrenadante.

Para el caso de *T. virens* GI006 también se observó una eficacia promisoriosa en cuanto a modos de acción indirectos como inductor de resistencia. Sin embargo, esta eficacia se mantuvo al realizar solo las aplicaciones simultáneas con el fitopatógeno en el suelo, por lo que sus modos de acción directos e indirectos podrían ser complementarios en el control de Foph.

2.3. Conclusiones

- El consorcio de *T. virens* GI006 y *B. velezensis* Bs006 redujo la población viable de Foph en la rizósfera de uchuva de forma sinérgica, en donde presentó actividad proteasa, quitinasa total, exoquitinasa, quitobiosidasa, β -N-acetilglucosaminidasa y β -1,3-glucanasa, sugiriendo que la aplicación combinada de los dos agentes de control biológico al suelo no afectó la síntesis de enzimas degradadoras de pared celular y que estas pudieron tener un efecto directo sobre Foph.
- El consorcio controló el desarrollo del marchitamiento vascular en las plantas de uchuva mediante inducción de resistencia sistémica.
- El comportamiento endofítico de Bs006 no se afectó negativamente por la aplicación combinada con GI006 al suelo. Así mismo, no se presentó un efecto negativo en la sobrevivencia de las poblaciones viables en de GI006 y Bs006 en la rizósfera.

- El consorcio microbiano a base de *T. virens* GI006 y *B. velezensis* Bs006 presenta modos de acción directos e indirectos los cuales pueden ser complementarios, a lo cual se le puede atribuir el efecto sinérgico en el control del marchitamiento vascular de la uchuva.

3. Discusión general

Los microorganismos son importantes fábricas de compuestos naturales que tienen alto potencial de aplicación en las actividades humanas y principalmente en el campo de la sanidad vegetal. Por ejemplo, especies biocontroladoras del grupo operacional de *Bacillus amyloliquefaciens* (Dunlap, 2017), producen un amplio número de antibióticos que tienen efectos sobre patógenos de plantas, inhibiendo su crecimiento y/o causando daños directos (Choudhury et al., 2015); por su parte, las especies de *Trichoderma* basan su arsenal principalmente en la producción de enzimas degradadoras de pared celular con efectos de biocontrol sobre ellos (Harman, 2000).

Tanto las bacterias como los hongos biocontroladores pueden desplegar más de un modo de acción en contra de los fitopatógenos (Lugtenberg y Kamilova, 2009; Lazarovits, et al., 2014). *B. velezensis* Bs006 tiene la capacidad de sintetizar varios compuestos de lipopéptidos cíclicos no ribosomales (CLPs) (Moreno, 2017) conocidos por su capacidad de desestabilizar las membranas celulares de varias especies de hongos fitopatógenos (Ongena y Jacques, 2008), compuestos sobre los cuales se ha sugerido que basa su potencial antagonista sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *physali* (Foph) (Moreno, 2017) agente causante del marchitamiento vascular en uchuva. No obstante, en el presente trabajo determinamos que Bs006 adicional a los lipopéptidos tiene la capacidad de sintetizar celulasas, proteasas y quitobiosidasa, las cuales también podrían estar involucradas en las interacciones con la planta y con los fitopatógenos durante su papel como agente de biocontrol.

Por otra parte, *T. virens* GI006, del cual ya se conocía su alto potencial como agente de biocontrol sobre los fitopatógenos *Sclerotium cepivorum* (Castillo, 2000) y *Botrytis cinerea* (Moreno et al., 2007), mostró alta actividad antagónica contra Foph y alta eficacia de control del marchitamiento vascular de la uchuva. Adicionalmente, GI006

tiene la capacidad de sintetizar un amplio repertorio de enzimas degradadoras de la pared celular, las cuales probablemente juegan un papel protagónico en su actividad como agente de biocontrol.

A pesar del alto potencial génico que puedan llegar a tener los agentes de control biológico, la expresión de los rasgos de biocontrol en el sitio de aplicación está influenciada por las condiciones ambientales, incluyendo los efectos de la microflora nativa y la planta hospedero (Vinale et al. 2008), lo que ha contribuido en gran parte a la variabilidad de los resultados obtenidos por diferentes investigadores (Raupach y Kloepper, 1998). No obstante, el uso de mezclas de microorganismos o consorcios microbianos ha mostrado resolver en gran medida esta limitante (Xu et al., 2011). Microorganismos con diferentes modos de acción predominantes o requerimientos ambientales diferentes son los miembros ideales en este tipo de consorcios.

En el presente estudio, se profundizó en el conocimiento de las interacciones entre estos dos agentes de biocontrol, con el fin de identificar posibles efectos sinérgicos o antagónicos sobre su viabilidad, crecimiento, producción de enzimas degradadoras de pared celular y su actividad biocontroladora, conocimiento útil para el siguiente paso que es la formulación y estrategias de aplicación del consorcio como una nueva herramienta para el control de enfermedades en plantas.

Específicamente, en este estudio se observó un efecto positivo del sobrenadante de Bs006 sobre el crecimiento y la actividad biocontroladora de GI006. Esto pudo ser atribuido a una acción complementaria de los metabolitos de Bs006 - incluyendo CLPs (Moreno, 2017) y enzimas degradadoras de la pared celular, principalmente proteasas presentes en el sobrenadante, los cuales probablemente estimularon respuestas en GI006, traducidas en mayor actividad en contra de Foph dando lugar a una interacción sinérgica en contra del desarrollo del marchitamiento vascular. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Bhatia et al. (2018), quienes señalaron que el intercambio de metabolitos y señales de comunicación entre miembros de un consorcio podrían aumentar o mejorar su propósito.

Así mismo, la interacción celular entre Bs006 y GI006 no fue negativa para ninguno de los dos, ya que se observó que la bacteria se adhirió a la superficie del hongo formando una biopelícula sin causar daños físicos, lo que explica el incremento en la población de Bs006 en presencia de GI006. Un fenómeno similar fue observado por Dandurand y Knudsen (1993) en el cual, la presencia de *Pseudomonas fluorescens* (cepa 2-79-B46) aumentó la densidad de población de *T. harzianum* sobre las semillas de la planta hospedero. Adicionalmente, la interacción entre Bs006 y GI006 también ocasionó un mayor control del marchitamiento vascular, demostrando compatibilidad entre los dos microorganismos, ya que no se vieron reducidos los rasgos relacionados con los modos de acción directos, evaluados al realizar la aplicación simultánea con el patógeno ni los modos de acción indirectos, evaluados en el modelo de raíces divididas.

Así como en la interacción antagonista-patógeno existen unas relaciones de densidades de inóculo bajo las cuales se consigue un nivel adecuado de control de enfermedades (Larkin y Fravel, 1999), en el presente estudio se consideró importante comprobar la hipótesis que en la relación antagonista-antagonista la densidad de población podría ser determinante del éxito de biocontrol por el consorcio. Al respecto, se observó que la concentración óptima de Bs006 y GI006 en el consorcio fue 1×10^8 ufc.mL⁻¹ y 1×10^6 conidios mL⁻¹, respectivamente. Bajo esta relación se observó un efecto sinérgico de control del marchitamiento vascular y una menor variabilidad de los resultados *in vivo*.

Bajo esta relación de densidades de inóculo, la actividad enzimática de Bs006 en medio sólido no se vio reducida, en comparación con los efectos provocados por GI006 en concentración de 1×10^7 conidios mL⁻¹, la cual causó una reducción en la actividad proteasa en Bs006 inoculado en concentración de 1×10^7 pero no en concentración de 1×10^8 ufc mL⁻¹. Estas observaciones demuestran la importancia de la proporción entre los inóculos de los agentes de biocontrol durante la construcción de consorcios, con el fin de evitar por ejemplo, el agotamiento de fuentes de energía por una especie dominante (Bhatia et al., 2018; Hibbing et al., 2010).

En la publicación de 1998, Weller recomienda que la selección de agentes de control biológico debería realizarse en condiciones muy cercanas a las naturales, con el fin de

tener un mejor acercamiento a las respuestas que sucederían en campo. En este sentido, en el presente trabajo se incluyeron medios de cultivo que contenían solución de suelo y exudados radicales de la planta de uchuva, en los cuales se evaluaron los efectos de co-inoculaciones de Bs006 con GI006 y entre éstos con *F. oxysporum* sobre el crecimiento de la colonia y sobre la actividad enzimática. Los resultados permitieron detectar respuestas diferenciales entre los medios de cultivo, sugiriendo que el medio con exudados radicales y suelo es una fuerte aproximación a lo que pasaría *in planta*.

Por ejemplo, se observó que en el medio exudados de uchuva *per se* el crecimiento de la bacteria Bs006 no fue exitoso y la actividad sobre Foph fue atribuida a GI006, el cual si pudo desarrollarse. Sin embargo, Moreno (2017) demostró que Bs006 logra colonizar la superficie de la raíz de uchuva y desplegar efectos de antibiosis contra Foph en un modelo gnotobiótico, lo que sugiere la necesidad de otros componentes del hospedero para el establecimiento exitoso de la bacteria. Adicionalmente, en el presente trabajo se pudo observar que tanto GI006 como Bs006 colonizaron la semilla y la raíz de uchuva, sugiriendo compatibilidad entre los dos agentes de control biológico sobre el hospedero.

En los bioensayos bajo invernadero en los que se evaluó la actividad biocontroladora, el consorcio y la aplicación de GI006 en forma individual presentaron eficacia sobre el control de la enfermedad, no obstante, el tratamiento con Bs006 fue variable. Esto sugiere que, aunque Bs006 presenta mecanismos de acción con alto potencial contra Foph, su expresión en la rizósfera cuando es utilizada como único biocontrolador parece no ser suficiente para detener de forma eficaz al patógeno y solamente cuando se aplica junto con GI006 la eficacia del control es menos variable. Por lo tanto y de acuerdo con Jain et al. (2015), el empleo de consorcios microbianos puede mejorar la consistencia entre pruebas y es así como el grupo de investigación ha comprobado que los resultados observados en el presente trabajo se mantienen en condiciones de cultivo al aire libre, creciendo las plantas de uchuva durante ocho meses en bolsas con 12 Kg de suelo inoculado artificialmente con Foph (sin publicar).

Globalmente, los resultados del presente estudio sugieren que el consorcio de GI006 y Bs006 presenta modos de acción complementarios contra *F. oxysporum* f. sp. *physali*

y aunque el hongo GI006 aporta una gran parte de la eficacia de control, la presencia del sobrenadante o las células de Bs006 favorece la sinergia de control del marchitamiento vascular de la uchuva y reduce la variabilidad de los resultados entre pruebas.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1. Conclusiones

El consorcio microbiano compuesto por las cepas nativas de *T. virens* GI006 y *B. velezensis* Bs006 presentó sinergia en el control del marchitamiento vascular de la uchuva, a través de modos de acción directos e indirectos, con valores de eficacia entre el 71 y 85% y fue compatible en la rizósfera de la planta, sugiriendo que tiene alto potencial para ser usado en campo.

4.2. Recomendaciones

- Evaluar la eficacia del consorcio Bs006 y GI006 en el control del marchitamiento vascular de la uchuva en condiciones de cultivo comercial.
- Continuar con el estudio del consorcio para el control del marchitamiento vascular de la uchuva en etapas de producción masiva y formulación de un bioproducto.
- Caracterizar la respuesta génica de la planta inducida por los microorganismos del consorcio.
- Caracterizar la producción de lipopéptidos cíclicos por *B. velezensis* Bs006 en consorcio con *T. virens* GI006 con el fin de generar más información sobre el arsenal relacionado con modos de acción del consorcio microbiano.

- Emplear los medios de cultivo a base de suelo y exudados radicales en el estudio de biocontroladores sobre otros patosistemas como parte de tamizajes iniciales contra fitopatógenos del suelo, así como en la evaluación de compatibilidad de microorganismos en el diseño de consorcios microbianos con el fin de predecir su actividad biológica *in planta*.

5. Bibliografía

- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18: 265–267.
- Agrawal, T., Kotasthane, A. S. 2012. Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. *SpringerPlus*. 1: 1-10. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-1-73>
- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology 5th Edition*. San Diego: Academic Press: 922.
- Ait-Lahsen, H., Soler, A., Rey, M., de la Cruz, J., Monte, E. and Llobell, A. (2001) An antifungal exo- α -1,3-glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5833–5839.
- Al-Ali, A., Derauel, J., Krier, F., Béchet, M., Ongena, M., Jacques, P. 2017. Biofilm formation is determinant in tomato rhizosphere colonization by *Bacillus velezensis* FZB42. *Environmental Science and Pollution Research*, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0469-1>
- Alizadeh, H., Behboudi, K., Ahmadzadeh, M., Javan-Nikkhah, M., Zamioudis, C., Pieterse, C. M. J., Bakker, P. 2013. Induced systemic resistance in cucumber and *Arabidopsis thaliana* by the combination of *Trichoderma harzianum* Tr6 and *Pseudomonas* sp. Ps14. *Biological Control*, 65: 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.01.009>
- Amini, J., Sidovich, D. 2010. The Effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with *Fusarium* wilt of tomato. *Journal of Plant Protection Research* 50: 172–78.
- Analdex. 2018. Informe de exportaciones e importaciones de fruta 2017. Bogotá, Colombia: Asociación Nacional de Comercio Exterior. Recuperado de: <http://www.analdex.org/2018/04/16/informe-de-exportaciones-e-importaciones-de-fruta-2017/>
- Anónimo, 1968. *Plant Pathologist's Pocket Book*. Commonwealth Mycological Institute, Pp: 394-395.
- Arseneault, T., Martin, F. 2017. Biocontrol through Antibiosis: Exploring the role played by subinhibitory concentrations of antibiotics in soil and their impact on plant pathogens. *Canadian Journal of Plant Pathology* 39: 267–74.

<http://dx.doi.org/10.1080/07060661.2017.1354335>.

- Bailey, B. A., Bae, H., Strem, M. D., Crozier, J., Thomas, S. E., Samuels, G. J., Holmes, K. A. 2008. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control*, 46: 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.003>
- Bashan, Yoav, Levanony, H. 1985. An improved selection technique and medium for the isolation and enumeration of *Azospirillum brasilense*. *Canadian Journal of Microbiology*, 31: 947–52.
- Beauregard, P. B., Chai, Y., Vlamakis, H., Losick, R., Kolter, R. 2013. *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110: 1621–1630. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218984110>
- Beltrán, C.R. 2004. Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. con potencial biocontrolador de *Rhizoctonia solani* Kühn. en papa bajo condiciones de casa de malla. Trabajo de pregrado en Biología. Facultad de Ciencias. Universidad nacional de Colombia – Sede Bogotá.
- Beltrán, C., Sastoque, L., Moreno-Velandia, C.A., Cotes, A.M. 2007. Evaluación del bioplaguicida granulado a base de *Trichoderma koningii* cepa Th003 contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en semillas de tomate pregerminadas. En: Informe técnico final del proyecto de investigación: Optimización tecnológica y evaluación de bioplaguicidas a base de *Trichoderma koningii* para el control de enfermedades en cultivos de tomate bajo invernadero.
- Beltrán, C.R., Moreno-Velandia, C.A, Cotes, A.M. 2011. *Trichoderma koningiopsis* Th003 alternativa biológica para el control de *Rhizoctonia solani* en el cultivo de papa. Boletín de resultados de investigación. CORPOICA. Editorial Produmedios. Bogotá, Colombia. 72 p.
- Berger, B., Patz, S., Ruppel, S., Dietel, K., Faetke, S., Junge, H., Becker, M. 2018. Successful formulation and application of plant growth-promoting *Kosakonia radicincitans* in Maize Cultivation. *BioMed Research International*, 2018: 1-8 <https://doi.org/10.1155/2018/6439481>
- Bernstein, H.C., Carlson, R. 2012. Microbial consortia engineering for cellular factories: *in vitro* to *in silico* systems. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 3: 1-8. [Http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2001037014600738](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2001037014600738).
- Bhatia, S.K., Bhatia, R.K., Choi, Y.K., Kan, E., Kim, Y.G., Yang, Y.H. 2018. Biotechnological potential of microbial consortia and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 0, 1–21. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1471445>
- Bigeard, J., Colcombet, J., Hirt, H. 2015. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI), *Molecular plant* 8: 521–539.
- Brimner, T. A., & Boland, G. J. 2003. A review of the non-target effects of fungi used to

- biologically control plant diseases. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 100: 3–16. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(03\)00200-7](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(03)00200-7)
- Bunternngsook, B., Mhuantong, W., Champreda, V., Thamchaipenet, A., & Eurwilaichitr, L. 2014. Identification of novel bacterial expansins and their synergistic actions on cellulose degradation. *Bioresource Technology*, 159: 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.004>
- Cabrera, T.A. 2000. Aporte al conocimiento de la microflora fúngica del suelo de la Amazonía Colombiana, con énfasis en tres grupos funcionales. Trabajo de grado. Biología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. D.C. Colombia. 326 p.
- Calderón, A., Zapata, J., Muñoz, R., Pedreño, M., & Barceló, A. (1993). Resveratrol Production as a Part of the Hypersensitive-Like Response of Grapevine Cells to an Elicitor from *Trichoderma viride*. *The New Phytologist*, 124(3), 455-463. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/2558124>
- Castillo, N. H. 2000. Aislamiento, identificación y selección de potenciales hongos antagonistas del hongo *Sclerotium cepivorum* causante de la pudrición blanca de la cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.). Trabajo de grado. Ingeniería agronómica. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Facultad de Agronomía. Tunja. 159 p.
- Caviedes, D.C. 2010. Aislamiento y selección de *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. promotoras del crecimiento vegetal en cultivo de uchuva (*Physalis peruviana* L.) con actividad antagónica frente a *Fusarium oxysporum*. Trabajo de pregrado. Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. 43 p.
- Cawoy, H., Mariutto, M., Henry, G., Fisher, C., Vasilyeva, N., Thonart, P., Ongena, M. 2014. Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus* depends on efficient surfactin production. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27: 87-100 <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-13-0262-R>
- Cerkauskas, Ray. 2005. Fusarium Wilt. AVRDC e The World Vegetable Center, p. 2. Publication 05-627. http://203.64.245.61/fulltext_pdf/FLYER/f0150.pdf
- Chaparro, J. M., Badri, D. V., Bakker, M. G., Sugiyama, A., Manter, D. K., Vivanco, J. M. 2013. Root exudation of phytochemicals in Arabidopsis Follows Specific Patterns That Are Developmentally Programmed and Correlate with Soil Microbial Functions. *PLoS ONE*, 8: 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055731>
- Christopher, D. J., Raj, T. S., Rani, S. U., & Udhayakumar, R. 2010. Role of defense enzymes activity in tomato as induced by *Trichoderma virens* against *Fusarium wilt* caused by *Fusarium oxysporum* f sp. lycopersici. *Journal of Biopesticides*, 3: 158–162.
- Choudhary, D. K., Johri, B. N. 2009. Interactions of *Bacillus* spp. and plants - with special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research*, 164: 493–513. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2008.08.007>
- Choudhary, D. K., Prakash, A., Johri, B. N. 2007. Induced systemic resistance (ISR) in

- plants: Mechanism of action. *Indian Journal of Microbiology*, 47: 289–297. <https://doi.org/10.1007/s12088-007-0054-2>
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., del-Val, E., Larsen, J. 2016. Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS Microbiology Ecology*, 92: fiw036. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw036>
- Cotes, A.M., Jiménez, P., Rodríguez, M.X., Zapata, J., Gómez, M., Grijalba, L., González, C., Smith, A., Mejía, C., Mesa, P., Cruz, L.C. 2012. Estrategias de control biológico de *Fusarium oxysporum* en el cultivo de la Uchuva (*Physalis peruviana*). Boletín de resultados de investigación. CORPOICA. Editorial Produmedios. Bogotá, Colombia. 82 p.
- Cotes A. M. (Ed.). 2018. Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros (Vol. 1). Mosquera, Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (agrosavia).
- Crane, J. M., Bergstrom, G.C. 2014. Spatial distribution and antifungal interactions of a *Bacillus* biological control agent on wheat surfaces. *Biological Control* 78: 23–32.
- Cupp-enyard, C. 2008. Sigma ' s Non-specific Protease Activity Assay - Casein as a Substrate, (September), 2–4. <https://doi.org/10.3791/899>
- Curi, P. N., Carvalho, C. D. S., Salgado, D. L., Pio, R., Silva, D. F. Da, Pinheiro, A. C. M., Souza, V. R. 2018. Characterization of different native American *Physalis* species and evaluation of their processing potential as jelly in combination with brie-type cheese. *Food Science and Technology*, 38: 112–119. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/1678-457x.01317>
- Daguerre, Y., Siegel, K., Edel-Hermann, V., Steinberg, C. 2014. Fungal proteins and genes associated with biocontrol mechanisms of soil-borne pathogens: A review. *Fungal Biology Reviews*, 28: 97–125. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2014.11.001>
- Dahiya, N., Tewari, R., Hoondal, G. S. (2006). Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*. 773–782. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0183-7>
- Dandurand, L.M., Knudsen, G.R., 1993. Influence of *Pseudomonas fluorescens* on hyphal growth and biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* in the sper- mosphere and rhizosphere of pea. *Phytopathology* 83: 265-270
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Foster, G. D. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13: 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>

- Degenkolb T, Karimi Aghcheh R, Dieckmann R, Neuhofer T, Baker SE, et al. 2012. The production of multiple small peptaibol families by single 14-module peptide synthetases in *Trichoderma/Hypocrea*. *Chem. Biodivers.* 9:499–535
- Dennis, C., Webster J. 1971. Antagonistic properties of species group of *Trichoderma*. 1. Production of nonvolatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, 57: 25-39.
- Denoth, Madlen, Leonardo Frid, Judith H. Myers. 2002. Multiple Agents in Biological Control: Improving the Odds? *Biological Control*, 24: 20–30.
- Di Pietro, A., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J., Roncero, M. I. G. 2003. *Fusarium oxysporum*: Exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular Plant Pathology*, 4: 315–325. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00180.x>
- Díaz, A., Smith, A., Mesa, P., Zapata, J., Caviedes, D., Cotes, A.M. 2013. Control of *Fusarium* wilt in Cape gooseberry by *Trichoderma koningiopsis* and PGPR. IOBC-WPRS Bulletin. 86: 89 – 94.
- Djonovi, S., Pozo, M. J., Dangott, L. J., Howell, C. R., Kenerley, C. M. 2006. Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic Resistance, 19: 838–853.
- Döring, T. F., Pautasso, M., Finckh, M. R., Wolfe, M. S. 2012. Concepts of plant health - reviewing and challenging the foundations of plant protection. *Plant Pathology*, 61:1–15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02501.x>
- Duffy, B.K., Weller, D.M., 1995. Use of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* alone and in combination with fluorescent *Pseudomonas* spp. to suppress take-all of wheat. *Plant Disease*, 79: 907-911.
- Duffy, B.K., Simon, A., Weller, D.M., 1996. Combination of *Trichoderma koningii* with fluorescent *Pseudomonads* for control of take-all on wheat. *Phytopathology*, 86:188-194.
- Dunne, C., Moënné-Loccoz, Y., McCarthy, J., Higgins, P., Powell, J., Dowling, D. N., O’Gara, F. 1998. Combining proteolytic and phloroglucinol-producing bacteria for improved biocontrol of *Pythium*-mediated damping-off of sugar beet. *Plant Pathology*, 47: 299–307. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1998.00233.x>
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Foster, G. D. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13: 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Döring, T. F., Pautasso, M., Finckh, M. R., & Wolfe, M. S. (2012). Concepts of plant health - reviewing and challenging the foundations of plant protection. *Plant Pathology*, 61: 1–15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02501.x>

- Dunne, C., Moëgne-Loccoz, Y., McCarthy, J., Higgins, P., Powell, J., Dowling, D. N., O'Gara, F. 1998. Combining proteolytic and phloroglucinol-producing bacteria for improved biocontrol of Pythium-mediated damping-off of sugar beet. *Plant Pathology*, 47: 299–307. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1998.00233.x>
- Estevez de Jensen, C., Percich, J. A., Graham, P.H. 2002. Integrated Management Strategies of Bean Root Rot with *Bacillus subtilis* and *Rhizobium* in Minnesota. *Field Crops Research*, 74: 107–15.
- Fesel, P. H., Zuccaro, A. 2016. β -glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. *Fungal Genetics and Biology*, 90: 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.12.004>
- Garrido-Jurado, I., Torrent, J., Barrón, V., Corpas, A., Quesada-Moraga, E. 2011. Soil properties affect the availability, movement, and virulence of entomopathogenic fungi conidia against puparia of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Biol Control*, 58: 277–285
- Gordon, Thomas R. 2017. *Fusarium oxysporum* and the *Fusarium* wilt syndrome. *Annu.Rev. Phytopathol.* 55: 23-39.
- Guacaneme, A. 2010. Biocontrol de *Fusarium oxysporum* y promoción de crecimiento por rizobacterias en plantas de uchuva (*Physalis peruviana*). Trabajo de Pregrado. Microbiología, Universidad de los Andes. Bogotá. 11 p
- Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., Fischer, E., Dinooor, A. 2002. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. *Phytopathology*, 92: 976–985. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.9.976>
- Guetsky, R., D. Shtienberg, a. Dinooor, and Y. Elad. 2002. Establishment, Survival and Activity of the Biocontrol Agents *Pichia guilliermondii* and *Bacillus mycoides* Applied as a Mixture on Strawberry Plants. *Biocontrol Science and Technology*, 1: 705–14.
- Guleria, S., Abhishek, W., Anjali, C., Shirkot, C.K. 2016. Molecular Characterization of Alkaline Protease of *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 Involved in Biocontrol of *Fusarium Oxysporum*. *International Journal of Food Microbiology*, 232: 134–43.
- Han, J., Shim, H., Shin, J., Kim, K. S. 2015. Antagonistic activities of *Bacillus* spp . strains isolated from tidal flat sediment towards anthracnose pathogens *Colletotrichum acutatum* and *C . gloeosporioides* in South Korea. *The Plant Pathology Journal*, 31: 165–175. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.03.2015.0036165-175>. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.03.2015.0036>
- Harman, Gary E. 2000. Myths and Dogmans of Biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, 84: 377–93.
- Hervás, A., B. Landa, L. E. Datnoff, and R. M. Jiménez-Díaz. 1998. Effects of commercial and indigenous microorganisms on *Fusarium* wilt development in Chickpea. *Biological Control*, 13: 166–76.
- Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R., Peterson, S. B. 2010. Jungle. *National Review*

- of Microbiology*, 8: 15–25. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2259>. Bacterial
- Hildebrand, D C. Schroth, M.N., Sands, D.C., 1992. *Pseudomonas*. In: Schaad, N.W. (Ed.), *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 2° ed. International Book Distributing Co., Lucknow, India, pp. 60–80.
- Hjeljord, L G, Stensvand, A., Tronsmo, A. 2001. Antagonism of Nutrient-Activated Conidia of *Trichoderma harzianum* (atroviride) P1 Against *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 91: 1172–80.
- Hoyos-Carvajal, L., Orduz, S., & Bissett, J. 2009. Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. *Fungal Genetics and Biology*, 46: 615–631. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.04.006>
- Huang, C. C., Lindhout, P. 1997. Screening for resistance in wild *Lycopersicon* species to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1 and race 2. *Euphytica*, 93: 145–153. <https://doi.org/10.1023/A:1002943805229>
- Huang, C. H., Roberts, P. D., Datnoff, L. E. 2011. Silicon suppresses *Fusarium* crown and root rot of tomato. *Journal of Phytopathology*, 159: 546–554. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2011.01803.x>
- Huisman, O C. 1982. Interrelations of root growth dynamics to epidemiology of root-invading fungi. *Annual Review of Phytopathology* 20: 303–27. <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.py.20.090182.001511>.
- Jackson, C. R., Tyler, H. L., Millar, J. J. 2013. Determination of microbial extracellular enzyme activity in waters, soils, and sediments using high throughput microplate assays. *Journal of Visualized Experiments*, 80: 1–9. <https://doi.org/10.3791/50399>
- Jain, A., Singh, A., Singh, S., Singh, H. B. 2015. Biological management of *Sclerotinia sclerotiorum* in pea using plant growth promoting microbial consortium. *Journal of Basic Microbiology*, 55: 961–972. <https://doi.org/10.1002/jobm.201400628>
- Jain, A., Singh, S., Kumar Sarma, B., Bahadur Singh, H. 2012. Microbial consortium-mediated reprogramming of defence network in pea to enhance tolerance against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Applied Microbiology*, 112: 537–550. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05220.x>
- Jogaiah, S., Abdelrahman, M., Tran, L. S. P., Ito, S. I. 2018. Different mechanisms of *Trichoderma virens*-mediated resistance in tomato against *Fusarium* wilt involve the jasmonic and salicylic acid pathways. *Molecular Plant Pathology*, 19: 870–882. <https://doi.org/10.1111/mpp.12571>
- Jones, J.P., Woltz, S.S., Scott, J.W., 1991. *Fusarium* crown rot of tomato: some factors affecting disease development. In: Vavrina, C.S. (Ed.), *Fla. Tom. Instit. Proc., Vegetable Crops Special Series, SS HOS 1 University of Florida-IFAS*, pp. 74e79. In: http://swfrec.ifas.ufl.edu/docs/pdf/veghort/tomatoinstitute/proceedings/ti91_proceedings.pdf
- Jhonson, K. 1994. Dose-response relationships and inundative biological control. *Phytopathology*, 84: 780 - 784.

- Khan, N., MARTINEZ-Hidalgo, P., Ice, T., Maymon, M., Humm, E.A., Nejat, N., Sanders, E.R., Kaplan, D., Hirsch, A. M. 2018. Antifungal activity of *Bacillus* species against *Fusarium* and analysis of the potential mechanisms used in biocontrol, 9: 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02363>
- Kipngeno, P., Losenge, T., Maina, N., Kahangi, E., Juma, P. 2015. Efficacy of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma asperellum* against *Pythium aphanidermatum* in tomatoes. *Biological Control*, 90: 92–95. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.05.017>
- Kloepper, J. W., Ryu, C., Zhang, S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94: 1259–1266.
- Larkin, R., Fravel, D.R., 1998. Biological control of fusarium wilt diseases by nonpathogenic *Fusarium* spp.: formulations and field efficacy. In: Proceedings of the 1998 Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions, pp. 101-1e101-2. <http://www.mbao.org/>
- Larkin, R. P., Fravel, D. R. 1999. Mechanisms of action and dose response relationships governing biological control of Fusarium wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium* spp. *Phytopathology* 89:1152-1161.
- Lazarovits, G., A. Turnbull, D. Johnston-Monje. 2014. Encyclopedia of agriculture and food systems *Plant Health Management: Biological Control of Plant Pathogens*. Elsevier Ltd. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-52512-3.00177-7>.
- Levy, Y., Benderly, M., Cohen, Y., Gisi, U., Bassand, D. 1986. The joint action of fungicides in mixtures; comparison of two methods for synergy calculation. *EPPO Bull.* 16:651-657.
- Li, L., Ma, J., Li, Y., Wang, Z., Gao, T., Wang, Q. 2012. Screening and partial characterization of *Bacillus* with potential applications in biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt. *Crop Protection* 35: 29 – 35.
- Lu, Z., Tombolini, R., Woo, S., Lorito, M., Jansson, J. K., Zeilinger, S. 2004. *In vivo* study of *Trichoderma* -Pathogen-Plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 3073–3081. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.5.3073>
- Lugtenberg, B., Kamilova, F. 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63: 541–56. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>.
- Loganathan., G., Venkataravanappa, R., Saha., V., Rai, A. 2014. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) induces resistance against *Fusarium* wilt and improves lycopene content and texture in tomato. *African Journal of Microbiology Research*, 8: 1105–1111. <http://academicjournals.org/journal/AJMR/article-abstract/C2911FB45367>.
- Mathivanan, N., Prabavathy, V. R, Vijayanandraj. V. R. 2005. Application of talc formulations of *Pseudomonas fluorescens migula* and *Trichoderma viride* Pers. Ex S.F. gray decrease the sheath blight disease and enhance the plant growth and yield

- in rice. *Journal of Phytopathology*, 153: 697–701.
- McGovern, R.J. 2015. Management of tomato diseases caused by *Fusarium Oxysporum*. *Crop Protection*, 73: 78–92. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S026121941500071X> (February 3, 2016).
- Menzies, J. G., Jarvis. W.R. 1994. The infestation of tomato seed by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Plant Pathology*, 43: 378–386.
- Micallef, S. A., Channer, S., Shiaris, M. P., Colón, A., Micallef, S. A., Channer, S., Colón-carmona, A. 2009. Plant age and genotype impact the progression of bacterial community succession in the *Arabidopsis* rhizosphere. *Plant signaling & behavior*, 4: 777–780. <https://doi.org/10.4161/psb.4.8.9229>
- Michielse, C.B., Rep, M. 2009. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, 10: 311–324.
- Mihuta-Grimm, L., Erb, W. A., Rowe, R. C. 1990. *Fusarium* crown and root rot of tomato in greenhouse rock wool systems: sources of inoculum and disease management with benomyl. *Plant Disease*, 74: 996–1002.
- Mitchell, C.P., Dix, N.J. 1975. Growth and Germination of *Trichoderma* spp. under the Influence of Soil Fungistasis. *Transactions of the British Mycological Society*, 64: 235–241. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0007153675801082>
- Mohammad, A., Hadi, G., Masoud, A. 2011. Evaluation of different combinations of *Trichoderma* species for controlling *Fusarium* rot of lentil. *African Journal of Biotechnology*, 10: 2653–2658. <https://doi.org/10.5897/AJB10.1274>
- Momma, N., Kobara, Y., Uematsu, S., Kita, N., Shinmura, A. 2013. Development of biological soil disinfections in Japan. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97: 3801–3809. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4826-9>
- Moreno, C. A., Castillo, F. , González, A., Bernal, D., Jaimes, Y., Chaparro, M., González, C., Rodríguez, F., Restrepo, S., Cotes, A. M. 2009. Biological and Molecular Characterization of the Response of Tomato Plants Treated with *Trichoderma koningiopsis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74: 111–20.
- Moreno, C. A. 2003. Control biológico de enfermedades foliares del cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum*) con énfasis en mildew polvoso (*Oidium* sp.). Trabajo de grado. Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Colombia. 106 p.
- Moreno-Velandia, C.A., Beltrán, C., Cotes, A.M. 2007. Pruebas de eficacia de prototipos de bioplaguicida a base de *Trichoderma koningii* en el cultivo de tomate bajo invernadero. En: Informe técnico final del proyecto de investigación: Optimización tecnológica y evaluación de bioplaguicidas a base de *Trichoderma koningii* para el control de enfermedades en cultivos de tomate bajo invernadero
- Moreno, C.A. 2017. Interactions between *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006, *Fusarium oxysporum* Map5 and Cape gooseberry (*Physalis peruviana*). Tesis Doctoral en Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 178 p

- Moreno-Velandia, C.A., Izquierdo-García, L.F., Ongena, M., Kloepper, J. W., Cotes, A. M. 2018. Soil sterilization , pathogen and antagonist concentration affect biological control of Fusarium wilt of cape gooseberry by *Bacillus velezensis* Bs006. *Plant Soil*, <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3866-4>
- Mukherjee PK, Wiest A, Ruiz N, Keightley A, Moran-Diez ME, et al. 2011. Two classes of new peptidobolins are synthesized by a single non-ribosomal peptide synthetase of *Trichoderma virens*. *J. Biol. Chem.* 286:4544–54
- Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Herrera-Estrella, A., Schmoll, M., & Kenerley, C. M. (2013). *Trichoderma* Research in the Genome Era. *Annual Review of Phytopathology*, 51(1), 105–129. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102353>
- Myresiotis, C. K., Karaoglanidis, G. S., Vryzas, Z., Papadopoulou-Mourkidou, E. 2012. Evaluation of plant-growth-promoting rhizobacteria, acibenzolar-S-methyl and hymexazol for integrated control of *Fusarium* crown and root rot on tomato. *Pest Management Science*, 68: 404–411. <https://doi.org/10.1002/ps.2277>
- Nihorimbere, V., Cawoy, H., Seyer, A., Brunelle, A., Thonart, P., Ongena, M. 2012. Impact of rhizosphere factors on cyclic lipopeptide signature from the plant beneficial strain *Bacillus amyloliquefaciens* S499. *FEMS Microbiology Ecology*, 79: 176–191. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01208.x>
- O'Brien, P. A. 2017. Biological control of plant diseases. *Australasian Plant Pathology*, 46: 293–304. <https://doi.org/10.1007/s13313-017-0481-4>
- Ongena, M., Jacques, P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16: 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- O'Toole, George A. 2011. Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of Visualized Experiments*, 47: 10–11. <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=2437>.
- Paerl, H. W., Pinckney, J.L. 1996. A mini-review of microbial consortia: their roles in aquatic production and biogeochemical cycling. *Microbial Ecology*, 31: 225–247.
- Palmieri, D., Vitullo, D., De Curtis, F., Lima, G. 2017. A microbial consortium in the rhizosphere as a new biocontrol approach against *Fusarium* decline of chickpea. *Plant and Soil*, 412: 425–439. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-3080-1>
- Parikh, L., Eskelson, M. J., Adesemoye, A. O. 2018. Relationship of in vitro and in planta screening: improving the selection process for biological control agents against *Fusarium* root rot in row crops. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 51: 156–169. <https://doi.org/10.1080/03235408.2018.1441098>
- Peeters, E., Nelis, H. J., Coenye, T. 2008. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods*, 72: 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.11.010>
- Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M.,

- Bakker, P. A. H. M. 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52: 347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Polyanskaya, L. M., Tolstikhina, T. E., Kochkina, G. A., Ivanushkina, N. E., Ozerskaya, S. M., Vedina, O. T., Zvyagintsev, D. G. 2004. Autoregulation of conidium germination in micromycetes of the genus *Trichoderma*. *Microbiology*, 73: 79–83. <https://doi.org/10.1023/B:MIC1.0000016373.96469.5a>
- Pontón, J. 2008. The fungal cell wall and the mechanism of action of anidulafungin. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25: 78–82. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(08\)70024-X](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(08)70024-X)
- Ramada, M. H. S., Lopes, F. Á. C., Ulhoa, C. J., Silva, R. 2010. Optimized microplate β -1,3-glucanase assay system for *Trichoderma* spp. screening. *Journal of Microbiological Methods*, 81: 6–10. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.01.010>
- Ramyabharathi, S. A., Thiruvengadam, R. 2014. Mode of action of *Bacillus subtilis* EPCO16 against tomato *Fusarium* wilt. *Biochem. Cell. Arch.*, 14: 47-50.
- Raupach, G S, Kloepper, J.W. 1998. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology*, 88: 1158–64.
- Rodríguez, E. 2010. Aislamiento y caracterización de cepas de *Fusarium oxysporum* en uchuva (*Physalis peruviana*) y evaluación de la patogenicidad en invernadero. Trabajo de pregrado, Ingeniería Agronómica. Universidad de Cundinamarca. Fusagasugá. 73p.
- Rodríguez, E. 2013. Caracterización de aislamientos de *Fusarium* spp. obtenidos de zonas productoras de uchuva (*Physalis peruviana*) en Cundinamarca y Boyacá. Trabajo de Maestría, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 120 p.
- Sahai, S., Manocha, M.S. (1993). Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiology reviews*. 11, 317–338.
- Sanogo, S., Pomella, A., Hebbar, P. K., Bailey, B., Costa, J. C. B., Samuels, G. J., & Lumsden, R. D. (2002). Production and Germination of Conidia of *Trichoderma stromaticum*, a Mycoparasite of *Crinipellis pernicioso* on Cacao.
- Santos, B. M., Gilreath, J. P., Motis, T. N., Noling, J. W., Jones, J. P., Norton, J. A. 2006. Comparing methyl bromide alternatives for soilborne disease, nematode and weed management in fresh market tomato. *Crop Protection*, 25: 690–695. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.09.015>
- Saravanakumar, K., Yu, C., Dou, K., Wang, M., Li, Y., Chen, J. 2016. Synergistic effect of *Trichoderma*-derived antifungal metabolites and cell wall degrading enzymes on

- enhanced biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Biological Control*, 94: 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.12.001>
- Sarma, B. K., Yadav, S. K., Singh, S., Singh, H. B. 2015. Microbial consortium-mediated plant defense against phytopathogens: Readdressing for enhancing efficacy. *Soil Biology and Biochemistry*, 87: 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.04.001>
- Schoffemeer, E. A., Klis, F. M., Sietsma, J. H., Cornelissen, B. J. 1999. The cell wall of *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genetics and Biology*. 27: 275–282. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1999.1153>
- Sharma, P. (2011). Complexity of *Trichoderma*-*Fusarium* interaction and manifestation of biological control. *Australian Journal of Crop Science*, 5(8), 1027–1038.
- Silva, A.D .2018. Acción in vitro de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. como controladores biológicos conjuntos contra *Fusarium oxysporum* en uvilla (*Physalis peruviana*), ecotipo colombiano, en la sierra norte y centro del Ecuador. Trabajo de grado Microbiología. Universidad Católica de Ecuador. Quito. 112 p
- Simbaqueba, J., Catanzariti, A. M., González, C., Jones, D. A. 2018. Evidence for horizontal gene transfer and separation of effector recognition from effector function revealed by analysis of effector genes shared between cape gooseberry- and tomato-infecting formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, 19: 2302–2318. <https://doi.org/10.1111/mpp.12700>
- Singh, A., Mehta, S., Singh, H. B., Nautiyal, C. S. 2003. Biocontrol of collar rot disease of betelvine (*Piper betle* L.) caused by *Sclerotium rolfsii* by using rhizosphere-competent *Pseudomonas fluorescens* NBRI-N6 and *P. fluorescens* NBRI-N. *Current Microbiology*, 47: 153–158. <https://doi.org/10.1007/s00284-002-3938-8>
- Sivan, A., Chet, I. 1989. Cell Wall Composition of *Fusarium*. *Soil Biology and Biochemistry*, 21: 869–71.
- Sokol, P. A., Ohman, D. E. and Iglewski, B. H. 1979. A more sensitive plate assay for detection of protease production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* 9:538.
- Spence, C., Alff, E., Johnson, C., Ramos, C., Donofrio, N., Sundaresan, V., Bais, H. 2014. Natural rice rhizospheric microbes suppress rice blast infections. *BMC Plant Biology*, 14: 130-147 <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-130>
- Sundaramoorthy, S., Raguchander, T., Ragupathi, N., Samiyappan, R. 2011. Combinatorial effect of endophytic and plant growth promoting rhizobacteria against wilt disease of *Capsicum annum* L. caused by *Fusarium solani*. *Biological Control*, 60: 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.10.002>
- Sylla, J., Alsanius, B. W., Krüger, E., Becker, D., Wohanka, W. 2013. In vitro compatibility of microbial agents for simultaneous application to control strawberry powdery mildew (*Podosphaera aphanis*). *Crop Protection*, 51: 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.04.011>

- Takken, F., Rep, M. 2010. The Arms Race between Tomato and *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology* 11: 309–14.
- Teather, R., Wood, P.J. 1982. Applied and environmental microbiology Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 777-780
- Triveni, S., Prasanna, R., Saxena, A. K. 2012. Optimization of conditions for *in vitro* development of *Trichoderma viride*-based biofilms as potential inoculants. *Folia Microbiologica*, 57: 431–437. <https://doi.org/10.1007/s12223-012-0154-1>
- Torres, E.L. 2013. Determinación del efecto de *Pseudomonas migulae* Pf014 y *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006 aplicadas de forma individual y en mezclas, sobre la promoción de crecimiento y el control de *Fusarium oxysporum* en uchuva (*Physalis peruviana*). Trabajo de Maestría en Biotecnología. Universidad de Córdoba, Montería. 189 p
- Vestberg, M., Kukkonen, S., Saari, K., Parikka, P., Huttunen, J., Tainio, L., Gianinazzi, S. 2004. Microbial inoculation for improving the growth and health of micropropagated strawberry. *Applied Soil Ecology*, 27: 243–258. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2004.05.006>
- Vinale, F., Sivasithampam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., Lorito, M. 2008. Trichoderma–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.002>
- Warmink, J. A., Van Elsas, J.D. 2009. Migratory response of soil bacteria to *Lyophyllum* sp. strain karsten in soil microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 2820–30.
- Warmink, J. A., Nazir, R., Corten, B., Van Elsas, J. D. 2011. Hitchhikers on the fungal highway: The helper effect for bacterial migration via fungal hyphae. *Soil Biology and Biochemistry*, 43: 760–765. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.12.009>
- Weller, DM. 1988. The Rhizosphere with Bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 26: 379–407.
- Ximenes, E., Kim, Y., Mosier, N., Dien, B., Ladisch, M. 2011. Deactivation of cellulases by phenols. *Enzyme and Microbial Technology*, 48: 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.09.006>
- Xu, X., Jeffries, P., Pautasso, M., Jeger, M. J. 2011. Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice. *Phytopathology*, 101: 1024–31.
- Yang, R., Fan, X., Cai, X., Hu, F. 2015. The inhibitory mechanisms by mixtures of two endophytic bacterial strains isolated from *Ginkgo biloba* against pepper *Phytophthora* blight. *Biological Control*, 85: 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.09.013>
- Yobo, K.S. 2005. Biological control and plant growth promotion by selected *Trichoderma* and *Bacillus* species. Tesis doctoral en fitopatología. Universidad KwaZulu-Natal. Pietermaritzburg. 205 p.
- Zhang. S.M. 2012. Isolation and Characterization of Antifungal Lipopeptides Produced by

Endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* TF28. *African Journal of Microbiology Research*, 6: 1747–55.

[http://www.academicjournals.org/AJMR/abstracts/abstracts/abstract/2012/29Feb/Zhang et al.htm](http://www.academicjournals.org/AJMR/abstracts/abstracts/abstract/2012/29Feb/Zhang%20et%20al.htm).

Zhang, S. 2018. Minireview interkingdom microbial consortia mechanisms to guide biotechnological applications. *Microb Biotechnol.* 11: 833-847

6. Anexos

Anexo 1. Composición de medios de cultivo empleados

<u>Medio exudados (SEU)</u>	1000 mL
• Solución SSSEU	1000 mL
• Agar bacteriológico	20 g
• pH	5,3

Ajustar el pH después de adicionar el agar

<u>Medio exudados y extracto de suelo (SEU+suelo)</u>	1000 mL
• Solución SSSEU	1000 mL
• Suelo	500 g
• Agar bacteriológico	20 g
• pH	5,3

Adicionar 500 g de suelo a 1000 mL de solución SSSEU agitar durante una hora a 200 rpm a temperatura ambiente, filtrar por muselina (poro 0,5 mm) completar el volumen con agua destilada adicionar agar y ajustar el pH a 5.3

<u>Medio M63</u> (O'Toole, 2017)	1000 mL
• KH_2PO_4	3g
• K_2HPO_4	6g
• $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2g
• MgSO_4	1mM
• Glucosa	2g

<u>Medio quitinasa</u> (Agrawal y Kotasthane, 2012)	1000 mL
• Quitina coloidal	4.5 g
• MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3 g
• (NH ₄) SO ₄	3 g
• KH ₂ PO ₄	2 g
• Ácido cítrico monohidratado	1 g
• Agar	18 g
• Púrpura de bromocresol	0,15 g
• Tween 80	200 µL
• Agua	1000mL
• pH	5,3

Ajustar el pH después de adicionar el agar

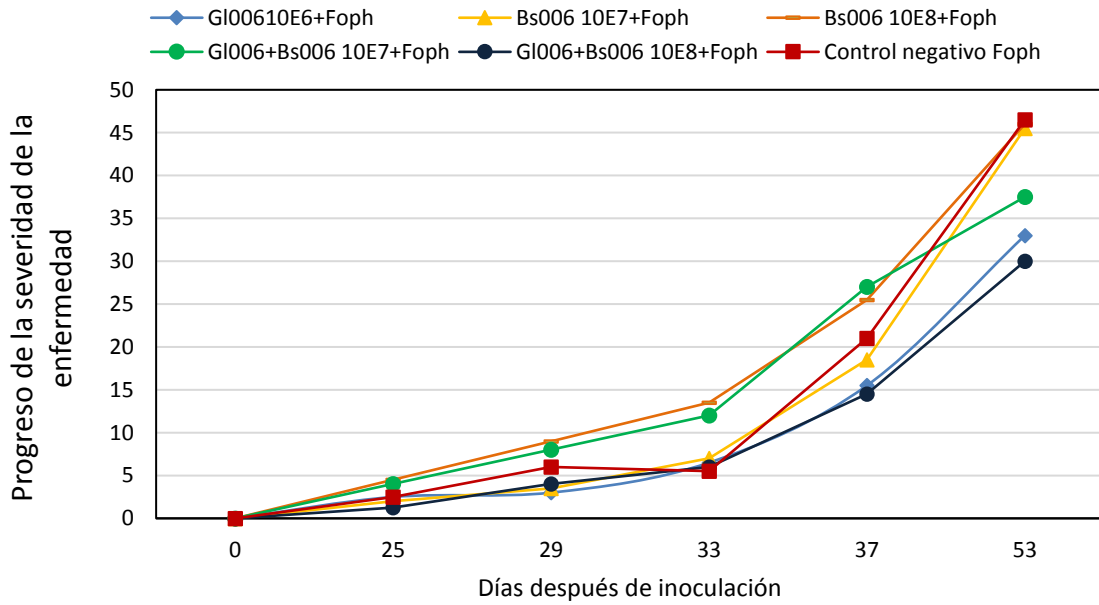
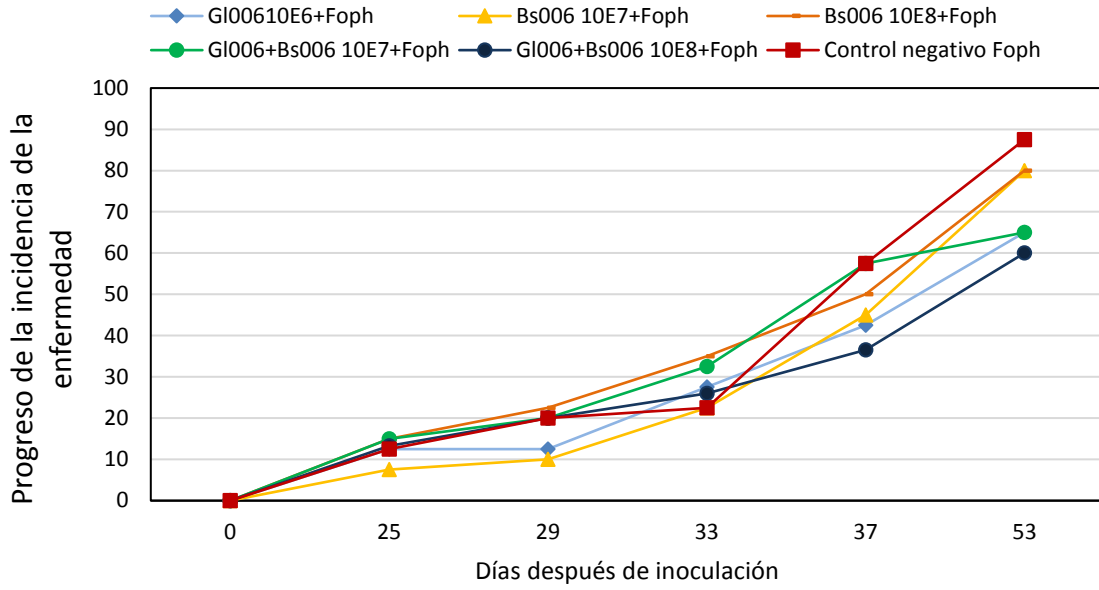
<u>Medio CMC agar</u>	1000 mL
(Teather y Wood, 1982 - modificado)	
• KH ₂ PO ₄	1.0 g
• MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
• NaCl	0.5 g
• FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g
• MnSO ₄ ·H ₂ O	0.01 g
• NH ₄ NO ₃	0.3 g
• Carboximetilcelulosa	10 g
• Agar bacteriológico	18 g
• Agua	1000mL
pH	5,3

Ajustar el pH después de adicionar el agar

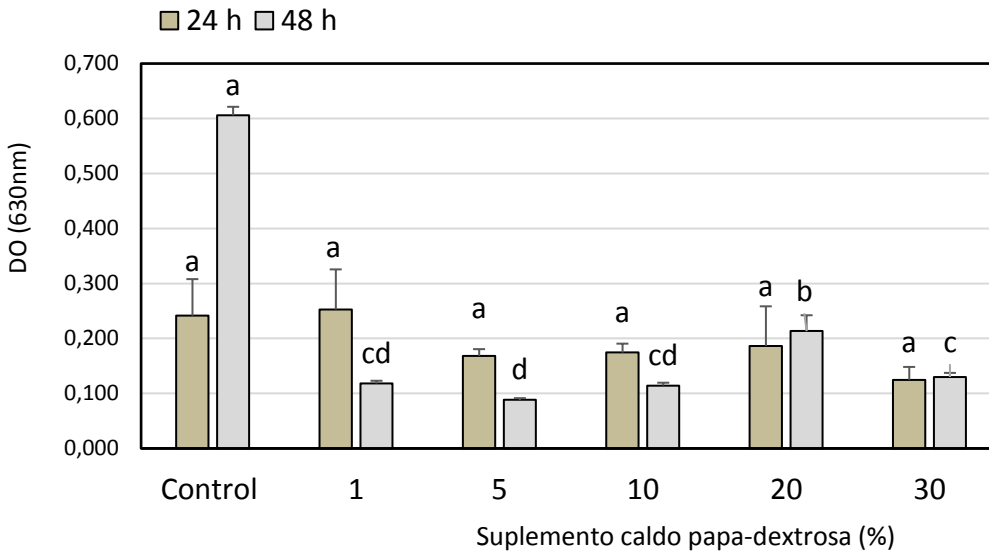
Anexo 2. Información de cepas de agentes de control biológico empleadas en consorcios

Cepa	Identificación	Colección	Procedencia	Aislado
GI006	<i>Trichoderma virens</i>	Colección de trabajo de AGROSAVIA	Leticia-Sabalillo, Amazonas, Colombia	Suelo
Bs006	<i>Bacillus velezensis</i> (anteriormente, <i>B. amyloliquefaciens</i>)	Colección de trabajo de AGROSAVIA	Granada, Cundinamarca	Rizósfera de cultivo de uchuva

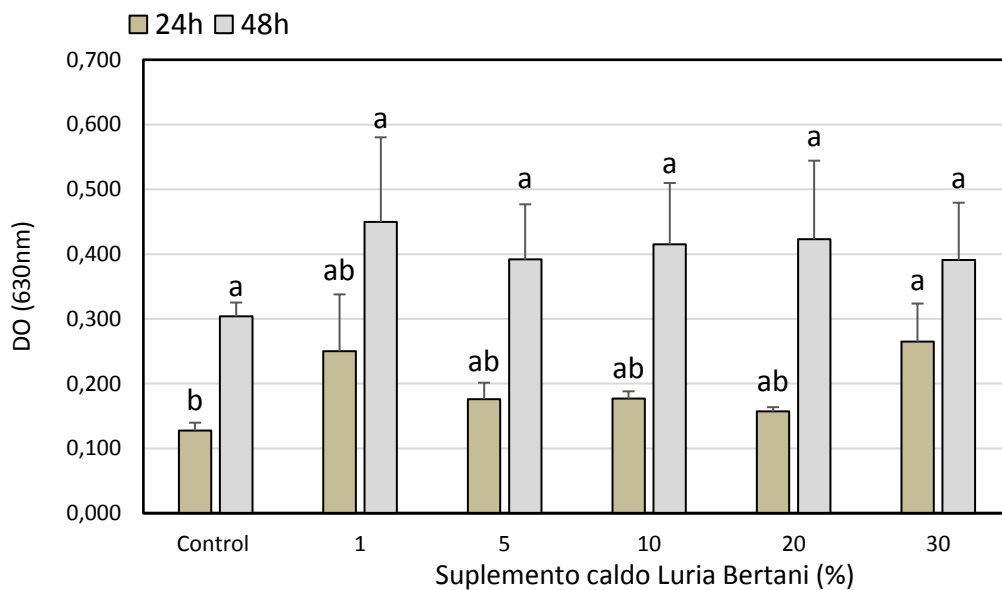
Anexo 3. Curvas de progreso de la enfermedad bajo invernadero en concentración



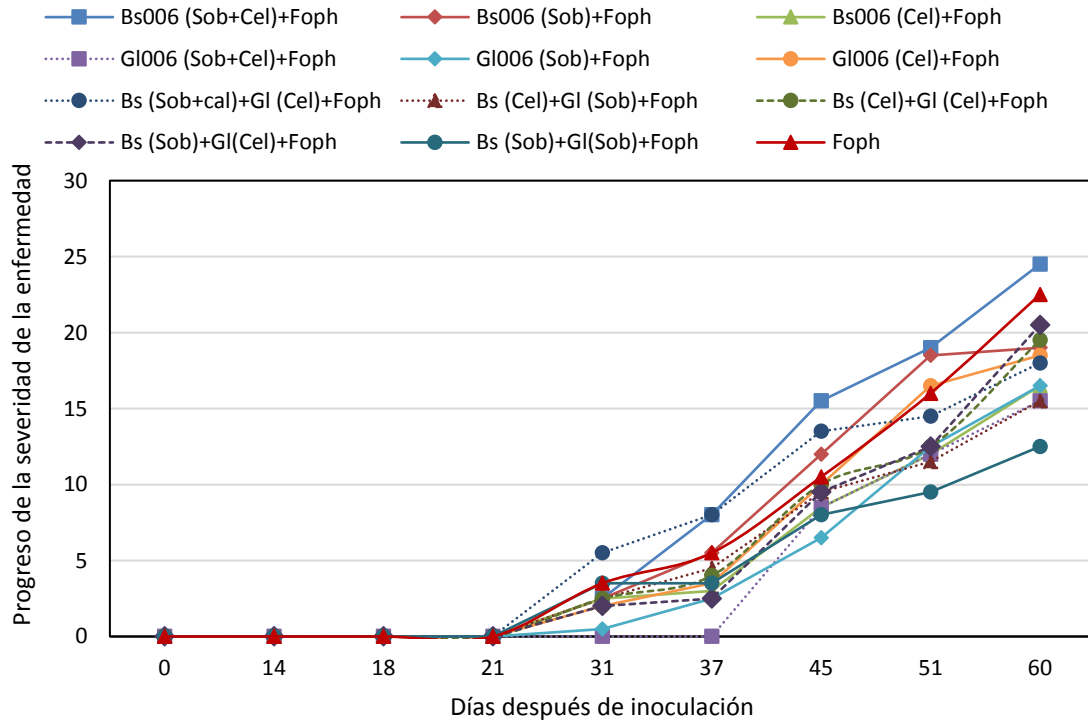
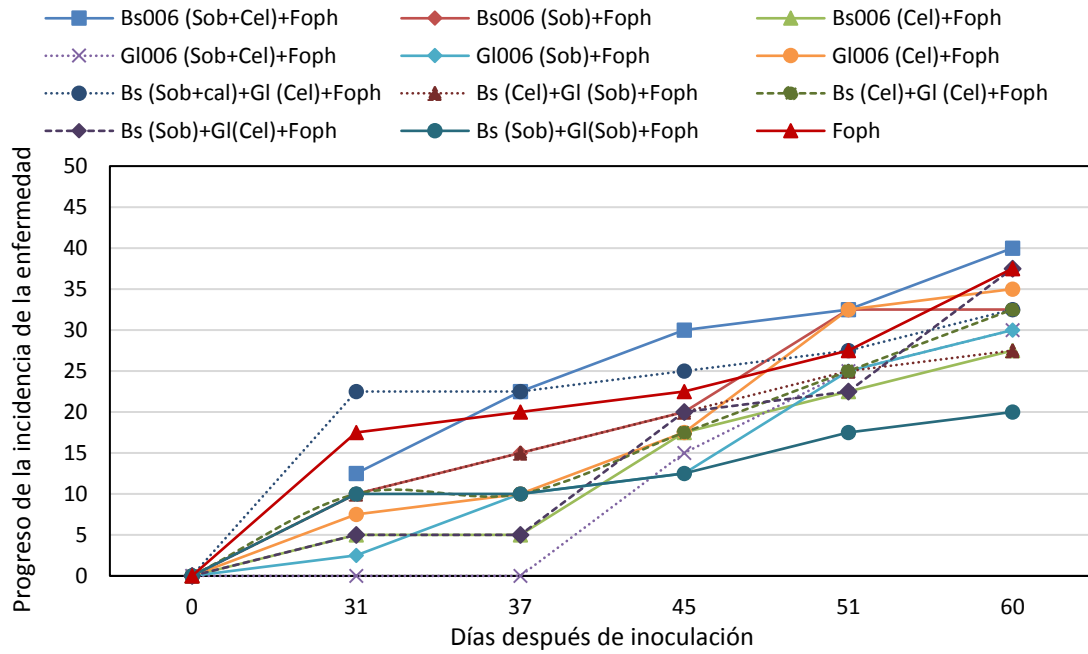
Anexo 4. Efecto de suplemento de caldos de cultivo sobre el crecimiento de *B. velezensis* Bs006



Anexo 5. Efecto de suplemento de caldos de cultivo sobre el crecimiento de *T. virens* GI006



Anexo 6. Curvas de progreso de la enfermedad bajo invernadero en interacción caldos y células



Anexo 7. Curvas de progreso de la enfermedad bajo invernadero experimento de raíces divididas

