

	GESTIÓN DE RECURSOS Y SERVICIOS BIBLIOTECARIOS	Código	FO-SB- 12/v0
	ESQUEMA HOJA DE RESUMEN	Página	1/1

RESUMEN TRABAJO DE GRADO

AUTOR(ES):

NOMBRE(S): CAROLINA APELLIDOS: ORTIZ ORTIZ

NOMBRE(S): PAULA ANDREINA APELLIDOS: SUAREZ MARTINEZ

FACULTAD: CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

DIRECTOR:

NOMBRE(S): DIANA MARÍA APELLIDOS: CÁRDENAS CARO

CODIRECTOR:

NOMBRE(S): _____ APELLIDOS: _____

TÍTULO DEL TRABAJO (TESIS): INTERACCIÓN DE CEPAS DE RIZOBACTERIAS Y *Trichoderma asperellum* EN LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE ARROZ (*Oryza sativa L.*)

RESUMEN

El objetivo fue evaluar la interacción entre consorcios de rizobacterias y *Trichoderma spp.* en la promoción del crecimiento de plantas de arroz (*Oryza sativa L.*) con el fin de encontrar el más eficiente. Se realizaron pruebas de antagonismo entre las cepas y se formaron consorcios probando todas las combinaciones posibles en las concentraciones, 10^8 UFC/mL. Se realizaron evaluaciones cualitativas y cuantitativas de la co-inoculación, y se prepararon los bioinoculantes con 11 combinaciones diferentes evaluando plantas de arroz (*Oryza sativa L.*) a escala de laboratorio, utilizando un diseño estadístico completamente al azar con 16 tratamientos y 5 réplicas: que incluían Tratamiento (testigo) fertilización química (DAP + Urea), 11 Tratamientos inoculados con los consorcios de microorganismos seleccionados. Se evaluaron las variables número de hojas, área foliar, longitud de la planta, longitud de la raíz y peso seco foliar y radical de todas las plantas. Los resultados de la prueba de antagonismo *in vitro* indicaron que entre las cepas de rizobacterias no presentaron antagonismo entre ellas, pero si se observó variabilidad del nivel de antagonismo de las cepas de la misma especie de rizobacterias contra las cinco cepas de *Trichoderma spp.*, por lo tanto se formaron los consorcios con las cepas que presentaron el menor nivel de inhibición, los tratamientos co-inoculados mostraron mayor eficiencia respecto al tratamiento testigo destacándose el tratamiento en donde se inocularon las cuatro cepas (*Ta* HF015 + *P.putida* RZA027 + *Bv* EU45 + *Ab* RZP064) que registró efectos significativos en las plantas evidenciando un incrementando en todas las variables evaluadas, indicando mayor beneficio en comparación con el testigo.

PALABRAS CLAVE: rizobacterias, plantas de arroz, cepas.

CARACTERÍSTICAS:

PÁGINAS: 92 PLANOS: ILUSTRACIONES: CD ROOM: 1 _____

Elaboró		Revisó		Aprobó	
Equipo Operativo del Proceso		Comité de Calidad		Comité de Calidad	
Fecha	24/10/2014	Fecha	05/12/2014	Fecha	05/12/2014

COPIA NO CONTROLADA

INTERACCIÓN DE CEPAS DE RIZOBACTERIAS Y *Trichoderma asperellum* EN LA
PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)

CAROLINA ORTIZ ORTIZ

PAULA ANDREINA SUAREZ MARTINEZ

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA
SAN JOSÉ DE CÚCUTA

2020

INTERACCIÓN DE CEPAS DE RIZOBACTERIAS Y *Trichoderma asperellum* PARA LA
PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE ARROZ (*Oryza sativa L.*)

CAROLINA ORTIZ ORTIZ

PAULA ANDREINA SUAREZ MARTINEZ

Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de:

Ingeniero Biotecnológico

Director:

DIANA MARÍA CÁRDENAS CARO

Ingeniera de Producción Biotecnológica

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA
SAN JOSÉ DE CÚCUTA

2020

ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO

FECHA: 14 FEBRERO DE 2020

HORA: 10:00 A.M.

LUGAR: CREAD SALA 3

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

TITULO: "INTERACCIÓN DE CEPAS DE RIZOBACTERIAS Y *Trichoderma asperellum* PARA LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE ARROZ (*oryza sativa* L)."

MODALIDAD: INVESTIGACIÓN

JURADO: LILIAN TRINIDAD RAMIREZ CAICEDO
ALINA KATIL SIGARROA RIECHE
JUAN CARLOS RAMIREZ BERMUDEZ

ENTIDAD: UFPS

DIRECTOR: DIANA MARIA CARDENAS CARO

NOMBRE DE LOS ESTUDIANTE	CODIGO	CALIFICACION
Carolina Ortiz Ortiz	1610909	4.3
Paula Andreina Suarez Martínez	1610931	4.3

OBSERVACIONES: APROBADO.

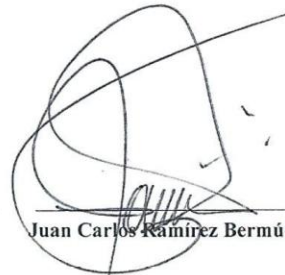
FIRMA DE LOS JURADOS



Lilian Trinidad Ramirez Caicedo

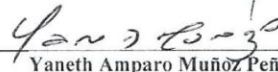


Alina Katil Sigarroa Rieche



Juan Carlos Ramirez Bermudez

Vo. Bo Coordinador Comité Curricular



Yaneth Amparo Muñoz Peñaloza



**CARTA DE AUTORIZACIÓN DE LOS AUTORES PARA
LA CONSULTA, LA REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y LA PUBLICACIÓN
ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO**

Cúcuta, 21 de mayo de 2020

Señores
BIBLIOTECA EDUARDO COTE LAMUS
Ciudad

Cordial saludo:

Yo Carolina Ortiz Ortiz, identificado con la C.C. N° 1010111367, autor de la tesis y/o trabajo de grado titulado INTERACCIÓN DE CEPAS DE RIZOBACTERIAS Y *Trichoderma asperellum* EN LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) presentado y aprobado en el año 2020 como requisito para optar al título de Ingeniero Biotecnológico; autorizo a la biblioteca de la Universidad Francisco de Paula Santander, Eduardo Cote Lamus, para que con fines académicos, muestre a la comunidad en general a la producción intelectual de esta institución educativa, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo de grado en la página web de la Biblioteca Eduardo Cote Lamus y en las redes de información del país y el exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad Francisco de Paula Santander.
- Permita la consulta, la reproducción, a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato CD-ROM o digital desde Internet, Intranet etc.; y en general para cualquier formato conocido o por conocer.

Lo anterior, de conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la ley 1982 y el artículo 11 de la decisión andina 351 de 1993, que establece que **“los derechos morales del trabajo son propiedad de los autores”**, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.


1010111367
FIRMA Y CEDULA



**CARTA DE AUTORIZACIÓN DE LOS AUTORES PARA
LA CONSULTA, LA REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y LA PUBLICACIÓN
ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO**

Cúcuta, 20 de mayo de 2020

Señores
BIBLIOTECA EDUARDO COTE LAMUS
Ciudad

Cordial saludo:

Yo Paula Andreina Suarez Martínez, identificado con la C.C. N° 1090484175, autor de la tesis y/o trabajo de grado titulado INTERACCIÓN DE CEPAS DE RIZOBACTERIAS Y *Trichoderma asperellum* EN LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) presentado y aprobado en el año 2020 como requisito para optar al título de Ingeniero Biotecnológico; autorizo a la biblioteca de la Universidad Francisco de Paula Santander, Eduardo Cote Lamus, para que con fines académicos, muestre a la comunidad en general a la producción intelectual de esta institución educativa, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo de grado en la página web de la Biblioteca Eduardo Cote Lamus y en las redes de información del país y el exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad Francisco de Paula Santander.
- Permita la consulta, la reproducción, a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato CD-ROM o digital desde Internet, Intranet etc.; y en general para cualquier formato conocido o por conocer.

Lo anterior, de conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la ley 1982 y el artículo 11 de la decisión andina 351 de 1993, que establece que “**los derechos morales del trabajo son propiedad de los autores**”, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

Paula Suárez f 1.090.484.175.
FIRMA Y CEDULA

Dedicatoria

Primeramente, a DIOS mi padre celestial, que me acompaña y siempre me levanta de mi continuo tropiezo, me ha dirigido por el sendero correcto, eres quien guía el destino de mi vida al creador de mis padres y de las personas que más amo.

A mis padres Armando Suarez Bohada y Myriam Yaneth Martínez por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad, muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este, por su completo apoyo en mi formación personal y profesional, gracias por ser mi principal motivación los amo con toda mi alma.

A cada uno de mis HERMANOS; Gabriel, Mónica, Astrid y Christian por cada aporte que dan en este proceso, por ser mí ejemplo a seguir y creer siempre en mí. A mis SOBRINOS gracias por brindarme tanta felicidad y estar siempre juntos, me siento infinitamente orgullosa de ser su TIA, los amo.

A la Msc. Diana María Cárdenas Caro, quien se tomó el trabajo de transmitirme sus conocimientos, por sus consejos y motivación constante, por haberme guiado paso a paso en el aprendizaje y enseñarme grandes valores que me ayudaron a crecer como persona.

A Paula Quimbayo, por la gran compañía que ha sido, y sobre todo el gran apoyo agregado a lo que soy.

También a mis compañeras y amigas Carolina Ortiz y Laurita Valderrama, por su infinita paciencia las quiero mucho, muchas gracias.

“Aprovechando bien el tiempo, para aprender a sonreír”. **Paula Andreina Suárez Martínez**

Dedicatoria

Principalmente a **DIOS** por haber forjado mi camino y haberme permitido con su divina gracia llegar hasta aquí, para lograr mis metas. Por fortalecer mi corazón e iluminar mi vida y por poner en mi camino aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante el transcurso de mi caminar.

A mi madre **Gladis María Ortiz** por haberme formado como la persona que soy, por levantarse día a día y enseñarme que tengo que luchar por mis sueños y mi felicidad. Por ser mi ejemplo a seguir y por darme su amor incondicional SIEMPRE.

A mis hijos **Eylin Camila A. & Lian Sebastian A.**, por ser mi motivación e inspiración, por llenar mis días de sonrisas, alegrías y amor. Por ser la parte dulce de mi vida. A mi esposo **Eynson Ferney Aparicio** por ser mi compañero y apoyo, por motivarme a ser mejor cada día, por amarme y sobre todo por creer en mí.

A mi profe **Diana María Cárdenas Caro**, quien me abrió las puertas de su lugar de trabajo y aceptó realizar esta tesis bajo su dirección. Por enseñarme a crecer como persona, con grandes valores éticos y morales, por compartir sus conocimientos, ideas y consejos conmigo.

A mis HERMANOS por confiar en mí y acompañarme durante este proceso. A mis amigas y colegas **Tatiana Rico Lindarte, Paula Andreina Suárez & Laura Valderrama** por brindarme sus amistades sinceras y por ayudarme siempre.

A todos mil gracias por estar en mi vida....los amo, los quiero y los admiro.

Carolina Ortiz □

Agradecimientos

Principalmente le damos gracias a Dios por su sostenimiento y fortaleza en el transcurrir diario, gracias a nuestro Padre celestial damos sentido a cada propósito de nuestras vidas, disfrutando de los seres que el coloca en nuestros caminos para aprender de ellos, quienes se convierten en parte esencial de la enseñanza, es por ello que en este trabajo de grado agradecemos a Dios principalmente por su sabiduría, para con nosotras.

Así mismo a nuestras familias por ser nuestro ejemplo a seguir y nuestra gran motivación, quienes nos entregaron su infinito amor durante este proceso de formación y sobre todo por entregarnos la oportunidad de convertirnos en ingenieras Biotecnológicas.

De igual manera a nuestra directora de proyecto Msc Diana María Cárdenas Caro por colocar su confianza, entrega y dedicación en nosotras. Por su inmensa paciencia y comprensión, y principalmente por fortalecer nuestros conocimientos y personalidad, GRACIAS muchas GRACIAS profe, por ser una excelente maestra y sobre todo por ser un gran ser humano.

A la Ing Laurita Valderrama quien nos guio y acompañó durante este proceso; queremos agradecerle por su ayuda, colaboración, recibimiento y acogimiento en el área de trabajo quien aportó labores imprescindibles para nuestro crecimiento personal y laboral, puesto que convivimos más de un año de esta hermosa labor.

También a nuestras amigas Luisa Colobon, Érica Bautista, Tatiana Rico y a todos aquellos que aportaron su granito de arena y confiaron en cada paso que dimos; pues nos enseñaron a creer más en nosotras mismas y a crecer como personas.

Contenido

	pág.
Introducción	19
1. El Problema	21
1.1 Título	21
1.2 Planteamiento del Problema	21
1.3 Formulación del Problema	22
1.4 Justificación	22
1.5 Objetivos	24
1.5.1 Objetivo general	24
1.5.2 Objetivos específicos	24
1.6 Delimitaciones	24
1.6.1 Espacial	24
1.6.2 Temporal	24
1.6.3 Conceptual	24
2. Marco Referencial	25
2.1 Antecedentes	25
2.2 Marco Teórico	29
2.2.1 Interacciones microbianas	29
2.2.2 Antagonismo microbiano in vitro	29
2.2.3 Co-Inoculación microbiano	30
2.2.3.1 Diseño y construcción de consorcios microbianos	30
2.2.4 El género Trichoderma	31
2.2.5 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal	32

2.2.6 El género <i>Azospirillum</i>	33
2.2.7 El género <i>Pseudomonas</i>	33
2.2.8 El género <i>Bacillus</i>	33
2.2.9 El arroz (<i>Oryza sativa L.</i>)	34
2.3 Marco Conceptual	35
2.4 Marco Contextual	36
2.5 Marco Legal	36
3. Diseño Metodológico	38
3.1 Tipo de Investigación	38
3.2 Fases de la Investigación	38
3.3 Población y Muestra	38
3.3.1 Población	38
3.3.2 Muestra	38
3.4 Hipótesis	38
3.5 Variables	39
3.5.1 Dependientes	39
3.5.2 Variables independientes	39
3.5.3 Efecto de inoculación simple y co-inoculación de cepas de rizobacterias y el hongo <i>T. asperellum</i> en plantas de arroz	44
4. Resultados y Análisis	49
4.1 Antagonismo Entre Cepas de <i>Azospirillum brasilense</i> , <i>Bacillus velezensis</i> , <i>Pseudomonas Putida</i>	49
4.2 Antagonismo in Vitro de las Cepas Bacterianas contra las Cepas de <i>Trichoderma</i> SPP	51

5. Conclusiones	67
6. Recomendaciones	68
Referencias Bibliográficas	69
Anexos	80

Lista de Tablas

	pág.
Tabla 1. Cepas de rizobacterias	40
Tabla 2. Cepas de <i>Trichoderma</i> spp	43
Tabla 3. Tratamientos del ensayo de inoculación simple y co-inoculación microbiana in planta de arroz	46
Tabla 4. Antagonismo in vitro entre las cepas de rizobacterias	49
Tabla 5. Antagonismo in vitro entre cepas de rizobacterias y el hongo <i>Trichoderma asperellum</i>	54

Lista de Figuras

	pág.
Figura 1. Ensayo in vitro del Enfrentamiento de cepas de rizobacterias	41
Figura 2. Ensayo in vitro del enfrentamiento de cepas de rizobacterias y cepas del hongo <i>Trichoderma</i> spp	43
Figura 3. Producción de inóculos microbianos	47
Figura 4. Ensayo de inoculación simple y co- inoculación microbiana in planta de arroz	48
Figura 5. Enfrentamiento in vitro en medio Agar Batata. A) Enfrentamiento de rizobacterias. B) Cepas control de rizobacterias <i>Azospirillum brasilense</i> RzP064 y RzP047, <i>Pseudomonas putida</i> RzA027 y RzA035, <i>Bacillus velezensis</i> EU45 y FZB42	50
Figura 6. Enfrentamiento in vitro de rizobacterias y el hongo <i>T. asperellum</i> en agar batata	53
Figura 7. Longitud foliar (cm) de plantas de arroz con inoculación simple y co-inoculación por las cepas de rizobacterias y <i>T. asperellum</i> HF15	57
Figura 8. Comparación del crecimiento foliar de las rizobacterias. A) <i>T. asperellum</i> HF15 + <i>P. putida</i> RzP027 + <i>B. velezensis</i> EU45 + <i>A. brasilense</i> RzP064. B) <i>T. asperellum</i> HF15 + <i>P. putida</i> RzP027. C) <i>T. asperellum</i> HF15 + <i>P. putida</i> RzP027 + <i>B. velezensis</i> EU45. D) Tquimico (DAP+ Urea)	57
Figura 9. Longitud radical (cm) de plantas de arroz con inoculación simple y co-inoculación por las cepas de rizobacterias y <i>T. asperellum</i> HF15	58
Figura 10. Peso seco foliar (g) de plantas de arroz con inoculación simple y co-inoculación por las cepas de rizobacterias y <i>T. asperellum</i> HF15	59
Figura 11. Peso seco radical (g) de plantas de arroz con inoculación simple y co-inoculación por las cepas de rizobacterias y <i>T. asperellum</i> HF15	60

Figura 12. Longitud radical de la inoculación simple y co-inoculación de rizobacterias y el hongo *T. asperellum* in plantas de arroz

Lista de Anexos

	pág.
Anexo 1. Medios de cultivo	81
Anexo 2. Procedimiento para el Recuento de la población bacteriana	85
Anexo 3. Formato para el recuento de la población bacteriana	86
Anexo 4. Preparación del inóculo y recuento de hongos en cámara Neubauer	87
Anexo 5. Protocolo de desinfección implementado en la investigación	88
Anexo 6. Enfrentamiento de rizobacterias y el hongo <i>T. asperellum</i> agar nutritivo	89
Anexo 7. Enfrentamiento de rizobacterias y el hongo <i>T. asperellum</i> agar PDA	90

Resumen

El objetivo fue evaluar la interacción entre consorcios de rizobacterias y *Trichoderma spp.* en la promoción del crecimiento de plantas de arroz (*Oryza sativa L.*) con el fin de encontrar el más eficiente. Se realizaron pruebas de antagonismo entre las cepas y se formaron consorcios probando todas las combinaciones posibles en las concentraciones, 10^8 UFC/mL. Se realizaron evaluaciones cualitativas y cuantitativas de la co-inoculación, y se prepararon los bioinoculantes con 11 combinaciones diferentes evaluando plantas de arroz (*Oryza sativa L.*) a escala de laboratorio, utilizando un diseño estadístico completamente al azar con 16 tratamientos y 5 réplicas: que incluían Tratamiento (testigo) fertilización química (DAP + Urea), 11 Tratamientos inoculados con los consorcios de microorganismos seleccionados. Se evaluaron las variables número de hojas, área foliar, longitud de la planta, longitud de la raíz y peso seco foliar y radical de todas las plantas. Los resultados de la prueba de antagonismo *in vitro* indicaron que entre las cepas de rizobacterias no presentaron antagonismo entre ellas, pero si se observó variabilidad del nivel de antagonismo de las cepas de la misma especie de rizobacterias contra las cinco cepas de *Trichoderma spp.*, por lo tanto se formaron los consorcios con las cepas que presentaron el menor nivel de inhibición, los tratamientos co-inoculados mostraron mayor eficiencia respecto al tratamiento testigo destacándose el tratamiento en donde se inocularon las cuatro cepas (*Ta* HF015 + *P.putida* RZA027 + *Bv* EU45 + *Ab* RZP064) que registró efectos significativos en las plantas evidenciando un incremento en todas las variables evaluadas, indicando mayor beneficio en comparación con el testigo.

Abstract

The objective was to evaluate the interaction between rhizobacterial consortia and *Trichoderma* spp. in promoting the growth of rice plants (*Oryza sativa L.*) in order to find the most efficient one. Antagonism tests were performed between the strains and consortia were formed testing all possible combinations in the concentrations, 10⁸ CFU / mL. Qualitative and quantitative evaluations of the co-inoculation were carried out, and the bioinoculants were prepared with 11 different combinations evaluating rice plants (*Oryza sativa L.*) at laboratory scale, using a completely randomized statistical design with 16 treatments and 5 replicates: that included Treatment (control) chemical fertilization (DAP + Urea), 11 Treatments inoculated with the consortia of selected microorganisms. The variables leaf number, leaf area, plant length, root length, and leaf and root dry weight of all plants were evaluated. The results of the in vitro antagonism test indicated that among the *rhizobacterial* strains they did not show antagonism between them, but if variability of the level of antagonism of the strains of the same *rhizobacteria* species was observed against the five strains of *Trichoderma* spp, therefore both consortia were formed with the strains that presented the lowest level of inhibition, the co-inoculated treatments showed greater efficiency compared to the control treatment, highlighting the treatment where the four strains were inoculated (Ta HF015 + P.putida RZA027 + Bv EU45 + Ab RZP064) that registered significant effects on the plants, showing an increase in all the variables evaluated, indicating a greater benefit compared to the control.

Introducción

En la actualidad la agricultura se ha enfocado en la producción intensiva sin tener en cuenta los impactos que puede tener en el medio ambiente, a costas de la degradación de los suelos y alteraciones de los ecosistemas agrarios produciendo desequilibrio (Castilla, 2019), por esto se han propuesto alternativas biotecnológicas entre ellas la inoculación con rizobacterias que promueven el crecimiento de plantas (PGPR) siendo una herramienta valiosa para mejorar el rendimiento de los cultivos, minimizando el uso de fertilizantes y pesticidas (Rariz *et al.*, 2017).

Se conoce que las PGPr tienen la capacidad de ejercer grandes beneficios sobre las plantas mediante mecanismos directos e indirectos o una unión de ambos, estos mecanismos suelen sintetizar metabolitos que facilitan la disponibilidad de diferentes elementos nutritivos a las plantas, como fijación de nitrógeno, síntesis de fitohormonas, vitaminas y enzimas, solubilización de fosfato inorgánico y la mineralización de fosfato orgánico. Otros mecanismos se caracterizan por ocasionar la disminución o eliminación de fitopatógenos (Moreno *et al.*, 2018) Los hongos también son promotores de crecimiento vegetal y protegen contra patógenos por mecanismos tales como antagonismo, competición y resistencia sistémica (Alizadeh *et al.*, 2013). Un consorcio microbiano puede desempeñar mayor resistencia en las fluctuaciones del ambiente, y resistir mejor los periodos de limitación de nutrientes debido a la diversidad metabólica que poblaciones individuales (Carreño & Montolya, 2010).

La biotecnología se beneficia de los consorcios microbianos conformados por diferentes especies que interactúan entre sí, para la propagación de comportamientos novedosos de interacciones que conllevan a mecanismos prácticos. Naturalmente las interacciones microbianas cumplen múltiples funciones especialmente degradando y transformando diversos materiales para

que sean aprovechados en la nutrición de las plantas (Luna & Mesa *et al.*, 2016), o sintéticamente realizando tareas aún más complicadas y soportando entornos más cambiantes proporcionando una nueva perspectiva microbiana (Purnick & Weiss, 2009).

Las interacciones entre los microorganismos forman biopelículas conformadas por comunidades microbianas asociadas a la superficie de la raíz, las cuales utilizan mecanismos de señalización que promueven interacciones modulando el metabolismo y la transcripción relacionados con el crecimiento, rendimiento y la absorción de nutrientes en las plantas. los microorganismos expresan la fase de biopelícula durante la colonización del suelo o las raíces de las plantas, lo que permite un establecimiento y una propagación de la especie (Velmourougane *et al.*, 2019).

Por lo anterior, esta investigación tiene como objetivo realizar el estudio *in vitro* e *in plantas* de arroz del efecto promotor del crecimiento radical y foliar por la co-inoculación de cepas de rizobacterias de los géneros *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y del hongo antagonista del género *Trichoderma spp.*

1. El Problema

1.1 Título

INTERACCIÓN DE CEPAS DE RIZOBACTERIAS Y *TRICHODERMA ASPERELLUM*
EN LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE ARROZ (*ORYZA SATIVA* L.)

1.2 Planteamiento del Problema

Cada día aumenta la población mundial, lo cual, demanda una producción superior de alimentos y a su vez ejerce mayor presión sobre el recurso suelo, llevándolo al desbalance de nutrientes, disminución de la fertilidad y baja productividad de los cultivos (Alvarez *et al.*, 2018). El arroz (*Oryza sativa* L.) es el cultivo básico más importante del mundo, siendo un proceso agronómico que consume gran cantidad de agua afectando el medio ambiente, principalmente los suelos agrícolas a causa del uso excesivo de agroquímicos (Rariz *et al.*, 2017). Los inoculantes de bases biológicas, deberían manifestar alternativas compatibles que involucren actividades permitiendo desarrollar interacciones microbianas para favorecer la nutrición de las plantas y contrarrestar el daño agrícola. En las interacciones microbianas la eficacia puede aumentar, disminuir o tener valores similares a los microorganismos aplicados de forma individual. Sin embargo, la hipótesis de varios estudios para probar las interacciones sinérgicas, aditivas o antagónicas han demostrado que el uso de inoculantes es muy controversial desde su inicio y lo continuara siendo si las respuestas de los cultivos no son completamente predecibles (Creus C, 2017)

Algunas investigaciones han estudiado la interacción entre microorganismos y las plantas, buscando la efectividad de estas especies en el control biológico sobre la eficacia de la resistencia

inducida con *Trichoderma*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum* y pero aún no se ha mostrado las diferencias que pueden existir entre una interacción sintética o *in-vitro* de comunidades microbianas y la expresión o el comportamiento de las misma en el suelo, además si todas las mezclas podrían resultar efectivas para las técnicas mencionadas anteriormente. Por esto surge la necesidad de llevar a cabo la interacción entre las PGPRS y el hongo antagonista, observando la capacidad que tiene cada especie en manifestar sus potenciales, dado que no se encuentra literatura requerida para aclarar los mecanismos de acción que están ocurriendo en dicha interacción, con el fin de crear inoculantes que brinden sostenibilidad en la agricultura.

1.3 Formulación del Problema

¿La interacción microbiana de cepas de los géneros, *Azospirillum*, *Bacillus* y *Pseudomonas* con cepas del hongo *Trichoderma asperellum* presenta una actividad sinérgica que promueva el crecimiento radical y vegetal de plantas de arroz en condiciones *in vitro*?

1.4 Justificación

La importancia de los inoculantes en la industria agrícola se sustenta en parte, en que son una opción amigable para el suelo, ya que el uso excesivo de las tierras fértiles para cultivo y el manejo indiscriminado de fertilizantes químicos desgasta este recurso, y en este caso, las interacciones microbianas contribuyen a mitigar el problema de deterioro y/o contaminación ambiental (Corrales *et al.*, 2017). Las comunidades microbianas son de gran importancia para la fabricación de los inoculantes por lo tanto es necesario la selección de cepas con mecanismos funcionales directos e indirectos que ayuden al control y a la calidad de los cultivos agrícolas (Reséndez *et al.*, 2018).

Al analizar las interacciones permite inferir sobre las funciones positivas y negativas de las poblaciones que la conforman, dando paso a el aprovechamiento de consorcios, cepas y metabolitos bacterianos con actividades funcionales aprovechables por el hombre (De la Cruz *et al.*, 2014). Actualmente, se deben aprovechar las expresiones que emiten la conformación de consorcios ya que indica no sólo la convivencia de múltiples especies sino también la división del trabajo, que en conjunto son más fuertes para los desafíos ambientales, agrícolas e industriales (McCarty *et al.*, 2019). Por esto es de gran importancia realizar la co-inoculación de Rizobacterias y hongos en las plantas de arroz, con el fin de obtener el máximo rendimiento al menor costo económica y ambiental, brindando alternativas al uso de inoculantes microbianos (Cruz *et al.*, 2017).

Actualmente, se cuenta con un banco de cepas que han sido seleccionadas por su potencial como Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, en el Banco de Cepas del grupo de investigación en Ciencias Biológicas “Majumba”, con las cuales se comenzarán estudios de interacciones entre cepas de los géneros, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y de éstas con cepas de *T. asperellum*, evaluando su potencial actividad sinérgica en la promoción del crecimiento vegetal de plantas de arroz, como una primera etapa de tamizaje en los mecanismos de acción de la inoculación simple y la co-inoculación microbiana.

Alvarez *et al* (2019) encontraron que la población microbiana nativa de la rizósfera cambia de forma heterogénea con la inoculación de microorganismos benéficos, lo cual estaría relacionado con las características de cada consorcio microbiano, su capacidad de adaptación y las condiciones existentes en el nicho rizosférico, también que la inoculación de consorcios microbianos benéficos es positiva ya que mediante varios mecanismos benefician el desarrollo de las plantas, además que es necesario abordar investigaciones dirigidas a estudiar las

interacciones microbianas entre los microorganismos nativos frente a inoculados en el suelo, que en su mayoría son desconocidas.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general. Determinar la interacción entre cepas de rizobacterias y *Trichoderma* spp. en la promoción del crecimiento de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.)

1.5.2 Objetivos específicos.

Caracterizar la actividad antagonista entre cepas de *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y del hongo *T. asperellum*.

Determinar el efecto de la inoculación simple y co-inoculación de las cepas de las rizobacterias y el hongo *T. asperellum* sobre el crecimiento radical y foliar de plantas de arroz.

1.6 Delimitaciones

1.6.1 Espacial. Este proyecto se llevará a cabo en el Laboratorio de Investigación en Biología Aplicada (LB105) de la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad Francisco de Paula Santander sede Colsag, AV Gran Colombia N° 12 E-96 BARRIO COLSAG, y contó con el apoyo del grupo de investigación en Ciencias Biológicas “MAJUMBA”.

1.6.2 Temporal. El desarrollo del proyecto comprendió una duración de 8 meses donde elaboramos el montaje del diseño experimental, el seguimiento del ensayo y el análisis de resultados.

1.6.3 Conceptual. En este trabajo se tuvieron en cuenta los términos conceptuales como: co-inoculación consorcio microbiano, interacciones microbianas, (PGPRS).

2. Marco Referencial

2.1 Antecedentes

Algunas investigaciones han ido mostrando el comportamiento de las interacciones entre un microorganismo y otro en diferentes condiciones, reportando diferentes resultados en las interacciones evaluadas. Chagas & Pupo (2018), asegura que los microorganismos interactúan bioquímicamente en ambientes naturales. Sin embargo, los compuestos y mecanismos involucrados en este fenómeno aún son poco conocidos y se han reportado cambios metabólicos que pueden ocurrir debido a las interacciones entre hongos y bacterias aisladas de plantas.

Lara & Negrete (2015), evaluaron la capacidad solubilizadora de fosfatos por consorcios formados de bacterias de los géneros *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas luteola* y *Pantoea* sp., en plantas de pasto angleton (*Dichanthium aristatum*). Sus resultados mostraron mayor eficiencia de los consorcios de *Pantoea* sp. + *Pseudomonas* sp. a una concentración de 10^8 UFC/mL en la solubilización del fosfato y a nivel *in planta* se produjo un incremento significativo en los parámetros de peso seco y área foliar con respecto al control. Por su parte, Pagnussat *et al.* (2016) evaluaron la interacción de una cepa de *Azospirillum* y *Pseudomonas* en la formación de biopelículas y registraron que la biopelícula de *A. brasilense* era más gruesa y densa cuando se cultivaba conjuntamente con *P. protegens*.

Hashem *et al.*, 2016, investigaron cómo las interacciones sinérgicas de las bacterias endofíticas y los hongos micorrícicos arbusculares (AMF) afectan el crecimiento de las plantas, la nodulación, la adquisición de nutrientes y la tolerancia al estrés de *Acacia gerrardii* bajo estrés salino. Reportaron que el crecimiento de las plantas varió entre los tratamientos con ambos inoculantes únicos y fue mayor en las plantas inoculadas con la cepa endofítica de *B. subtilis* que

con la de AMF. La co-inoculación de las plantas de *A. gerrardii* tuvo un peso significativamente mayor de brote y raíz seca, número de nódulos y contenido de leghemoglobina que los inoculados con AMF o *B. subtilis* solo bajo estrés salino. También informaron las diferencias en las actividades de nitrato y nitrito reductasa y nitrogenasa entre las plantas no inoculadas y las inoculadas con AMF y *B. subtilis* juntas bajo estrés fueron significativas, donde ambos tratamientos de inoculación, ya sea *B. subtilis* solo o combinado con AMF, mejoraron los contenidos de N, P, K, Mg y Ca y las actividades de fosfatasa en *A. gerrardii* estresado por saltejos y concentración reducida de Na y Cl, protegiendo así a las plantas estresadas con sal de los cambios iónicos y osmóticos inducidos por el estrés.

Por otra parte Wang *et al.* (2019) identificaron, la capacidad de un producto microbiano derivado de la rizosfera (compuesto por un consorcio de una cepa de *Bacillus subtilis* y una cepa de *Trichoderma harzianum*) para suprimir la enfermedad de la costra común en la papa causada por *Streptomyces* spp. Donde encontraron que el índice de enfermedad disminuyó en un 30,6% – 46,1%, y el rendimiento aumentó en un 23,0% – 32,2% en tratamientos en los que 225 o 300 kg · ha⁻¹ del producto microbiano se administró, respectivamente. Determinando que un producto a partir de un consorcio conformado por *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* suprime efectivamente la enfermedad de la costra común y aumenta el rendimiento del tubérculo al establecer una alta abundancia relativa de bacterias beneficiosas en la rizosfera.

Jian *et al.*, (2019). Estudiaron los efectos sinérgicos de las bacterias productoras de IAA y *Rhizobium* en el crecimiento de *Medicago lupulina* bajo estrés de Cu y Zn. Los experimentos con macetas mostraron que 400 mg kg⁻¹ Cu²⁺ y Zn²⁺ inhibieron en gran medida el crecimiento de las plantas, pero la doble inoculación de *Medicago lupulina* con *Sinorhizobium meliloti* y *Agrobacterium tumefaciens* aumentó significativamente el número de nódulos y biomasa vegetal

al mejorar las actividades antioxidantes. Bajo doble estrés de $400 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ y Zn^{2+} , el número de nódulos y las actividades de nitrogenasa de las plantas co-inoculadas fueron 48.5% y 154.4% mayores, respectivamente, que las de las plantas inoculadas con *Sinorhizobium meliloti*. Las longitudes de la raíz y la porción sobre el suelo de las plantas de doble inoculación fueron 32.6% y 14.1% mayores, respectivamente, que las del control, mientras que los pesos secos de la raíz y la porción sobre el suelo fueron 34.3% y 32.2% mayores, respectivamente, que los del control. Comparado con *S. meliloti* y *A. tumefaciens* en inoculación simple, la coinoculación aumentó la absorción total de Cu en un 39.1% y 47.5% y aumentó la absorción total de Zn en un 35.4% y 44.2%, respectivamente, bajo condiciones de doble tensión de metal.

Raklami *et al.* (2019), Determinaron el efecto de la inoculación con rizobacterias y AMF y su potencial para estimular dos (*Vicia faba* L. y *Triticum durum* L.). experimentaron la inoculación de campo con seis tratamientos: (i) el control sin inoculación (C), (ii) PGPR solo (PG), (iii) rizobia sola (R), (iv) la mezcla de PGPR y rizobia (PR), (v) AMF solo (M) y (vi) la mezcla de PGPR, rizobia y AMF (PRM). Sus resultados mostraron que la inoculación con el consorcio de PGPR-rizobia-AMF (PRM) indujo el mayor efecto, mejoró los valores de los parámetros de crecimiento (peso seco de brotes y raíces) de frijol faba y trigo. Observaron una mejora de 130, 200 y 78% en *V. faba* brote y peso seco de la raíz, y el número de hojas, respectivamente. Del mismo modo, brote y peso seco de raíz y número de hojas de *T. durum*, mejorada en 293, 258 y 87%, respectivamente. La inoculación mejoró la productividad de las plantas estudiadas presentada por el número y peso de las vainas de frijol ($270 \times 10^4 \text{ ha}^{-1}$ y $30737.5 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$) y espigas de trigo ($440 \times 10^4 \text{ ha}^{-1}$ y $10560 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$). Además, los análisis minerales mostraron que la inoculación con PGPR-rizobia-micorrizas mejoró el contenido de brotes de N, P, Ca, K y Na, así como el contenido de azúcar y proteínas. Finalmente, revelamos el impacto positivo de los

biofertilizantes probados y el interés de adoptar prácticas innovadoras que mejoren la productividad de los cultivos y la fertilidad del suelo.

Sánchez *et al.*, (2019), evaluaron tres aislamientos de *Trichoderma* como agentes promotores del crecimiento vegetal o de control biológico: *Trichoderma aggressivum f. sp. europaeum*, *Trichoderma saturnisporum* y el aislado marino obtenido de *Posidonia oceanica*, *Trichoderma longibrachiatum*. Analizaron la capacidad promotora del crecimiento de la planta y los efectos de las cepas de *Trichoderma* sobre la severidad de *P. ultimum* en plántulas de melón en condiciones salinas. Obtuvieron que los tres aislados de *Trichoderma*, independientemente de su origen, alivian el estrés producido por la salinidad, lo que resultó en plantas más grandes con un porcentaje de peso seco superior al 80% en condiciones de estrés salino para *T. longibrachiatum*, o un aumento en la raíz -peso seco cercano al 50%. Así mismo, mostraron que los tres aislamientos presentaban actividad antagonista contra *P. ultimum*, reduciendo la incidencia de la enfermedad, con la respuesta más alta encontrada para *T. longibrachiatum*. Control biológico de *P. ultimum* por *T. aggressivum f. sp. europaeum* y *T. saturnisporum* informando por primera vez, la reducción de la severidad de la enfermedad en un 62.96% y 51.85%, respectivamente.

Recientemente se determinó que un consorcio de *Trichoderma virens* y *Bacillus velezensis* con actividad biocontroladora en el pato sistema *Fusarium oxysporum f. sp. physali* – uchuva Las aplicaciones simultáneas de los agentes de control biológico y de *F. oxysporum f. sp. physali* al mismo sitio mostraron una eficacia sinérgica (71.5%) en el control del marchitamiento vascular y en la reducción de la población viable de *F. oxysporum* (63%). Sin embargo, este efecto sinérgico no se mantuvo cuando hubo una separación física entre los agentes de control biológico y de *F. oxysporum f. sp. physali* 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 (Izquierdo, 2019).

2.2 Marco Teórico

2.2.1 Interacciones microbianas. Las interacciones microorganismo-microorganismo o microorganismo-huésped, implican todos los aspectos ecológicos, incluyendo los cambios fisicoquímicos, la conversión metabolito de señalización, la quimiotaxis y el intercambio genético que resulta en el genotipo de selección , y muchos mecanismos pueden estar involucrados en este intercambio, como metabolitos secundarios , sideróforos, detección de quórum sistema, formación de biopelículas y señalización de transducción celular, entre otros. (Braga *et al.*, 2016).

2.2.2 Antagonismo microbiano in vitro. El antagonismo es un tipo de interacción entre especies en la cual dos o más individuos tienen una posición de hostilidad o competencia, ya sea por recursos, territorio o reproducción (B.Chalen *et al.*, 2019).

Sinérgicos: en la interacción sinérgica los microorganismos, trabajan dividiendo su trabajo para garantizar el uso paralelo de diferentes sustratos. Tiene un efecto combinado mayor que la suma de sus efectos separados.

Comensal: En la interacción comensal (o comensalismo), un organismo obtiene beneficios sin afectar al otro.

Mutualista: la interacción mutualista o mutualismo es donde todos los socios obtienen beneficios.

2.2.3 Co-Inoculación microbiano. La eficiencia de la coinoculación está estrechamente relacionada con la selección apropiada de cepas, la concentración celular de cada una, el método de inoculación (aplicado a las semillas, el rociado de las hojas, el surco) y el genotipo de la planta. Se lleva a cabo combinando cepas o especies que actúen en diferentes procesos microbianos, de modo que los beneficios combinados de cada uno den como resultado mayores beneficios, los principales ejemplos de inoculantes mixtos son aquellos que combinan microorganismos cuyos procesos principales son fijación biológica de nitrógeno BNF (por ejemplo, *Bradyrhizobium* spp., *Rhizobium* spp.) Y producción de fitohormonas (por ejemplo, *Azospirillum* spp., *Pseudomonas* spp.), Solubilización de fosfato (por ejemplo, *Bacillus* spp.) O control biológico. (Por ejemplo, *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp.) (Santos *et al.*, 2019).

2.2.3.1 Diseño y construcción de consorcios microbianos. Para realizar el diseño y construcción de un consorcio microbiano el principal objetivo es que los microorganismos trabajen juntos, los mecanismos de adaptación y regulación en consorcios microbianos sintéticos para hacer que los microbios funcionen mejor, así mismo los principios de diseño para sintetizar consorcios microbianos se basan principalmente en los modos de interacción entre microbios, incluidas las comunicaciones célula-célula y el intercambio de metabolitos y energía (Ding *et al.*, 2016).

En la naturaleza, todos los microorganismos viven en asociaciones y forman consorcios naturales que son más estables. A nivel biotecnológico se han clasificado de acuerdo con su construcción en (a) Consorcios microbianos naturales, los cuales se encuentran viviendo simbióticamente en la naturaleza; (b) Consorcios microbianos artificiales, conformados por diferentes microorganismos silvestres que pueden crecer juntos simbióticamente en un sistema

cerrado para generar productos de valor (c) Consorcios microbianos semi-sintéticos, en estos consorcios microorganismos silvestres y modificados son cultivados juntos para un fin común o futuras investigaciones (Bhatia *et al.*, 2018).

2.2.4 El género *Trichoderma*. *Trichoderma* es un hongo aeróbico, con capacidad para resistir un amplio intervalo de temperaturas, 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 (Lazarovits *et al.*, 2014), en su estado vegetativo presenta micelio con septos simples. Las especies son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucano. Se reproducen asexualmente por conidios. Presentan conidióforos hialinos ramificados, fiálides simples o en grupos, conidios de 3 a 5 μm de diámetro, generalmente ovalados, unicelulares, usualmente de color verde. *Trichoderma* es un género de rápido desarrollo en medios sintéticos, además produce metabolitos secundarios o antibióticos con actividad antifúngica y su acción es elicitar o impulsar mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos en la planta. Como controlador biológico actúa ante los patógenos como: competencia, micoparasitismo, antibiosis, desactivación de las enzimas de patógenos y estimulación del crecimiento vegetal, antagonismo e Inducción de resistencia (Martínez *et al.*, 2013).

Las especies de *Trichoderma* producen varios metabolitos de importancia agrícola que exhiben actividades antimicrobianas, como la inducción de resistencia a los fitopatogenos, algunos de estos metabolitos son; la harzianolida producida por *Trichoderma koningii* y *T. harzianum* y La tricocinona producida por *T. koningii*. Estos metabolitos exhiben los mismos atributos actividad antifúngica y regulador de crecimiento vegetal (Wonglom *et al.*, 2020). Así mismo este género tiene la capacidad de expresar defensas mediadas por fitohormonas que se

conocen como resistencia sistémica adquirida y resistencia sistémica inducida basadas en vías dependientes de jasmonatos y etileno También algunas especies de *Trichoderma* desencadenan defensas de las plantas mediadas por el ácido salicílico (Rivera *et al.*, 2019).

2.2.5 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR por su sigla en inglés) han sido ampliamente estudiadas por su capacidad para mejorar la salud y el desarrollo de las plantas. Las actividades positivas que ejercen sobre las plantas pueden incluir aquellas que son de interés agrícola, aumentando la producción y reduciendo los costos, además de no causar daños al medio ambiente o la salud humana (Rojas *et al.*, 2016).

Las principales ventajas de su uso son el suministro de elementos nutritivos, mejoramiento de la salud de las plantas, ayudan a incrementar la actividad biológica del suelo, con lo cual se mejora la movilización de elementos nutritivos y la descomposición de sustancias tóxicas, incrementan la estructura del suelo, favoreciendo un mejor crecimiento radicular, aumentan el contenido de materia orgánica (MO) del suelo, con lo cual se mejora la capacidad de intercambio catiónico, incrementan la retención de humedad, promueven la formación de agregados y amortiguan cambios bruscos contra acidez, alcalinidad, salinidad, pesticidas y metales pesados tóxicos, liberan de forma gradual o lentamente elementos nutritivos y contribuyen a la reserva residual de N y P orgánicos del suelo, reduciendo las pérdidas de N por lixiviación y la fijación de P y también pueden suministrar micro elementos nutritivos, favorecen el crecimiento de lombrices y microorganismos benéficos, ayudan a suprimir enfermedades y parásitos transmitidas por organismos nativos del suelo (Moreno *et al.*, 2018).

2.2.6 El género *Azospirillum*. Pertenece a la subclase alfa proteobacterias y a la familia Rhodospirillaceae y sus especies pueden estar presentes, en vida libre en los suelos, especialmente en la rizósfera y colonizar tejidos internos (Fasciglione *et al.*, 2012). Las especies de *Azospirillum* son capaces de fijar nitrógeno molecular del ambiente, producir fitohormonas y otras moléculas capaces de ayudar al crecimiento vegetal, por lo cual, son consideradas rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (Plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR) (Amenta *et al.*, 2015).

Este género comprende bacilos gruesos, rectos o ligeramente curvados y a menudo con extremos puntiagudos, Gram negativos en cultivos jóvenes, pudiendo ser Gram variables en cultivos envejecidos. Características útiles en su identificación son la forma vibroide, el pleomorfismo y su movimiento en espiral, estos microorganismos interactúan con la raíz de las plantas, permitiéndole así a estas facilitar su absorción de fosfatos, absorción de nitratos y producción de sideróforos (Jahanian *et al.*, 2012).

2.2.7 El género *Pseudomonas*. Células bacterianas aerobias con forma de bacilos Gram negativos, rectos o ligeramente curvados y saprofitas que poseen varios flagelos polares (Álvarez *et al.*, 2015)

Las bacterias del género *Pseudomonas* producen diversas sustancias para el desarrollo y crecimiento vegetal como el ácido Indol acético (IAA), sideróforos, exopolisacáridos, polihidroxicanoatos, amoníaco, y sustancias antifúngicas, así como presentan actividad solubilización de fosfatos y fijación de nitrógeno (Sulochana *et al.*, 2014).

2.2.8 El género *Bacillus*. Presenta células grandes, en forma de barra, generalmente en cadenas cortas simples o largas, Gram positivas, aunque en cultivos viejos, sus células tienden a

teñirse Gram negativas (Johnson, 2018).

Agrupas especies con capacidad de producción de proteínas y metabolitos para el control de plagas y enfermedades, que además ayuda a promover el crecimiento vegetal con la solubilización de fósforo y la producción de fitohormonas como el ácido indol acético y puede realizar actividad de fijación biológica de nitrógeno (Corrales *et al.*, 2017).

Bacillus prevalece como una de las rizobacterias con mayor actividad antifúngica gracias a sus principales mecanismos de control biológico como los describe (Villareal *et al.*, 2017) a.

Producción de lipopéptidos, b. producción de enzimas líticas, c. Producción de sideróforos d.

Producción de δ -endotoxinas, e. Respuesta sistémica inducida.

2.2.9 El arroz (*Oryza sativa* L.). El cultivo del arroz, (*Oryza sativa* L.), comenzó hace casi 10.000 años, en muchas regiones húmedas de Asia tropical y subtropical. El arroz pertenece a la División: Fanerógama, Clase: Espermatófita Orden: *Glumifloral* Tribu: *Oryzaceae*, Familia: *Grainea*, siendo las especies cultivadas: *Oryza sativa* L. y *Oryza glaberrima* Steud, ambas son especies de reproducción autógama, diploides con $2n=24$ cromosomas. El género *Oryza* tiene más de 24 especies silvestres que crecen en regiones inundadas, semi-sombreadas y bosques en el sureste Asiático, Austria, África, Sur y Centro América (Pallares *et al.*, 2019).

Entre las características de esta gramínea destacan el reducido número de calorías que posee, la cantidad de moderada de carbohidratos y el importante aporte de azúcares que otorga a los consumidores, su bajo costo y propiedades nutricionales la convierten en un componente fundamental de la seguridad alimentaria (Mendoza *et al.*, 2019).

Es uno de los productos básicos de cereales dominantes y preeminentes en el mundo, se ve afectado por varios bióticos y tensiones abióticas que amenazan su producción, la carga del

manejo del estrés en el arroz es enorme debido al alto costo económico y ambiental asociado con manejo de enfermedades con base química. (Ashajyothi *et al.*, 2019).

2.3 Marco Conceptual

Esterilización. Es el conjunto de procedimientos que destruyen los gérmenes, impiden su desarrollo y evitan la contaminación.

Asepsia. Protocolos definidos que buscan mitigar o minimizar la contaminación en cualquier proceso.

Inóculo. Es una suspensión de gran cantidad de células microbianas, para su posterior uso.

Microorganismos. Organismos unicelulares o pluricelulares con una organización biológica elemental, que solo puede visualizarse con el microscopio.

Contaminación microbiana. Se refiere a la introducción involuntaria o no intencionada de microorganismos como las bacterias, levaduras, mohos, hongos.

Interacciones microbianas. Asociación íntima entre uno o más microorganismos diferentes ya sean benéficas o antagónicas.

PGPRS. Es un conjunto de bacterias que habitan en la rizosfera de las plantas y que producen en ellas beneficios como el crecimiento vegetal en las raíces de las plantas.

Hongos Antagonistas. Son microorganismos que tienen la capacidad de ejercer un efecto de control biológico sobre diferentes fitopatógenos de interés y se han empleado para controlar diversas enfermedades en cultivos agrícolas.

2.4 Marco Contextual

El presente proyecto se llevó a cabo en la Universidad Francisco de Paula Santander principal centro de educación superior de la ciudad de Cúcuta capital del departamento Norte de Santander. En esta Universidad se encuentra ubicado el Laboratorio de Investigación en Biología Aplicada, donde se realizan proyectos de investigación dirigidos a la búsqueda de microorganismos de interés en biotecnología agrícola, los cuales están conservados para mantenerlos viables con el propósito de realizar diversos estudios. En esta investigación se utilizó un consorcio o mezcla microbiana entre cepas de un hongo antagonista y rizobacterias, con el fin de realizar ensayos *in vitro* e *in planta* de arroz que permitan comprender las interacciones entre estos microorganismos.

Se ha seleccionado el cultivo de arroz para este ensayo ya que es el tercer cultivo de mayor importancia en el país (Chica *et al.*, 2016) siendo fuente principal de calorías y proteínas de las familias de escasos ingresos, teniendo un importante incremento en la productividad en el primer semestre del 2019 donde se aprecia que en los Santanderes se incrementó en 600kg/ha esta recuperación de la productividad en el país se viene presentando desde hace dos años (Dane-Fedearroz, 2019)

2.5 Marco Legal

Resolución 1115 de 2000. Ministerio del Medio Ambiente. Por medio de la cual se determina el procedimiento para el registro de colecciones biológicas con fines de investigación científica.

Ley 599 de 2000. Mediante la cual se expide el código penal, establece penas para delitos como introducción y explotación ilegal de los recursos fáunicos, forestales, florísticos o de los recursos genéticos, el manejo ilícito de microorganismos nocivos, experimentación ilegal en especies animales o vegetales y danos a los recursos naturales y contaminación ambiental.

Ley 99 de 1993. Crea el Ministerio del Medio Ambiente, reordena el sector público encargado de la gestión y conservación del medio ambiente y los recursos naturales renovables. Dispone también esta ley que cuando las actividades reguladoras por el Ministerio del Medio Ambiente puedan afectar la salud humana. Esta función será ejercida en consulta con el Ministerio de Protección social y por el Ministerio de Agricultura cuando pueda afectarse la sanidad animal o vegetal. En la práctica, como más adelante se verá, el ministerio del medio ambiente no es el principalmente regulador en materia de seguridad en la biotecnología.

3. Diseño Metodológico

3.1 Tipo de Investigación

Este trabajo se encuentra enmarcado en una investigación de tipo experimental, ya que se utilizaron experimentos *in vitro* e *in plantas* de arroz, para estudiar la interacción entre 6 cepas de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal de las especies *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas putida* y *Bacillus velezensis* y seis cepas del hongo *Trichoderma asperellum*.

3.2 Fases de la Investigación

Antagonismo entre cepas de *Azospirillum brasilense*, *Bacillus velezensis*, *Pseudomonas putida*.

3.3 Población y Muestra

3.3.1 Población: La población de esta investigación está conformada por aislamientos de rizobacterias, que se encuentran conservados en el Laboratorio de Investigación en Biología Aplicada (LB105) de la Universidad Francisco de Paula Santander sede Colsag.

3.3.2 Muestra: Se utilizaron seis aislamientos de rizobacterias que corresponden a las especies: *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas putida* y *Bacillus velezensis* que se encontraban en el Laboratorio de Investigación en Biología Aplicada (LB105) de la Universidad Francisco de Paula Santander sede Colsag.

3.4 Hipótesis

Ho: Las cepas microbianas no presentan antagonismo contra cada una de las otras cepas en condiciones *in vitro*.

Ha: Algunas cepas microbianas presentan antagonismo contra alguna de las otras cepas en condiciones *in vitro*.

3.5 Variables

3.5.1 Dependientes: Nivel de antagonismo, determinado por el halo de inhibición que se forma sobre el agar.

3.5.2 Variables independientes: Cepas microbianas.

Microorganismos. Las cepas bacterianas se encontraban conservadas en el banco de cepas del Grupo de Investigación en Ciencias Biológicas “Majumba” por el método de viales con una mezcla al 30 % de glicerol y 10% de leche descremada en crioconservación a -50 °C. Las cepas de *T. asperellum* se encontraban conservadas en crioviales con semillas de millo en crioconservación a -50°C.

Las cepas de *Pseudomonas putida* RZA035, RZA027, *Azospirillum brasilense* RZP064, RZP047 y *Bacillus velezensis* FzB42 y EU45 se activaron en caldo LB por 24 - 48 hr y luego se inocularon en agar King B, agar Rojo Congo, agar Batata y agar TSA 50%, respectivamente. Los cultivos se incubaron a 32°C hasta obtener cultivos viables a partir de los cuales se obtuvo un banco de trabajo de 5 cultivos por cepa en los respectivos medios de cultivo (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas de rizobacterias

Especie	Código	Símbolo
<i>Azospirillum brasilense</i>	RzP047	<i>Ab</i>
<i>Azospirillum brasilense</i>	RzP064	<i>Ab</i>
<i>Pseudomonas putida</i>	RzA027	<i>Pp</i>
<i>Pseudomonas putida</i>	RzA035	<i>Pp</i>
<i>Bacillus velezensis</i>	FZB42	<i>Bv</i>
<i>Bacillus velezensis</i>	EU45	<i>Bv</i>

Ensayo. A partir del banco de trabajo de cada cepa, se realizó el ensayo de enfrentamiento en agar Nutritivo de las seis cepas bacterianas. Una colonia de cada cepa se inoculó en caldo LB. Los cultivos se mantuvieron en agitación a 120 rpm por 48 hr. Los caldos de cultivo se centrifugaron y las células se suspendieron en agua destilada estéril para ajustar su concentración celular en espectrofotómetro a una $D.O_{600nm} = 0,5$.

Un volumen de 100 μ L de una de las suspensiones bacterianas se inoculó sobre la caja con agar Nutritivo y se extendió con asa de Digrasky estéril dejándose secar. Posteriormente, se inocularon 20 μ L de la suspensión bacteriana de otra cepa, en uno de tres puntos ubicados en la misma caja. Tres cepas diferentes fueron inoculadas según observa en la Figura 1 y se incubaron por 5 - 7 días a 32 °C para observar si se produce un halo de inhibición sobre el cultivo que se extendió en el agar. Cada combinación se inoculó en tres réplicas, el ensayo fue repetido dos veces en el tiempo (Figura 1).

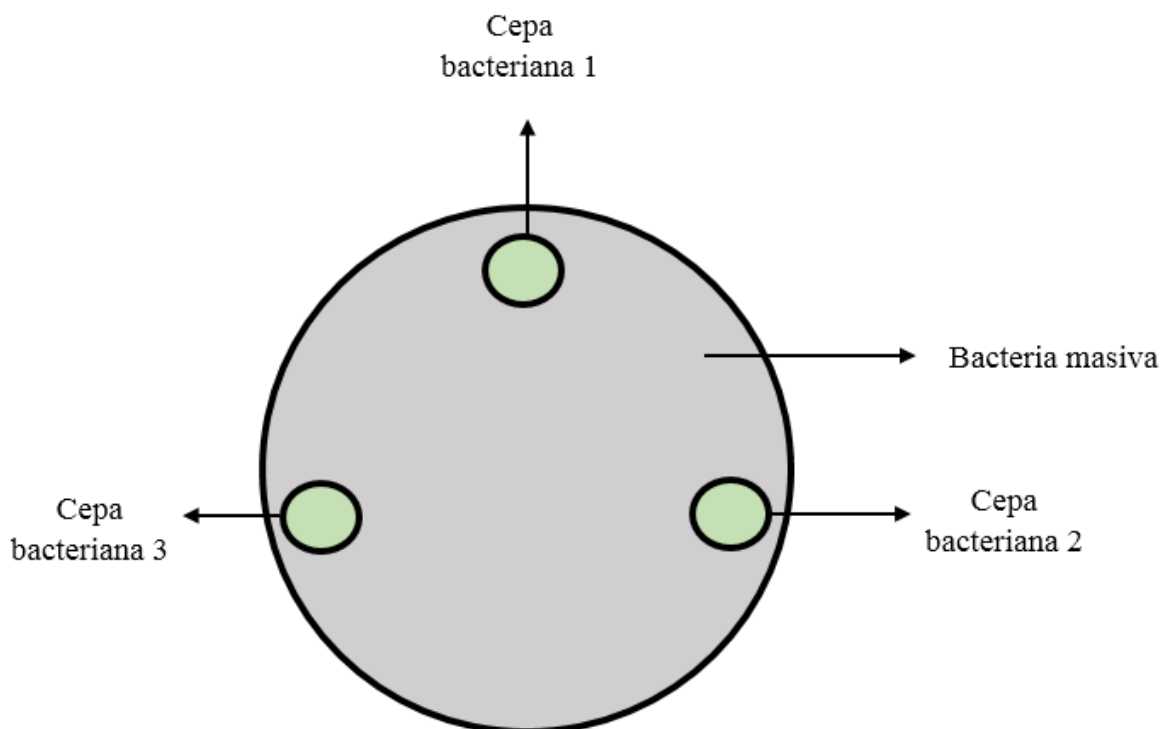


Figura 1. Ensayo in vitro del Enfrentamiento de cepas de rizobacterias

La presencia de halo se consideró como antagonismo y la ausencia indicó que no se presentó antagonismo in vitro entre las cepas enfrentadas.

Antagonismo in-vitro de las cepas bacterianas contra las cepas de *Trichoderma* sp.

Población: La población de esta investigación está conformada por aislados de hongos antagonistas y rizobacterias, que se encuentran conservados en el Laboratorio de Investigación en Biología Aplicada (LB105) de la Universidad Francisco de Paula Santander sede Colsag.

Muestra: Se utilizaron cinco aislamientos de hongos del género *Trichoderma* spp., seis aislamientos de rizobacterias que corresponden a las especies: *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas putida* y *Bacillus velezensis* que se encontraban en el Laboratorio de Investigación

en Biología Aplicada (LB105) de la Universidad Francisco de Paula Santander sede Colsag.

Hipótesis

Ho: Las cepas microbianas no presentan antagonismo contra cada una de las otras cepas en condiciones *in vitro*.

Ha: Algunas cepas microbianas presentan antagonismo contra alguna de las otras cepas en condiciones *in vitro*.

Variables:

Dependientes: Nivel de antagonismo, determinado por el halo de inhibición que se forma sobre el agar.

Variables independientes: Cepas microbianas.

Microorganismos. Las cepas de rizobacterias utilizadas fueron las descritas en la Tabla 1. Las cepas de *Trichoderma* spp. HF15, UA2189, UA2279, UA2273 y AT01 se activaron en agar PDA a partir de un grano de semilla de millo crioconservado. Los cultivos se incubaron a 28 °C hasta obtener cultivos viables a partir de los cuales se obtuvo un banco de trabajo de 5 cultivos por cepa en agar PDA (Tabla 2).

Tabla 2. Cepas de *Trichoderma* spp

<i>Especie</i>	<i>Código</i>	<i>Símbolo</i>
<i>Trichoderma asperellum</i>	HF015	<i>Ta</i>
<i>Trichoderma asperellum</i>	UA2189	<i>Ta</i>
<i>Trichoderma asperellum</i>	UA2279	<i>Ta</i>
<i>Trichoderma asperellum</i>	UA2273	<i>Ta</i>
<i>Trichoderma harzianum</i>	AT01	<i>Ta</i>

Ensayo. El enfrentamiento de las seis cepas bacterianas y 6 cepas *T. asperellum* se realizó en agar Batata. En el centro de la caja de Petri se inoculó un disco de 5 mm de micelio de la cepa de *Trichoderma* spp. a evaluar, obtenido a partir de un cultivo del hongo en agar PDA. En cada uno de los cuatro puntos cardinales se inoculó un disco de papel filtro de 5 mm embebido en una suspensión bacteriana (Figura 2). Los cultivos se incubaron por 5 - 7 días a 32 °C para observar si se produce un halo de inhibición sobre el crecimiento de la cepa de *Trichoderma* spp. Cada combinación se inoculó en tres réplicas. El ensayo fue repetido dos veces en el tiempo (figura 2).

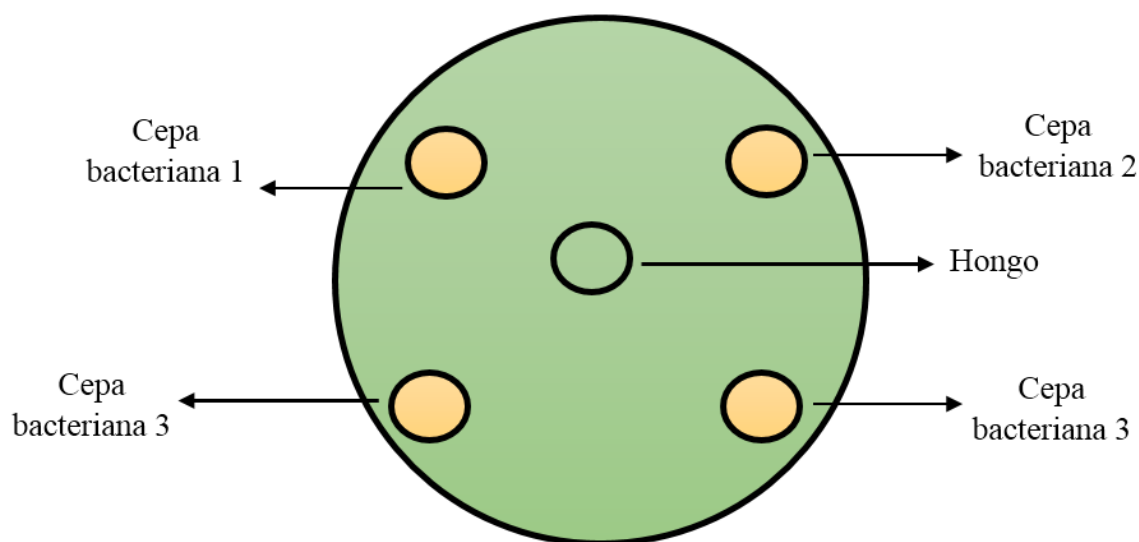


Figura 2. Ensayo in vitro del enfrentamiento de cepas de rizobacterias y cepas del hongo *Trichoderma* spp

3.5.3 Efecto de inoculación simple y co-inoculación de cepas de rizobacterias y el hongo

T. asperellum en plantas de arroz

Población y muestra

Población: La población de este experimento estuvo conformada por 80 unidades experimentales con 5 plantas en cada una de ellas.

Muestra: Se realizaron mediciones a todos los individuos de las 80 unidades experimentales.

Hipótesis

Ho: Todas las cepas microbianas presentan el mismo efecto promotor del crecimiento vegetal en plantas de arroz.

Ha: Las cepas microbianas presentan diferente efecto promotor del crecimiento vegetal en plantas de arroz.

Variables

Dependientes: Longitud foliar y radical, peso seco foliar y radical.

Variables independientes: Consorcios de cepas microbianas.

Suelo y material vegetal. Se prepararon tubetes de 18 cm * 12.69 cm, con 200 g de suelo arrocero seco, al cual se determinó su capacidad de campo. El volumen de agua de capacidad de campo, se tuvo en cuenta para realizar los cálculos del volumen de inóculo microbiano simple y en co-inóculo requerido según el tratamiento.

Se utilizaron semillas de la variedad Fedearroz 2000, las cuales se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 3% por 1 min, inmersión en alcohol al 70% por 1 min y dos enjuagues sucesivos con agua destilada estéril. Las semillas se colocaron en imbibición por 48 - 72 hr en condiciones de cámara húmeda en cajas de Petri estéril con papel filtro y agua estéril. Una vez germinadas, se trasplantaron 5 semillas a cada tubete como unidad experimental en los diferentes tratamientos.

Producción de inoculantes. La producción de los inoculantes de las 6 cepas de rizobacterias descritas en la Tabla 1 y dos cepas de *T. asperellum* HF15 y UA2189 se realizó a partir de cajas de cultivo de las cuatro cepas microbianas. Las colonias de *Azospirillum brasilense* RzP064 Y RzP047, *Pseudomonas putida* RZA027 Y RZA035, *Bacillus velezensis* EU45 Y FZ42 de cada cepa, se transfirieron a tubos de ensayo con agua destilada estéril hasta obtener una suspensión celular. La población bacteriana de esta suspensión celular se realizó por recuento en placa de UFC mL⁻¹ utilizando la técnica de microgota. El inóculo de las cepas de *Trichoderma asperellum* HF15 y UA2189 se produjo en agar PDA. Se inoculó un disco de 5 mm de micelio de cada cepa del hongo *T. asperellum* y se incubó por 5 días a 28±2 °C. Las conidias se transfirieron a erlenmeyers con agua destilada estéril hasta obtener una suspensión celular. La concentración de conidias de esta suspensión celular se realizó por recuento en cámara Neubauer. (Figura 3)

El volumen de la suspensión bacteriana inoculado en los tubetes, se ajustó para que la concentración final en los tubetes fuera de 10⁸ UFC mL⁻¹ y la de la suspensión de conidias fúngica fuera de 10⁸ conidias mL⁻¹.

Análisis estadístico. Se realizó un diseño completamente al azar con 5 tubetes como repeticiones, cada uno con 5 plantas de arroz como unidad experimental, para un total de 11

combinaciones posibles de las 4 cepas, 4 tratamientos con la inoculación simple de cada una de ellas y un testigo con fertilización química (solución de DAP y úrea) sin inoculación microbiana (Tabla 3).

Ya trasplantadas e inoculadas las semillas en los tubetes, se mantuvieron en condiciones de libre exposición solar, riego diario con agua corriente manteniendo una lámina de agua de aproximadamente 0.5 cm. A los 21 días de siembra se midió la longitud foliar y radical y el peso seco foliar y radical como variables asociadas al crecimiento (Figura 4). Se realizó un análisis de varianza y pruebas de comparación de medias por el test de Dunnet.

Tabla 3. Tratamientos del ensayo de inoculación simple y co-inoculación microbiana in planta de arroz

Tratamiento	Cepas microbianas en el consorcio
T1	<i>Bv</i> EU45
T2	<i>Ab</i> RzP064
T3	<i>Pp</i> RzA027
T4	<i>Ta</i> HF015
T5	<i>Ta</i> HF015 + <i>Pp</i> RzA027
T6	<i>Ta</i> HF015 + <i>Pp</i> RzA027 + <i>Bv</i> EU45
T7	<i>Ta</i> HF015 + <i>Pp</i> RzA027 + <i>Bv</i> EU45 + <i>Ab</i> RzP064
T8	<i>Pp</i> RzA027 + <i>Bv</i> EU45
T9	<i>Pp</i> RzA027 + <i>Bv</i> EU45 + <i>Ab</i> RzP064
T10	<i>Bv</i> EU45 + <i>Ab</i> RzP064
T11	<i>Pp</i> RzA027 + <i>Ab</i> RzP064
T12	<i>Ta</i> HF015 + <i>Bv</i> EU45 + <i>Ab</i> RzP064
T13	<i>Ta</i> HF015 + <i>Pp</i> RzA027 + <i>Ab</i> RzP064
T14	<i>Ta</i> HF015 + + <i>Ab</i> RzP064
T15	<i>Ta</i> HF015 + <i>Bv</i> EU45
Control	Fertilización química

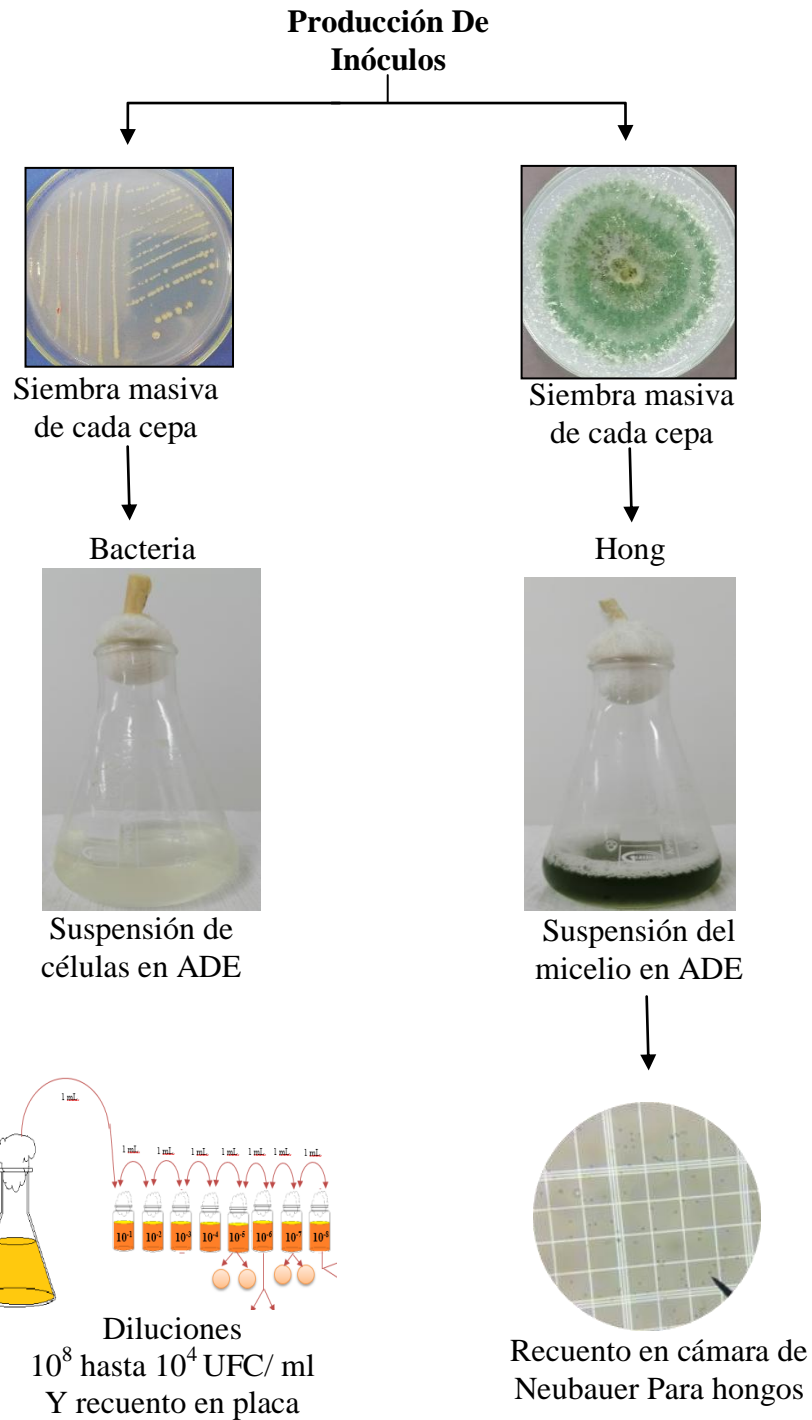


Figura 3. Producción de inóculos microbianos

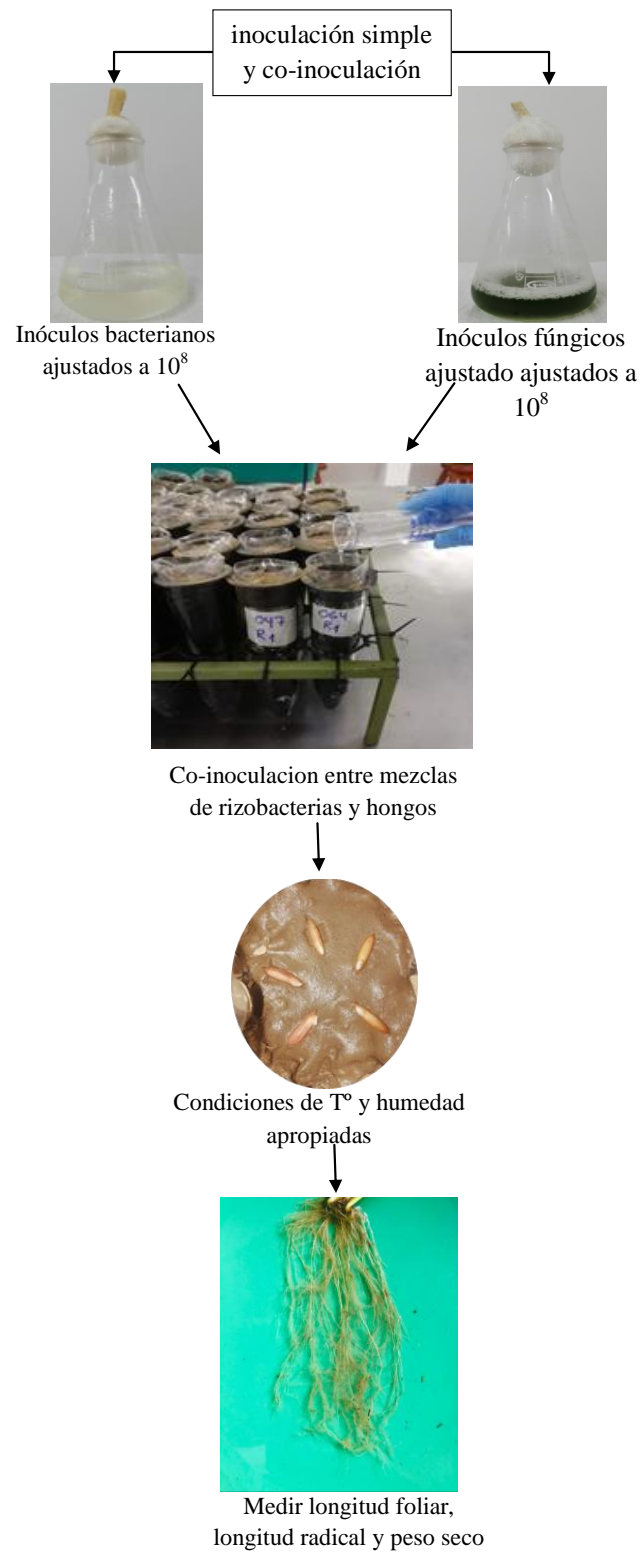


Figura 4. Ensayo de inoculación simple y co- inoculación microbiana in planta de arroz

4. Resultados y Análisis

4.1 Antagonismo Entre Cepas de *Azospirillum brasilense*, *Bacillus velezensis*, *Pseudomonas*

Putida

Los cultivos bacterianos no presentaron halo de inhibición entre ninguna de las cepas evaluadas, lo cual indica que no hubo efecto antagonista en condiciones *in vitro* (Tabla 4, Figura 5).

Tabla 4. Antagonismo in vitro entre las cepas de rizobacterias

Cepas	<i>Ab</i> RzP064	<i>Ab</i> RzP047	<i>Pp</i> RzA027	<i>Pp</i> RzA035	<i>Bv</i> FZB42	<i>Bv</i> EU45
<i>Ab</i> RzP064		-	-	-	-	-
<i>Ab</i> RzP047	-		-	-	-	-
<i>Pp</i> RzA027	-	-		-	-	-
<i>Pp</i> RzA035	-	-	-		-	-
<i>Bv</i> FZB42	-	-	-	-		-
<i>Bv</i> EU45	-	-	-	-	-	

(-) Sin inhibición (+) Inhibición

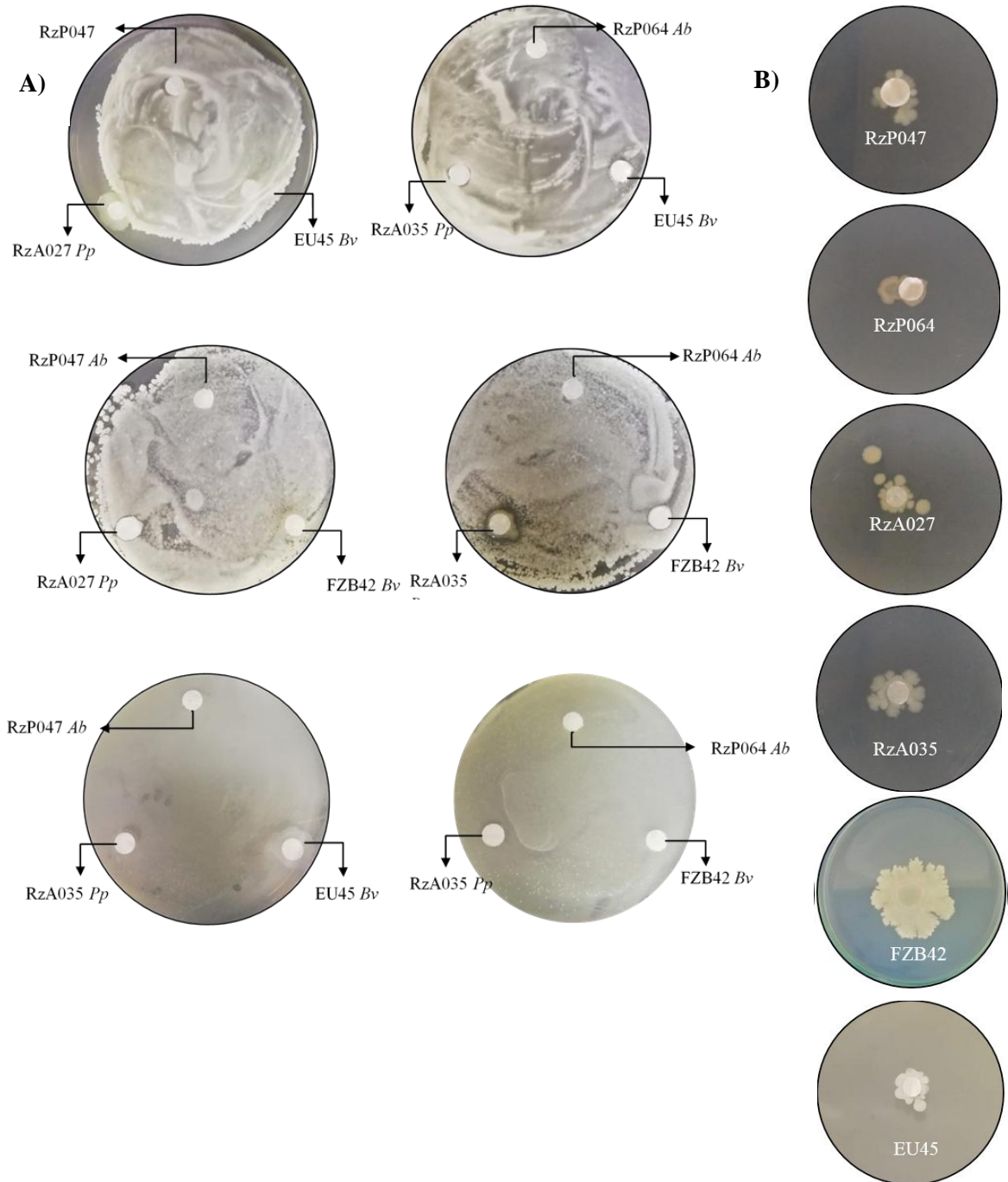


Figura 5. Enfrentamiento in vitro en medio Agar Batata. A) Enfrentamiento de rizobacterias. B) Cepas control de rizobacterias *Azospirillum brasilense* RzP064 y RzP047, *Pseudomonas putida* RZA027 y RZA035, *Bacillus velezensis* EU45 y FZB42

Molina *et al.* (2017), estudiaron la interacción de cepas de *Azospirillum brasilense*, *Bacillus* sp. y *Pseudomonas putida*. en condiciones *in vitro*, determinando que no se inhibe el crecimiento de ninguna de ellas, lo cual atribuyeron a que las bacterias pueden coexistir si no producen sustancias inhibitoras entre sí, pero algunas cepas que producen tales sustancias inhibitoras aún podrían coexistir con cepas resistentes.

4.2 Antagonismo in Vitro de las Cepas Bacterianas contra las Cepas de Trichoderma SPP

Los resultados mostraron variabilidad del antagonismo de las cepas de rizobacterias frente a las cepas de *Trichoderma* spp. (Tabla 5). La cepa de *Bacillus velezensis* EU45 presentó variación en los niveles de antagonismo contra las 5 cepas de *Trichoderma* spp., por su parte, la cepa *Bacillus velezensis* FZB42 presentó un alto nivel de antagonismo contra todas las de *Trichoderma* spp. Por presentar el menor nivel de antagonismo contra las cepas de *Trichoderma* spp., la cepa *Bacillus velezensis* EU45 fue seleccionada para el ensayo *in planta* (Figura 5).

Las especies de *Trichoderma* y *Bacillus* son microorganismos importantes a nivel agrícola e industrial, que se usan comúnmente como agentes de control biológico y promotores del crecimiento de las plantas (Li *et al.*, 2020). Sin embargo, han sido reportados resultados que indican que cepas de *Bacillus* producen metabolitos que inhiben el crecimiento *in vitro* de cepas de *Trichoderma*.

Caldeira *et al.* (2007) reportaron que la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* CCMI 1051 produjo un 74,7% de inhibición de la cepa de *Trichoderma harzianum* CCMI 783 y menos del 50% de las cepas de *Trichoderma pseudokoningii* CCMI 304 y *Trichoderma koningii* CCMI 868. En otros estudios, 23 cepas de *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* y *B. pumilus* inhibieron el crecimiento de cepas de *T. aggressivum* f. *europaeum*, *T. harzianum* y *T.*

koningii, mientras que solo 13 de estas cepas inhibieron el crecimiento de *T. atroviride* (Stanojevic *et al.*, 2016) y otras tres cepas de *Bacillus* sp. inhibieron el crecimiento de una cepa de *Trichoderma* sp. por un metabolito identificado como bacillano (Um *et al.*, 2013). Otros metabolitos producidos por especies de *Bacillus* pueden presentar un efecto antifúngico contra especies de *Trichoderma*, de igual forma como lo hacen contra especies de hongos fitopatógenos, por lo que es necesario realizar estudios previos para seleccionar cepas que no presenten inhibición del crecimiento del otro microorganismo benéfico.

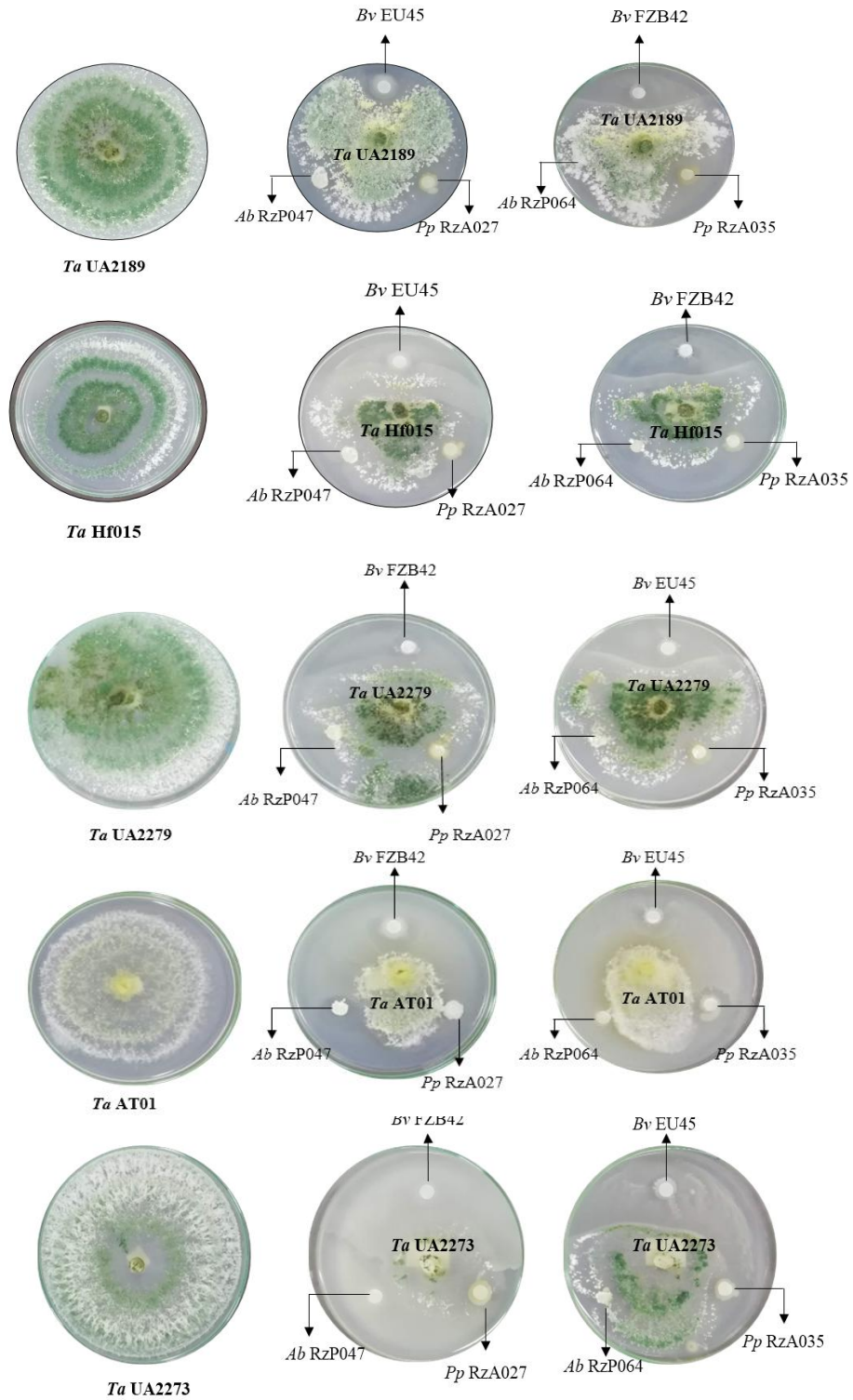


Figura 6. Enfrentamiento in vitro de rizobacterias y el hongo *T. asperellum* en agar batata

Tabla 5. Antagonismo in vitro entre cepas de rizobacterias y el hongo *Trichoderma****asperellum***

Cepa	Inhibición					
	<i>Bv</i> EU45	<i>Bv</i> FZB42	<i>Ab</i> RzP047	<i>Ab</i> RzP064	<i>Pp</i> RzA027	<i>Pp</i> RzA035
<i>Ta</i> HF15	+	+++	+	-	+	++
<i>Ta</i> UA2189	+	+++	+	-	+	++
<i>Ta</i> UA2273	+++	+++	+++	-	++	+++
<i>Ta</i> AT01	+++	+++	+++	+	+++	+++
<i>Ta</i> UA2279	++	+++	-	-	+	++

Nivel bajo (+); nivel medio (0); nivel alto (+++); sin inhibición (-).

De forma similar se encontró variabilidad en el resultado de antagonismo *in vitro* de las cepas de *P. putida* contra las de *Trichoderma* spp. *Pseudomonas putida* RzA027 presentó bajo nivel de antagonismo contra las cepas *Trichoderma asperellum* HF015, UA2189, UA2279 y un nivel alto de antagonismo con la cepa *Trichoderma harzianum* AT01. La cepa *Pseudomonas putida* RzA035 presentó antagonismo medio contra todas las cepas en excepción con *Trichoderma harzianum* AT01.

Rajasekhar *et al.*, (2016), reportaron que las cepas de *Trichoderma harzianum* y *Pseudomonas fluorescens* eran compatibles en todas las combinaciones de consorcios donde no se observó inhibición entre ninguna de ellas, por lo tanto, eran compatibles en la mezcla. Por el contrario, Pan S. K. & Amrita Das. (2010), llevaron a cabo estudios para descubrir la interacción entre la actividad antagonista de *Pseudomonas fluorescens* en diferentes especies de *Trichoderma*. La inhibición en el crecimiento de *Trichoderma* fue de 8.59% cuando *Trichoderma* se usó primero y 59.44% cuando *P. fluorescens* se usó primero en una prueba de cultivo dual.

Por lo anterior se eligió la cepa *Pseudomonas putida* RZA027 para el ensayo *in planta*.

La cepa *Azospirillum brasilense* RZP047 presentó un nivel alto de antagonismo únicamente contra las cepas de *T. asperellum* UA2273 y *T. harzianum* AT01. Por su parte, la cepa de *Azospirillum brasilense* RZP064 únicamente presentó nivel de antagonismo bajo contra la cepa *Trichoderma harzianum* AT01, por lo cual, fue seleccionada para el ensayo *in planta*. Se observó que la cepa de *A. brasilense* RZP064 no presentó inhibición en cultivo por la cepa de *P. putida* RZA027.

Las cepas de *A. brasilense*, tienen la capacidad para producir y usar sideróforos que confieren una ventaja ecológica en la colonización de la rizosfera y producir metabolitos con efectos promotores del crecimiento de las plantas. Pero, tanto productoras como no productoras de sideróforos, generan efectos antagónicos en pruebas *in vitro* contra hongos, como lo revela la inhibición de seis cepas de *Azospirillum* spp (MBUAP48, LBUAP33, LBUAP4, LBUAP28, MBUAP46 y LBUAP31) contra ocho cepas fúngicas (*Alternaria*, *Acremonium*, *Bipolaris*, *Fusarium*, *Mucor*, *Pestalotiopsis*, *Rhizopus* y *Trichoderma*) mostrando la disminución del diámetro en comparación con el diámetro del hongo control sin la presencia de bacterias. (López et al., 2017)

La cepa de *Azospirillum brasilense* RZP064 presentó el menor nivel de antagonismo con respecto a las demás cepas de rizobacterias. Por su parte, la cepa *Bacillus velezensis* FZB42 y *Pseudomonas putida* RZA035 presentaron los niveles de antagonismo más altos contra las cepas de *Trichoderma* spp. Puede verse correlacionado con la producción de metabolitos volátiles y no volátiles por *Bacillus* ante el antagonismo contra hongos. En investigaciones anteriores, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* demostraron la promoción del crecimiento y la inducción de

resistencia sistémica en *Arabidopsis thaliana* mediante la secreción de estos VOC (Khalaf et al., 2018)

Las cepas de *Trichoderma asperellum* HF015 y UA2189 presentaron los niveles de inhibición por las cepas de rizobacterias más bajos pero sus resultados fueron similares entre sí (Tabla 5). Por esta razón se realizó un ensayo *in planta* de arroz para seleccionar aquella cepa que presentara un mayor efecto en la variable peso seco foliar. Los resultados mostraron que la cepa *Trichoderma asperellum* HF015 aumentó significativamente el peso seco foliar de las plantas con respecto a las plantas inoculadas con la cepa *Trichoderma asperellum* UA2189 (datos no mostrados). Por esto, se seleccionó la cepa *Trichoderma asperellum* HF015 para el ensayo *in planta*.

Efecto de la co-inoculación del consorcio entre cepas de rizobacterias y el hongo *T. asperellum* in plantas de arroz:

La co-inoculación de las cepas de rizobacterias promovió la longitud foliar y radical de las plantas de arroz, así como su peso seco foliar y radical. Se registraron diferencias significativas por el test de Dunnet en plantas tratadas con algunos consorcios microbianos, con respecto al control.

La longitud foliar registró diferencias significativas en las tratadas con respecto al control en los tratamientos inoculados con *B. velezensis* EU45 y los co-inoculados con *T. asperellum* HF15 + *P. putida* RzP027; *T. asperellum* HF15 + *P. putida* RzP027 + *B. velezensis* EU45; *T. asperellum* HF15 + *P. putida* RzP027 + *B. velezensis* EU45 + *A. brasilense* RzP064 (Figura 7 y 8).

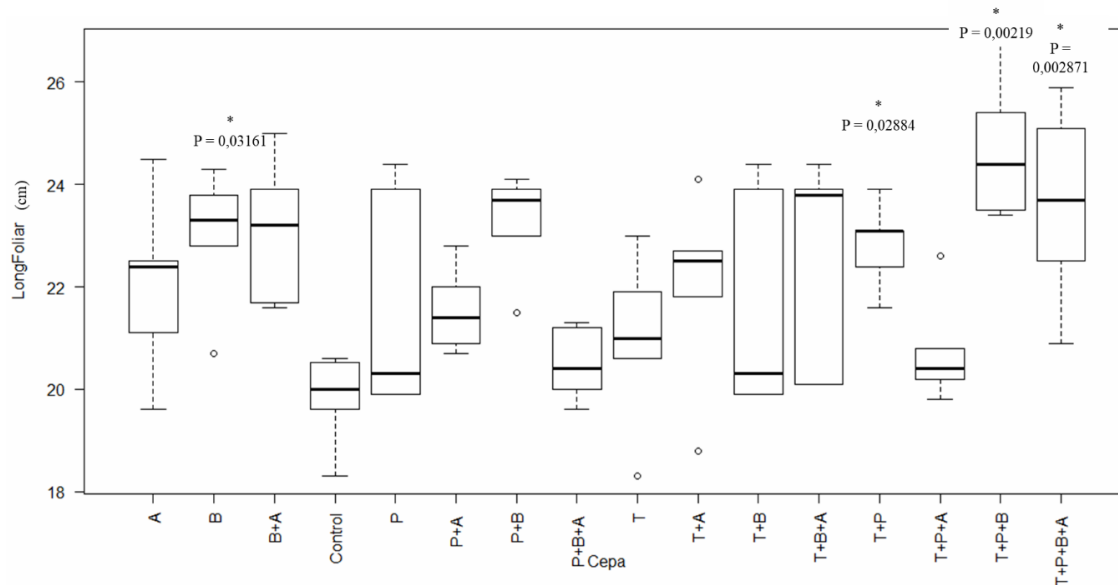


Figura 7. Longitud foliar (cm) de plantas de arroz con inoculación simple y co-inoculación por las cepas de rizobacterias y *T. asperellum* HF15

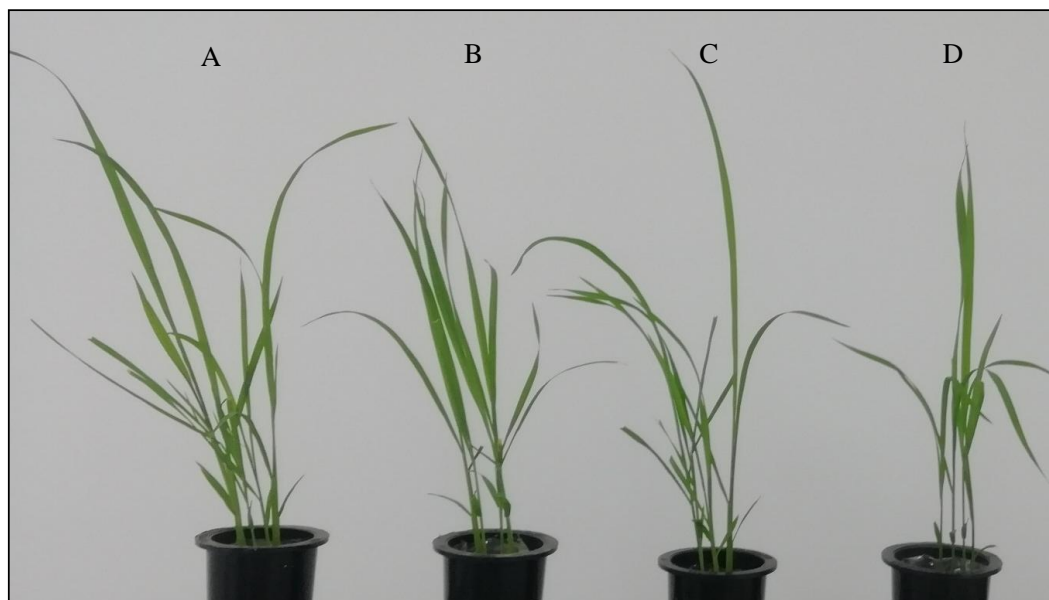


Figura 8. Comparación del crecimiento foliar de las rizobacterias. A) *T. asperellum* HF15 + *P. putida* RzP027 + *B. velezensis* EU45 + *A. brasilense* RzP064. B) *T. asperellum* HF15 + *P. putida* RzP027. C) *T. asperellum* HF15 + *P. putida* RzP027 + *B. velezensis* EU45. D) Tquimico (DAP+ Urea)

La longitud radical presentó diferencias significativas con respecto al control, tanto en las plantas con inoculación simple de cada una de las cepas de rizobacterias y la cepa de *T. asperellum* como en la co-inoculación, excepto en el tratamiento co-inoculado con *T. asperellum* + *B. velezensis* (Figura 9 y 12).

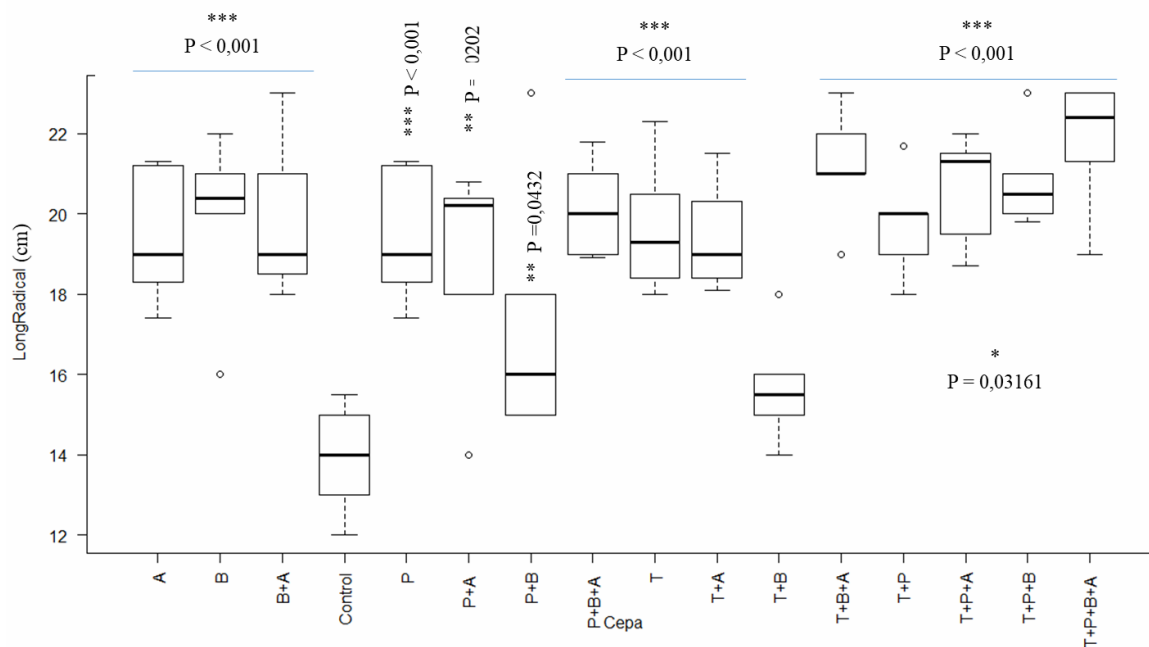


Figura 9. Longitud radical (cm) de plantas de arroz con inoculación simple y co-inoculación por las cepas de rizobacterias y *T. asperellum* HF15

El peso seco foliar registró diferencias significativas con respecto al control con fertilización química, en las plantas con inoculación simple con las cepas de *A. brasilense* RzP064 y *T. asperellum* HF15. También presentaron diferencias significativas con respecto al control con fertilización química, las plantas co-inoculadas con las cepas *P. putida* RzA027 + *A. brasilense* RzP064; *T. asperellum* HF15 + *B. velezensis* EU45 + *A. brasilense* RzP064; *T. asperellum* HF15 + *P. putida* RzA027; *T. asperellum* HF15 + *P. putida* RzA027 + *A. brasilense* RzP064; *T. asperellum* HF15 + *P. putida* RzA027 + *B. velezensis* EU45; *T. asperellum* HF15 + *P. putida*

RzA027 + *B. velezensis* EU45 + *A. brasilense* RzP064 (Figura 10).

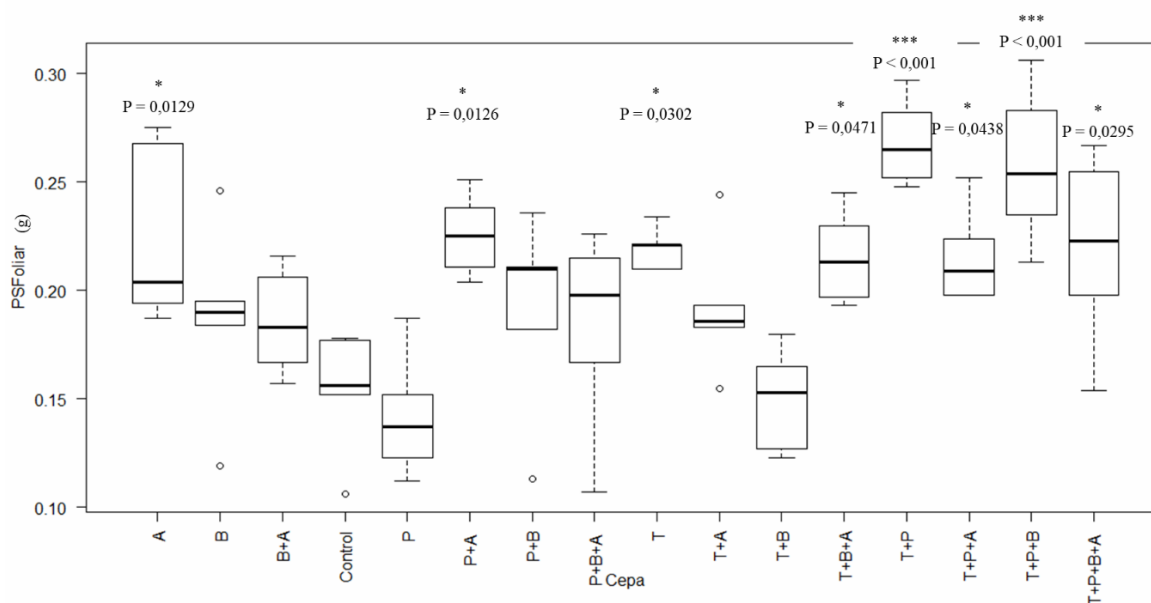


Figura 10. Peso seco foliar (g) de plantas de arroz con inoculación simple y co-inoculación por las cepas de rizobacterias y *T. asperellum* HF15

El peso seco radical registró diferencias significativas con respecto al control en las plantas inoculadas sólo con la cepa de *A. brasilense* RzP064; *P. putida* RzA027 y la co-inoculación con estas dos cepas (*A. brasilense* RzP064 + *P. putida* RzA027). Así mismo, se observó que los consorcios con las cepas *T. asperellum* HF15 + *P. putida* RzA027 + *B. velezensis* EU45 + *A. brasilense* RzP064; *T. asperellum* HF15 + *P. putida* RzA027 + *A. brasilense* RzP064, también registraron diferencias significativas con respecto a las plantas control con fertilización química (Figura 11).

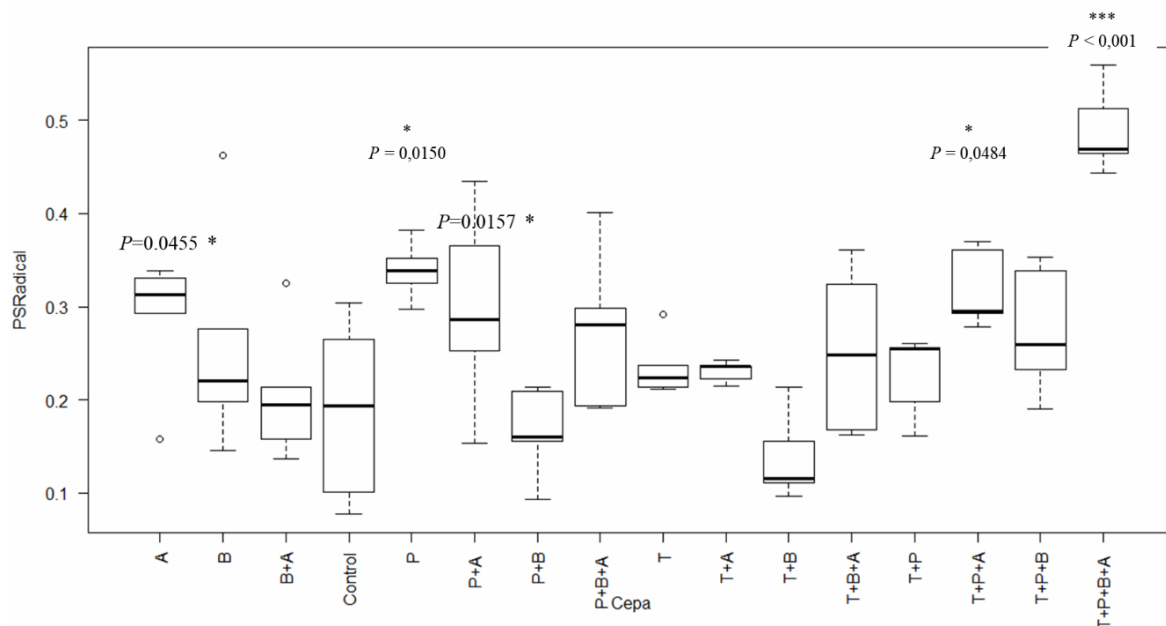


Figura 11. Peso seco radical (g) de plantas de arroz con inoculación simple y co-inoculación por las cepas de rizobacterias y *T. asperellum* HF15

La cepa de *Azospirillum brasilense* RzP064 presentó efecto significativo sobre las variables de longitud radical y peso seco foliar y radical con respecto a las plantas control con fertilización química, cuando se inoculó individualmente en las plantas de arroz. Las demás cepas de rizobacterias y *T. asperellum* HF15 presentaron efecto sólo en dos de las variables evaluadas cuando se inocularon individualmente en las plantas de arroz.

A pesar que se seleccionaron cepas que no presentaron antagonismo (*Azospirillum brasilense* RzP064) o presentaron un nivel bajo (*Bacillus velezensis* EU45 y *Pseudomonas putida* Rza027) contra *Trichoderma asperellum* HF15, los resultados no mostraron efecto significativo en las variables evaluadas por la co-inoculación de las cepas de rizobacterias + *Trichoderma asperellum* HF15 con respecto a las plantas del control con fertilización química y sus medias fueron similares a las registradas en las plantas con inoculación simple, excepto en el tratamiento co-

inoculado con *Trichoderma asperellum* HF15+ *Pseudomonas putida* RZA027 en la longitud foliar y radical y el peso seco foliar, así como en las co-inoculadas con *Trichoderma asperellum* HF15+ *Azospirillum brasilense* RZP064 en la longitud radical.

Se observó que las cepas de *T. asperellum* HF15 y *P. putida* RZA027 presentaron efectos significativos sobre tres de las variables evaluadas con respecto a las plantas control con fertilización química, cuando se co-inocularon entre sí, o con la cepa de *Azospirillum brasilense* RZP064 (Consortios *T. asperellum* HF15 + *P. putida* RZA027; *Azospirillum brasilense* RZP064 + *P. putida* RZA027; *T. asperellum* HF15 + *Azospirillum brasilense* RZP064 + *P. putida* RZA027). De acuerdo a esto, se clasificaron los consorcios de dos cepas con mayor efecto sobre el crecimiento vegetal, a aquellos conformados por *T. asperellum* HF15 + *P. putida* RZA027 y *Azospirillum brasilense* RZP064 + *P. putida* RZA027.

El incremento significativo en la longitud radical puede atribuirse a los diferentes procesos biológicos que han sido descritos en estas especies de *P. putida*, *A. brasilense*. Entre estas actividades biológicas se encuentran la síntesis de fitohormonas como las auxinas que son hormonas vegetales que regulan una gran cantidad de procesos biológicos de la raíz, incluida la regulación de la división y diferenciación celular en procesos tan diversos como la producción de raíces terciarias y pelos radicales (Angulo *et al.*, 2018). El incremento en el desarrollo del sistema radical, conduce a un aumento en el área disponible para la colonización bacteriana, la cual es una condición que determina la actividad de promoción del crecimiento vegetal por las rizobacterias (Talboys *et al.*, 2014).

Debido a esto, las plantas podrían aumentar la toma de agua y nutrientes, lo cual contribuye con el desarrollo foliar que se evidenció en el peso seco foliar en las plantas inoculadas con los

consorcios *T. asperellum* HF15 + *P. putida* RZA027; *Azospirillum brasilense* RZP064 + *P. putida* RZA027; *T. asperellum* HF15 + *Azospirillum brasilense* RZP064 + *P. putida* RZA027.

Otras investigaciones también han registrado un aumento significativo en el peso seco foliar por la co-inoculación de cepas de *Pseudomonas* sp. UAGF14 y *Trichoderma aureoviride* URM 5158 en plantas de lechuga, con respecto a aquellas con inoculación simple y control sin inocular (Martins *et al.*, 2019). Cepas de *Trichoderma harzianum* Th3 y *Pseudomonas fluorescens* RBb11 también registraron un incremento significativo cuando se inocularon en plantas de arroz con respecto a las plantas no inoculadas, pero fueron similares con aquellas donde se inocularon las cepas individualmente (Jambhulkar *et al.*, 2018). Kim *et al.* 2008, también registraron que de 20 cepas de *Bacillus* spp. dos inhibieron crecimiento micelial de *T. harzianum*, 7 cepas inhibieron a *T. koningii* y 8 a *T. viridescens.p.*.

Las plantas co-inoculadas con *Trichoderma asperellum* HF15+ *Bacillus velezensis* EU45 presentaron valores muy similares a las plantas del control con fertilización química y siempre resultaron ser los más bajos con respecto a los demás tratamientos con inoculación simple y co-inoculación.

Las dos cepas de *B. velezensis* evaluadas en condiciones *in vitro* presentaron antagonismo contra la cepa de *T. asperellum* HF15, sin embargo y aunque la cepa *B. velezensis* EU45 presentó nivel bajo de antagonismo, en condiciones *in planta* no tuvo efectos significativos en ninguna variable con respecto al control con fertilización química. Lo anterior sugiere que esta cepa de *B. velezensis* podría estar produciendo metabolitos antifúngicos que afectan el crecimiento de *T. asperellum* HF15 y su efecto en la promoción del crecimiento de las plantas de arroz.

Sarwar et al., (2018) Detectan extractos de Cepas de Bacillis que suprimen significativamente el crecimiento de cepas de hongos (*Trichoderma atroviride* , *F . moniliforme* , *F . oxysporum* y *F . Solani*,)a nivel in vitro.

Por su parte, se observó que el consorcio de las cuatro cepas microbianas mostró incrementos significativos en las cuatro variables evaluadas con respecto a las plantas del tratamiento control con fertilización química. Así mismo el tratamiento de la co-inoculación de *Trichoderma asperellum* HF15+ *Pseudomonas putida* RZA027+ *Bacillus velezensis* EU45 presentó valores significativos con respecto al control con fertilización química, excepto en la variable peso seco radical. Los resultados coinciden con los reportados por Latha *et al.* (2011), quienes registraron efectos significativos de la co-inoculación de cepas de *P. fluorescens* 1 + *B. subtilis* 16 + *T. viridae* 1 + torta de neem + estiércol + ZnSO₄ sobre la altura de plantas de *Jatropha curcas* L. y la reducción de la podredumbre del cuello y la raíz causada por *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl (Syn: *Botryodiplodia theobromae* (Pat.)).

Esto podría sugerir que el antagonismo entre cepas de rizobacterias puede depender de la sensibilidad a los metabolitos producidos por una u otra cepa (Molina *et al.*, (2017), también por la resistencia o capacidad de inhibir estos metabolitos (Li *et al.*, 2019), o por la síntesis de metabolitos producidos cuando las cepas de rizobacterias se enfrentan entre sí y con las cepas de *Trichoderma* y que no se producen cuando son inoculados de forma individual (Karuppiah et al., 2019).

Diversos estudios han demostrado que los consorcios juegan un papel importante en la promoción del crecimiento en plantas, expresando que cada microorganismo que interactúa con los demás tiene la capacidad de producir reguladores de crecimiento que tienen efectos sobre las

plantas, que inciden positivamente en el crecimiento longitudinal, diametral y de raíces, así como también incrementan el número de hojas. Constituyen una alternativa viable para la agricultura orgánica, donde la inoculación del suelo con microorganismos promotores del crecimiento vegetal, pueden ser una herramienta prometedora en los sistemas integrados de manejo. (Alvares et al 2018).

Bilal *et al* 2018, en su investigación de consorcios microbianos a partir de hongos y bacterias endofíticos demuestra que la co-inoculación mejoró significativamente la longitud foliar, longitud de la raíz y peso seco con respecto al control de los brotes no inoculados.

Debido a esto, es recomendable la evaluación del antagonismo *in vitro* e *in planta*, entre cepas que van a ser seleccionadas en la formación de consorcios para la inoculación microbiana de plantas de interés agrícola.



T. testigo fertilización química



T1 *Bv* EU45



T2 *Ab* RzP064



T3 *Pp* RzA027



T. testigo fertilización química



T5 *Ta* HF15+ *Pp* RzA027



T6 *Ta* HF15+ *Pp* RzA027+
Bv EU45



T7 *Ta* HF15+ *Pp* RzA027+
Bv EU45+ *Ab* RzP064



Figura 12. Longitud radical de la inoculación simple y co-inoculación de rizobacterias y el hongo *T. asperellum* in plantas de arroz

5. Conclusiones

Las cepas de rizobacterias no presentaron antagonismo *in vitro* entre ellas, pero si se observó variabilidad *in vitro* del nivel de antagonismo de las cepas de la misma especie de rizobacterias contra las cinco cepas de *Trichoderma* spp. La cepa de *Azospirillum brasilense* RZP064 presentó el menor nivel de antagonismo con respecto a las demás cepas de rizobacterias. Por su parte, la cepa *Bacillus velezensis* FZB42 y *Pseudomonas putida* RZA035 presentaron los niveles de antagonismo más altos contra las cepas de *Trichoderma* spp.

Trichoderma asperellum HF15 presentó los niveles más bajos de inhibición por las seis cepas de rizobacterias evaluadas en condiciones *in vitro*, sin embargo su co-inoculación *in planta* con cada cepa de rizobacteria no presentaron efecto significativo con respecto al control con fertilización química, excepto en el tratamiento co-inoculado con *Trichoderma asperellum* HF15+ *Pseudomonas putida* RZA027.

Los tratamientos co-inoculados con la cepa de *Bacillus velezensis* EU45 con cada una de las cepas de rizobacterias y de *Trichoderma asperellum* HF15 presentaron los menores valores de todos los tratamientos y no presentaron efecto con respecto a las plantas del control con fertilización química.

El tratamiento donde se inocularon las cuatro cepas microbianas registro efecto significativos en todas las variables evaluadas con respecto a las plantas de control con fertilización química, lo cual sugiere un efecto benéfico de la interacción de los cuatro microorganismos.

6. Recomendaciones

Estudiar la actividad bioquímica de los consorcios que no presentaron promoción del crecimiento vegetal comparando con aquellas que si presentaron efecto.

Caracterizar los metabolitos producidos por los microorganismos y comenzar estudios para el reconocimiento de su actividad entre cepas que conforman los consorcios.

Realizar estudios de interacción en otros modelos in planta y con varias cepas de la misma especie.

Referencias Bibliográficas

- Alizadeh, H., Behboudi, K., Ahmadzadeh, M., Javan-Nikkhah, M., Zamioudis, C., Pieterse, C. M. J., & Peter A H. (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>
- Alvarez M; Soto, J; Quevedo, J. & Giler L. (2019) Obtención de consorcios microbianos benéficos y su incidencia en la población microbiana nativa de la rizósfera de plantas de fresa (*Fragaria sp.*) Pol. Con. (Edición núm. 39) Vol. 4, No 11 noviembre 2019, pp. 149-179
ISSN: 2550 - 682X.Chalen
- Alvarez, M., Tucta, F., Quispe, E. & Meza, V. (2018). Incidence of the inoculation of beneficial microorganisms in the strawberry (*Fragaria sp.*) crop. *Scientia Agropecuaria*, 9, 33–42. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.01.04>
- Alvarez, M., Tucta, F., Quispe, E. & Meza, V. (2018). Incidence of the inoculation of beneficial microorganisms in the strawberry (*Fragaria sp.*) crop. *Scientia Agropecuaria*, 9(1), 33–42. [doi:10.17268/sci.agropecu.2018.01.04](https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.01.04)
- Álvarez, O; Coto, A; Echemendía, M. & Ávila, G. (2015). *Pseudomonas fluorescens* Migula, ¿control biológico o patógeno? *Protección Vegetal*, 30(3).
- Amenta, M., Molina, C., Creus, C. & Lamattina, L. (2015). Nitric Oxide in *Azospirillum* and Related Bacteria: Production and Effects. *Handbook for Azospirillum*, 155–180. https://doi.org/10.1007/978-3-319-06542-7_9.

- Angulo, A., Ferrera, R., Alarcón, A., Almaraz, J., Delgadillo, J., Jiménez, M., & García, O. (2018). *Crecimiento y eficiencia fotoquímica del fotosistema ii en plántulas de 2 variedades de Capsicum annuum L. inoculadas con rizobacterias u hongos micorrícicos arbusculares. Revista Argentina de Microbiología, 50(2), 178–188. doi:10.1016/j.ram.2017.03.011*
- Ashajyothi, M., Kumar, A., Sheoran, N., Ganeshan, P., Gogoi, R., Subbaiyan, G. & Bhattacharya, R. (2019). *Black pepper (Piper nigrum L.) associated endophytic Pseudomonas putida BP25 alters root phenotype and induces defense in rice (Oryza sativa L.) against blast disease incited by Magnaporthe oryzae. Biological Control, 104181. doi:10.1016/j.biocontrol.2019.104181.*
- 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, 38(8), 1209–1229.*
- Bilal, S., Shahzad, R., Khan, A., Kang, S., Imran, Q., Al-Harrasi, A. & Lee, I. (2018). *Endophytic Microbial Consortia of Phytohormones-Producing Fungus Paecilomyces formosus LHL10 and Bacteria Sphingomonas sp. LK11 to Glycine max L. Regulates Physio-hormonal Changes to Attenuate Aluminum and Zinc Stresses. Frontiers in Plant Science, 9. doi:10.3389/fpls.2018.01273*
- Braga, R., Dourado, M. & Araújo, W. (2016). *Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. Brazilian Journal of Microbiology. 47, 86–98. https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.005*

- Caldeira, A. T., Feio, S; Santos, J. & Roseiro, J. (2007). *Bacillus amyloliquefaciens* CCM1 1051 *in vitro* activity against wood contaminant fungi. *Annals of Microbiology*, 57(1), 29–33.
- Chagas, F. & Pupo, M. (2018). Chemical interaction of endophytic fungi and actinobacteria from *Lychnophora ericoides* in co-cultures. *Microbiological Research*, 212-213, 10–16.
- Chalen, B; Quiroz, C; Mogollon, C; Dominguez, J. & Rodriguez, T. (2019). Metabolome analysis in the microbial antagonism by liquid chromatography coupled with chemometrics algorithms. *Revista Perfiles* 22(2).
- Chica, J; Tirado, C. & Barreto, J. (s,f). Indicadores de competitividad del cultivo del arroz en Colombia y Estados Unidos. 33(2):16-31ISSN Impreso 0120-0135.
- Corrales, L, Méndez, G., Rojas, J. & Torres, N. (2017). *Bacillus spp*: una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. *Nova*, 15, p. 45.
<https://doi.org/10.22490/24629448.1958>.
- Creus, C. (2017) Inoculantes microbianos: piezas de un rompecabezas que aun requiere ser ensamblado. *Elsevier* vol 49 (3):207-209.
- Cruz, C. A., Gómez, L. & Uribe, D. (2017). *Manejo biológico del tamo de arroz bajo diferentes relaciones C:N empleando co-inóculos microbianos y promotores de crecimiento vegetal. Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(2), 47 - 62. doi:10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.70168
- Dane-Fedearroz. (2019). Colombia crece en productividad arrocera. *Revista arroz*. 67(541),
ISSN 0120-1441

- De la Cruz, M; Zamudio, A; Corona, J; González, R. & Rojas, M. (2014). Importancia y estudios de las comunidades microbianas en los recursos y productos pesqueros. *Ecosistemas Y Recursos Agropecuarios*, 2(4), 99–115.
- Ding, M.-Z., Song, H., Wang, E.-X., Liu, Y., & Yuan, Y.-J. (2016). Design and construction of synthetic microbial consortia in China. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 1(4), 230–235.
- Fasciglione, G., Casanovas, E. M., Yommi, A., Sueldo, R. & Barassi, C. 2012). *Azospirillum* improves lettuce growth and transplant under saline conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(12), 2518–2523.
- Fukami, J., Ollero, F. J., Megías, M. & Hungria, M. (2017). *Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with Azospirillum brasilense cells and metabolites promote maize growth. AMB Express*, 7(1).
doi:10.1186/s13568-017-0453-7
- Takegane, E, Plasencia, O, Hernández, A, Pérez, Y. & Martínez, B. (2017), Actividad antagónica de *Pseudomonas spp. fluorescentes* ante *Alternaria solani* Sorauer, patógeno de la papa (*Solanum tuberosum* L.) Rev. Protección Veg., Vol. 32, No. 3 ISSN: 2224-4697.
- García, H, Martínez, A, Hermosa, M, Monte, E, Aguilar, C. & González, E. (2017), Caracterización morfológica y molecular de cepas nativas de *Trichoderma* y su potencial de biocontrol sobre *Phytophthora infestans* Rev. mex. fitopatol 35(1), .
- Hashem, A., Abd_Allah, E. Alqarawi, A, Al-Huqail, A, Wirth, S. & Egamberdieva, D. (2016). *The Interaction between Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Endophytic Bacteria Enhances Plant Growth of Acacia gerrardii under Salt Stress. Frontiers in Microbiology*,

7. doi:10.3389/fmicb.2016.01089.

Izquierdo, L. (2019). interacciones microbianas en un consorcio de *Trichoderma virens* y *Bacillus velezensis* con actividad biocontroladora en el patosistema *Fusarium oxysporum* f. sp. *physali* – uchuva.

Jahanian, A., Chaichi, R., Rezaei, K., Rezayazdi, K. & Khavazi, K. (2012). The effect of plant growth promoting rhizobacteria (pgpr) on germination and primary growth of artichoke (*Cynarascolymus*). *Int. J. Agric. Crop Sci*, 4, 923–929.

Jambhulkar, P. P., Sharma, P., Manokaran, R., Lakshman, D. K., Rokadia, P., & Jambhulkar, N. (2018). Assessing synergism of combined applications of *Trichoderma harzianum* and *Pseudomonas fluorescens* to control blast and bacterial leaf blight of rice. In *European Journal of Plant Pathology*, 152(3): 747–757. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1519-3>

Jian, L., Bai, X., Zhang, H., Song, X., & Li, Z. (2019). Promotion of growth and metal accumulation of alfalfa by coinoculation with *Sinorhizobium* and *Agrobacterium* under copper and zinc stress. *PeerJ*, 7, e6875. doi:10.7717/peerj.6875

Johnson, D. (2018). *Bacterial Pathogens and Their Virulence Factors*.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-67651-7>

Karuppiah V, Vallikkannum Y Chen J. (2019). Simultaneous and sequential based co-fermentations of *trichoderma asperellum* GDS1009 and *bacillus amyloliquefaciens* 1841: a strategy to enhance the gene expression and metabolites to improve the bio-control and plant growth promoting activity. Doi:10.1186/s12934-019-1233-7

Karuppiyah, V., Sun, J., Li, T., Vallikkannu, M., & Chen, J. (2019). Co-cultivation of GDFS1009 and 1841 Causes Differential Gene Expression and Improvement in the Wheat Growth and Biocontrol Activity. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1068.

Lara C & Negrete J. (2015). Efecto de un bioinoculante a partir de consorcios microbianos nativos fosfato solubilizadores, en el desarrollo de pastos Angleton (*Dichantium aristatum*). Rev. colomb. biotecnol., Volumen 17, Número 1, p. 122-130, 2015. ISSN electrónico 1909-8758. ISSN impreso 0123-3475.

Latha, P., Anand, T., Prakasam, V., Jonathan, E. I., Paramathma, M., & Samiyappan, R. (2011). Combining *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Trichoderma* strains with organic amendments and micronutrient to enhance suppression of collar and root rot disease in physic nut. In *Applied Soil Ecology* (Vol. 49, pp. 215–223). <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.05.003>

Lazarovits, G., Turnbull, A., & Johnston-Monje, D. (2014). Plant Health Management: Biological Control of Plant Pathogens. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, pp. 388–399. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-52512-3.00177-7>

Li, N., Islam, M.T. & Kang, S. (2019) Secreted metabolite-mediated interactions between rhizosphere bacteria and *Trichoderma* biocontrol agents. PLoS ONE 14(12): e0227228. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227228>

Li, T., Tang, J., Karuppiyah, V., Li, Y., Xu, N., & Chen, J. (2020). Co-culture of *Trichoderma atroviride* SG3403 and *Bacillus subtilis* 22 improves the production of antifungal secondary metabolites. In *Biological Control*, 140(104122).

López, L., Carcaño, M; Lilia, T; Medina, G. & Armando, T. (2017). Actividad antifúngica y promotora del crecimiento de *Azospirillum brasilense* en *Zea mays* L. ssp. mexicana Archivos de fitopatología y protección de plantas, 50 (13-14), 727–743. doi: 10.1080 / 03235408.2017.1372247

Luna, M. & Mesa, J. R. (2016). Microorganismos eficientes y sus beneficios para los agricultores. *Revista Científica Agroecosistemas*, 4(2), 31–40.

Martínez, D. (2013). *Trichoderma spp.* y su función en el control de plagas en los cultivos. *Protección Vegetal*, 2(1).

Martins, P., de Medeiros, V., Barbosa, G., Barbosa, P., Kuklinsky, Ú. & Souza, C. (2019). Combined effect of *Pseudomonas sp.* and *Trichoderma aureoviride* on lettuce growth promotion. In *Biosciencioscience Journal*, 35(2): 419–430. <https://doi.org/10.14393/bj-v35n2a20198-41892>

McCarty, N. & Ledesma, R. (2019). Synthetic Biology Tools to Engineer Microbial Communities for Biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 37, 181–197. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.11.002>

Mendoza, H., Vilema, F. & Llor, A. (2019). El arroz y su importancia en los emprendimientos rurales de la agroindustria como mecanismo de desarrollo local de samborondón. *Universidad y Sociedad* vol.11 no.1 Cienfuegos ene.-mar. 2019. Epub 02-Mar-2019 *versión On-line* ISSN 2218-3620.

Molina, D., Baez, A., Quintero, V., Castañeda, M., Fuente, L., Bustillos, M. & Muñoz, J. (2017). Compatible bacterial mixture, tolerant to desiccation, improves maize plant growth. *PLOS*

ONE, 12(11), e0187913. doi:10.1371/journal.pone.0187913

- Moreno, A; Garcia, V; Reyes, J; Vasquez, J. & Cano, P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sostenible. revista colombiana de biotecnología. 1. 68
- Ochoa, D. & Restrepo, A. (2010) Consorcios microbianos: una metáfora biológica aplicada a la asociatividad empresarial en cadenas productivas agropecuarias. Ciencia Económica, 18(2), 55-74
- Pan S. K. and Amrita Das. (2010). In vivo interaction in antagonistic potential of *Trichoderma* spp. and *Pseudomonas fluorescens*. Journal of Biological Control, 24 (3): 263–267.
- Planchamp, C., Glauser, G., & Mauch-Mani, B. (2015). *Root inoculation with Pseudomonas putida KT2440 induces transcriptional and metabolic changes and systemic resistance in maize plants. Frontiers in Plant Science, 5.* doi:10.3389/fpls.2014.00719
- Purnick, P. E. M., & Weiss, R. (2009). The second wave of synthetic biology: from modules to systems. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology, 10*(6), 410–422.
- Rajasekhar L, Dr Satish K Sain and Divya J. (2016) evaluation of microbial consortium for ‘plant health management’ of pigeon pea. National Institute of plant Health Management, Hyderabad, Volume-6, Issue-2.
- Raklami, A., Bechtaoui, N., Tahiri, A., Anli, M., Meddich, A., & Oufdou, K. (2019). *Use of Rhizobacteria and Mycorrhizae Consortium in the Open Field as a Strategy for Improving Crop Nutrition, Productivity and Soil Fertility. Frontiers in Microbiology, 10.* doi:10.3389/fmicb.2019.01106

- Rariz, G., Ferrando, L., Echegoyen, N., & Fernández Scavino, A. (2017). Antagonism between *Azospirillum brasilense* Az39 and *Pseudomonas oryzae*, a seed-borne endophyte, in growing rice plants. *Agron. Noroeste Argent*, 37 (1), 45–56.
- Reséndez, M., Mendoza, G., Carrillo, R., Arroyo, J. & Ríos, P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20, 68–83.
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707>
- Rivera, W., Obregón, M., Morán, M; Hermosa, R. & Monte, E., (2019) *Trichoderma asperellum* biocontrol activity and induction of systemic defenses against *Sclerotium cepivorum* in onion plants under tropical climate conditions, *Biological Control* doi: 2019.104145
- Sánchez, D; Moreno, G. & Santos, W. (2019). *Plant Growth Promotion and Biocontrol of Pythium ultimum by Saline Tolerant Trichoderma Isolates under Salinity Stress. International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(11), 2053. doi:10.3390/ijerph16112053
- Santos, M., Nogueira, M. & Hungria, M. (2019). Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. *AMB Expr* 9, 205 (2019). <http://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>
- Sarwar, A., Brader, G., Corretto, E., Aleti, G., Abaidullah, M., Sessitsch, A. & Hafeez, F. (2018). Análisis cualitativo de biosurfactantes de especies de *Bacillus* que exhiben actividad antifúngica. *PLOS ONE*, 13 (6), e0198107. doi: 10.1371 / journal.pone.0198107
- Stanojevic, O., Milijasevic-Marcic, S., Potocnik, I., Stepanovic, M., Dimkic, I., Stankovic, S. &

- Beric, T. (2016). Isolation and identification of *Bacillus* spp. from compost material, compost and mushroom casing soil active against *Trichoderma* spp. *Archives of Biological Sciences*, 68(4), 845–852.
- Sulochana, M., Jayachandra, S., Kumar, S., Parameshwar, A., Reddy, K. & Dayanand, A. (2014). Siderophore as a potential plant growth-promoting agent produced by *Pseudomonas aeruginosa* JAS-25. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(1), 297–308.
- Talboys, P., Owen, D., Healey, J., Withers, P. & Jones, D. (2014). Auxin secretion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 both stimulates root exudation and limits phosphorus uptake in *Triticum aestivium*. *BMC Plant Biology*, 14(1), 51. doi:10.1186/1471-2229-14-51
- Um, S., Fraimout, A., Sapountzis, P., Oh, D. & Poulsen, M. (2013). The fungus-growing termite *Macrotermes natalensis* harbors bacillaene-producing *Bacillus* sp. that inhibit potentially antagonistic fungi. *Scientific Reports*, 3, 3250
- Velmourougane, K., Prasanna, R., Chawla, G., Nain, L., Kumar, A. & Saxena, A. (2019). Trichoderma -Azotobacter biofilm inoculation improves soil nutrient availability and plant growth in wheat and cotton. *Journal of Basic Microbiology*, Vol. 59, pp. 632–644. <https://doi.org/10.1002/jobm.201900009>.
- Villarreal M, Villa E, Cira, L Estrada, M, Parra, F, De los Santos-Villalobos S. (2017). The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1): 95-130.
- Wang, Z., Li, Y., Zhuang, L., Yu, Y., Liu, J., Zhang, L., Wang, Q. (2019). A Rhizosphere-Derived Consortium of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum* Suppresses Common

Scab of Potato and Increases Yield. Computational and Structural Biotechnology Journal, 17, 645–653. doi:10.1016/j.csbj.2019.05.003

Wonglom, P., Ito, S. & Sunpapao, A. (2020). *Volatile organic compounds emitted from endophytic fungus Trichoderma asperellum T1 mediate antifungal activity, defense response and promote plant growth in lettuce (Lactuca sativa)*. *Fungal Ecology*, 43, 100867. doi:10.1016/j.funeco.2019.100867.

Zhang, X., Zhao, Y., Li, Y., Zhang, G., Peng, Z., & Zhang, J. (2017). *Enhancing auxin accumulation in maize root tips improves root growth and dwarfs plant height*. *Plant Biotechnology Journal*, 16(1), 86–99. doi:10.1111/pbi.12751

ANEXOS

Anexo 1. Medios de cultivo

Caldo LB: LURIA BERTANI

Composición

Peptona tríptica de caseína 10 g/L

Extracto de levadura 5 g/L

NaCl 10 g/L

Ajustar pH $7,2 \pm 0,2$

Medio KING B

Composición

Peptona 20 g/L

$K_2 HPO_4$ 1,8 g/L

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,5 g/L

pH final 7,1

Glicerol o glicerina 10 mL/L, se le adiciona agar.

Observación: medir pH antes de adicionar el glicerol.

Agar Nutritivo

Composición

Extracto de carne 3 g

Peptona bacteriológica 10 g

Cloruro sódico 5 g

Se le adiciona 15 g de agar por litro se ajusta el pH a 7,2-7,4.

Medio ROJO CONGO

Composición

Ácido málico 5,0 g/L

K₂ HPO₄ 0,5 g/L

MgSO₄ 7H₂O 0,02 g/L

NaCl 0,1 g/L

Extracto de levadura 0,5 g/L

FeCl₃ 6H₂O 0,015 g/L

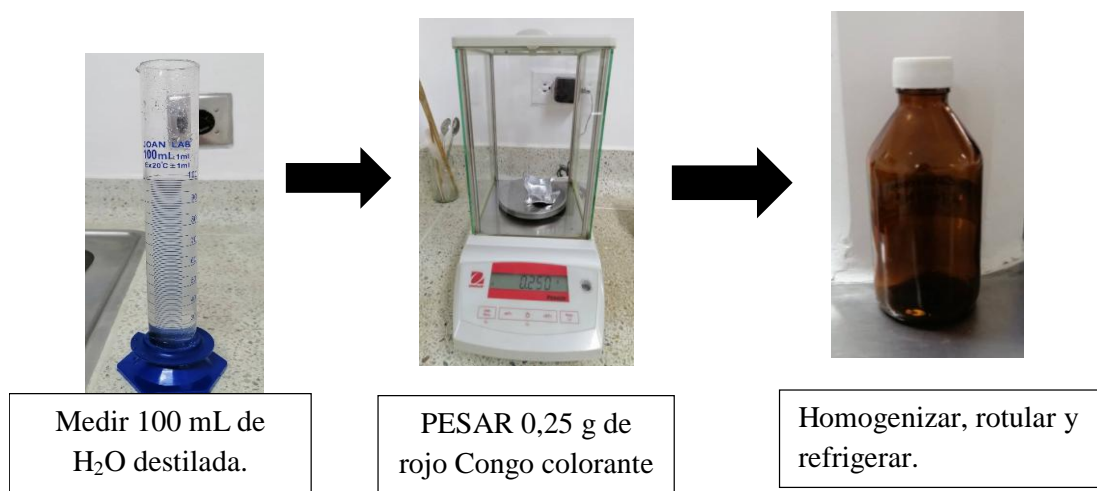
KOH 4,8 g/L

Agar- Agar 20 g/L

pH final 7,0

Observaciones: luego de autoclavar el medio se le adiciona el colorante rojo Congo 15 mL/L
estéril homogenizando que el medio quede uniforme.

Preparación rojo Congo colorante



Medio BATATA

Composición

Papa 200 g/L

Ácido álico 2,5 g/L

Sacarosa 2,5 g/L

Solución micronutrientes 2 mL

Solución vitaminas 1 mL

Observaciones: pesar 200 g de papa, pelar muy bien y lavar, hervir durante 30 min en agua destilada. Enseguida filtrar con gasa y algodón. Mezclar las cantidades de Ácido málico y sacarosa en agua destilada hasta 50 mL y ajustar el pH a 6,5-7,0 con KoH. Adicionar al filtro esta solución y las soluciones de micronutrientes y vitaminas completar el volumen

para 1 L con agua destilada, adicionar 20 g de agar/L.

Preparación de Solución Micronutrientes

Composición

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,04 g/L

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,20 g/L

H_3BO_3 1,40 g/L

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,00 g/L

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,75 g/L

Observaciones: preparar en autoclave los 1000 mL de H_2O destilada, adicionar todos los reactivos, rotular, almacenar y refrigerar.

Preparación Solución Vitaminas

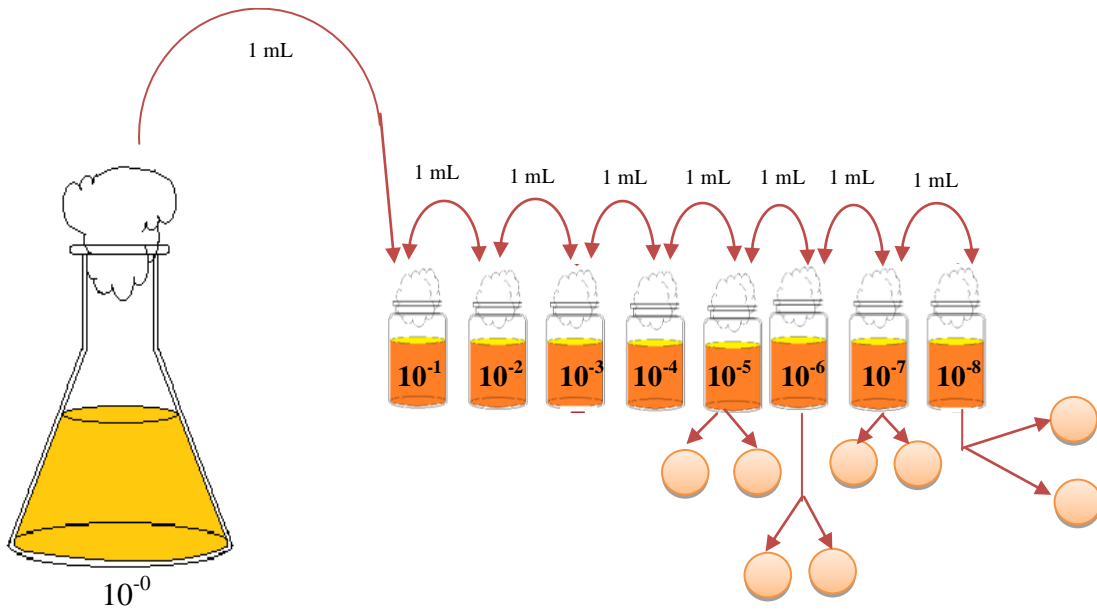
Composición

Biotina 10 mg/100 mL

Piridixol 20 mg/100 mL

Observaciones: disolver en 100 mL de H_2O destilada esteril, adicionar los componentes, calentar en baño maría para disolver, almacenar en frasco ambar, autoclavar rotular y refrigerar.

Anexo 2. Procedimiento para el Recuento de la población bacteriana



Anexo 3. Formato para el recuento de la población bacteriana

Cepas	Replica	Diluciones				Promedio
RzP047 A1	1	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	
	2					
RzP064 A2	1					
	2					
RzA027 P1	1					
	2					
RzA035 P2	1					
	2					
FzB42 B1	1					
	2					
Eu45 B2	1					
	2					

Anexo 4. Preparación del inóculo y recuento de hongos en cámara Neubauer

Preparación del inóculo.

Para la preparación del inóculo se debe tener:

- De 15 a 20 cajas Petri con agar PDA inoculadas con fragmentos de hongos y ± 5 días de incubación.
- 1000 mL de H₂O destilada estéril.

Con la mayor asepsia posible y siempre al lado del mechero se procede de la siguiente manera.

- Con la ayuda de un asa redonda previamente esterilizada y quemada al mechero hacer un leve raspado desprendiendo todas las células del agar y suspender el material recolectado en el H₂O destilada estéril.
- Tomar una pequeña muestra con una micropipeta y agregar el contenido en cámara Neubauer.
- Contar en microscopio, así obteniendo la concentración de 10^8 teniendo en cuenta la fórmula.

$$C = N K D$$

N: Σ # células (Conteo 5 cuadrantes)

K: Constante (Cámara $5 * 10^4$)

D: El Inverso de la Dilución.

Anexo 5. Protocolo de desinfección implementado en la investigación

El siguiente protocolo de desinfección es actualmente implementado en el laboratorio de investigación en biología aplica (LB105).

1. Usar siempre los elementos de protección personal como:
 - a. Bata manga larga
 - b. Gorro
 - c. Guantes
 - d. Tapabocas
 - e. Pantalón en buen estado
 - f. Zapatos cerrados
2. Limpiar el área de trabajo con una solución jabonosa y esponja.
 - a. Retirar con un paño húmedo y limpio
3. Aplicar una solución de TEGO al 2% con atomizador y dejar actuar por 15 minutos.
 - a. Retirar con un paño húmedo y limpio.
4. aplicar alcohol al 70% con atomizador, dejar actuar.
5. Encender los mecheros 5 minutos antes de empezar los procedimientos.

Anexo 6. Enfrentamiento de rizobacterias y el hongo *T. asperellum* agar nutritivo

Para la actividad antagónica fue indispensable la búsqueda de diferentes medios de cultivos que se ajustaran a las necesidades metabólicas tanto de las bacterias como de los hongos. En el agar nutritivo el hongo *T. asperellum* logro cubrir con su micelio la superficie del medio.

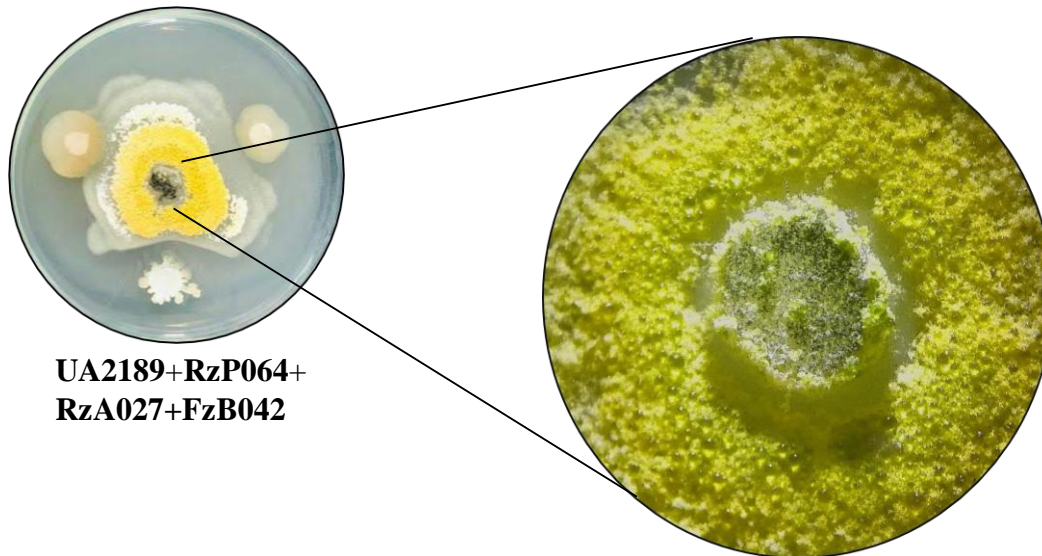
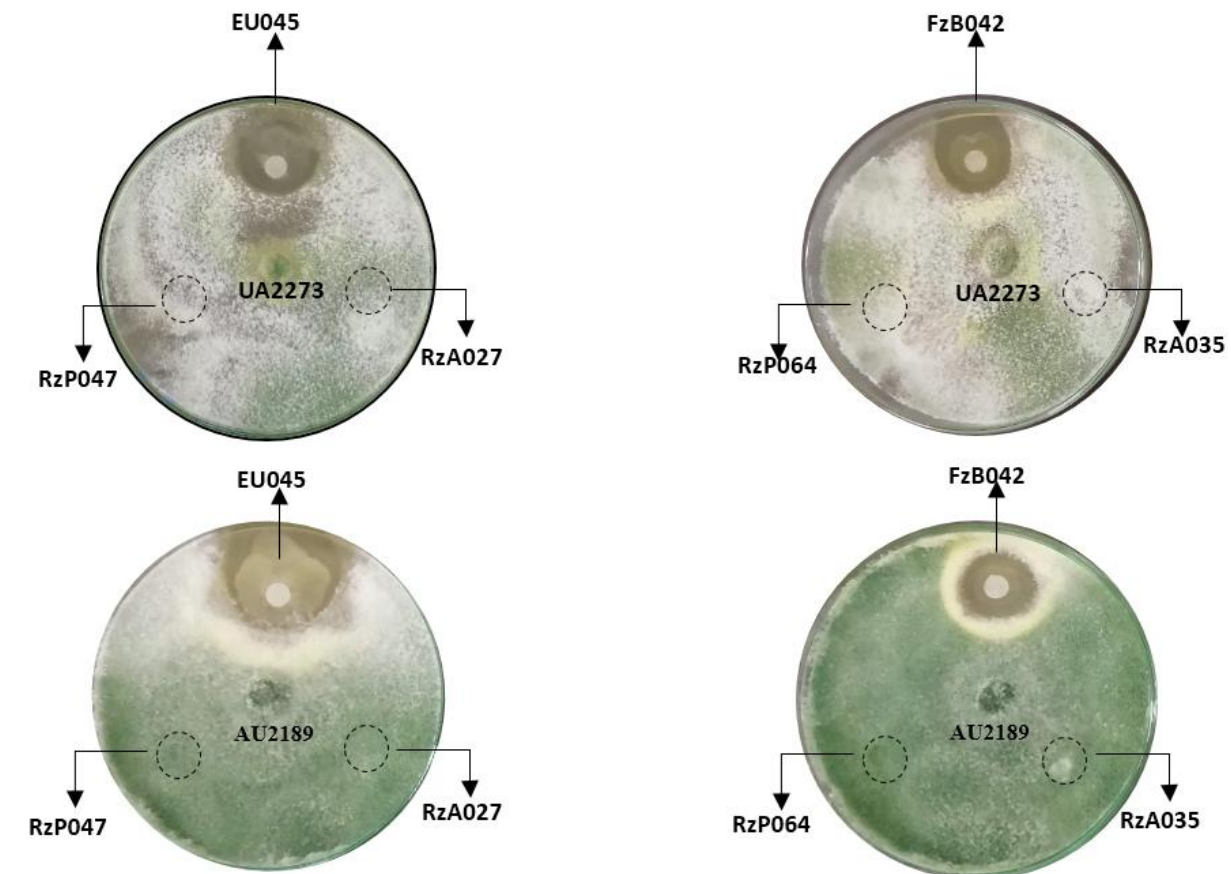


Fig. Reacción del hongo *T. asperellum* en medio agar nutritivo durante el enfrentamiento con las Rizobacteria.

Anexo 7. Enfrentamiento de rizobacterias y el hongo *T. asperellum* agar PDA

En agar Patata Dextrosa las cepas RzP064 y RzP047 del género *Azospirillum sp.* no Presentaron crecimiento en un periodo de 7 días bajo condiciones de temperatura apropiadas. Los discos de *Pseudomonas putida* RzA035 y RZA027 crecieron a un ritmo muy lento dándole ventaja al crecimiento de *T. asperellum*.(fig..)



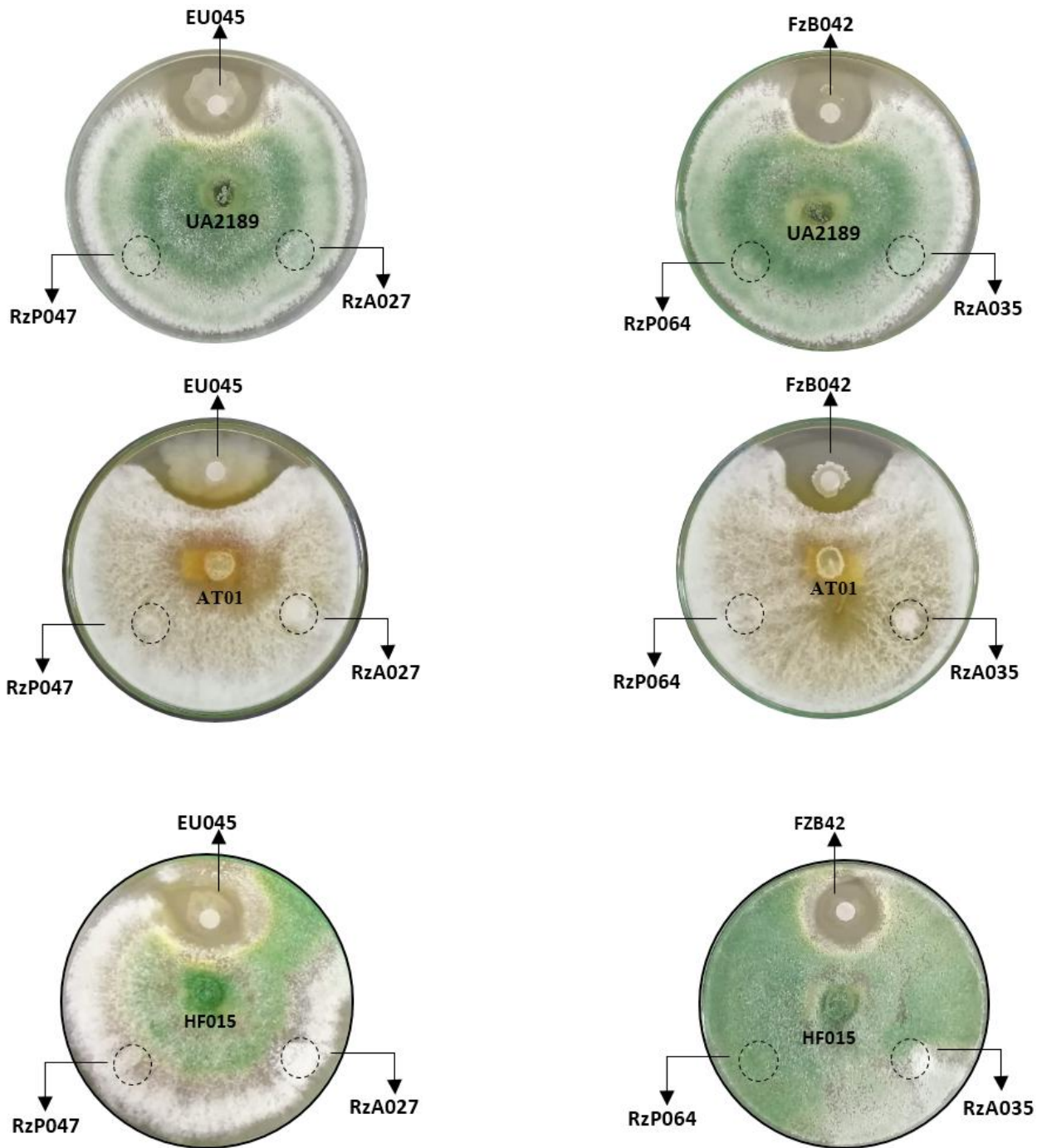
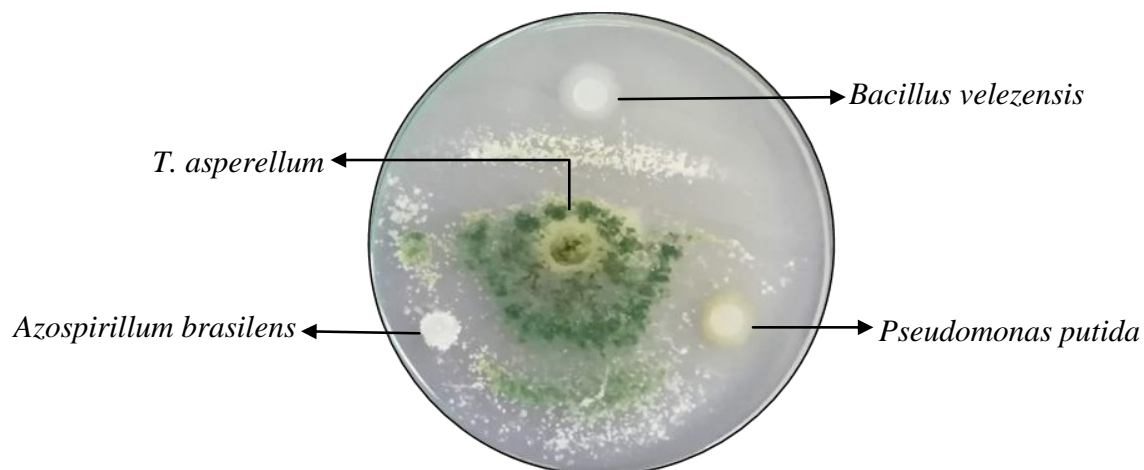


Figura 3. Enfrentamientos de las cepas bacterianas con las cepas de *T. asperellum*. en medio PDA.

El medio que tuvo mejor respuesta a los requerimientos de las cepas fue el medio Batata, ya que sus componentes son ricos en infusión de papa y sacarosa, nutrientes que se necesitan para que los microorganismos de estos géneros puedan proliferarse.



Enfrentamientos de las cepas bacterianas con las cepas de *T. asperellum*. en medio Batata.

Lo anterior, sugiere que esta cepa podría no ser sensitiva y resistir a los metabolitos producidos por las células de *Pseudomonas* fluorescentes, como lo indicó Maroniche *et al.* (2018), quienes registraron variabilidad del efecto inhibitorio *in vitro* e *in planta* de trigo entre cepas de *Pseudomonas* spp. y *A. brasilense* por la producción de un efector antibacterial de la familia K1-T6SS y metabolitos difusibles en el medio de cultivo que además, están relacionados sólo con algunos grupos filogenéticos de *Pseudomonas* spp.