PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Evaluación *in vitro* e *in planta* de la acción conjunta biocontroladora de cepas de *Pseudomonas* spp. y *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium oxysporum* YC-3 en plántulas de uvilla (*Physalis peruviana* L.)

DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MICROBIÓLOGA

ALBA LUCÍA SORIA DELGADO

DIRECTORA: Mtr. Jeniffer Yánez

Quito, 2020

DEDICATORIA

Para aquellos que trabajan en la tierra sacando la fuente de vida que alimenta a las grandes ciudades. Sepan que el suelo trae la enfermedad y la cura, que ningún químico reemplaza la naturaleza y solo basta con mirar de cerca.

Lucía Soria.

AGRADECIMIENTOS

Ante todo, agradezco a mis padres, quienes me han acompañado, apoyado y amado a lo largo de toda mi carrera y mi vida, quienes nunca dejaron de creer mí y dedicaron todo su trabajo para mi desarrollo profesional. Agradezco a mis hermanos, quienes compartieron todo el esfuerzo de la carrera. Agradezco a mi directora Jeniffer Yánez, por haberme brindado la oportunidad de trabajar en el mundo del control biológico, por apoyar mi proyecto y confiar en mi criterio. Asimismo, agradezco al Doctor Martín Marcial, quién me apoyó para consolidar mi trabajo, por su generosidad, valiosas contribuciones, por su conocimiento y su guía.

Expreso mi agradecimiento al Laboratorio de Fitopatología de Agrocalidad, quienes me permitieron desarrollar la fase *in vivo* de mi proyecto y me ayudaron durante toda la experimentación. También agradezco a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, que fue mi hogar por cinco años y me brindó el conocimiento y las herramientas para convertirme en una profesional. Agradezco a todos los docentes que participaron en mi desarrollo académico, quienes me transmitieron su pasión por la Microbiología.

Les expreso mi profunda gratitud a mis compañeros de laboratorio, a Sebastián Aguilar, por su amistad, apoyo y por acompañarme desde el principio y hasta el final de la carrera. Agradezco al Msc. Andrés Zabala y a la B.Q Dayana Yánez, quienes me supieron guiar en todo el ámbito molecular. También agradezco a mis compañeros de aula, por compartir toda clase de experiencias durante la carrera. Agradezco a Martín Arellano, David Bustos, Juliana Checa, Jaritza Villafuerte, Shirley Arreaga, Nicolás Molina y Alejandro Castro por todo su apoyo y amistad incondicional.

Por último, quiero agradecer a Mario Hinojosa, quien me enseñó a no renunciar por complicada que sea la situación, me brindó su infinito apoyo, su paciencia y me llenó de fortaleza, vida y alegría. Gracias.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN. - 1

PALABRAS CLAVES. - Biocontroladores, consorcio, *Fusarium oxysporum*, *Pseudomonas* spp., *Trichoderma* spp. 2

INTRODUCCIÓN. - 2

MATERIALES Y MÉTODOS. - 6

Reactivación de cepas biocontroladoras y fitopatógenas.- 6

Aislamiento de *Pseudomonas* spp. - 6

Caracterización bioquímica e identificación molecular de *Pseudomonas* spp. .- 7

Pruebas de antagonismo *in vitro* 8

Pruebas individuales *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium oxysporum* YC-3.- 8

Pruebas individuales *Pseudomonas* spp. frente a *Fusarium oxysporum* YC-3.- 9

Pruebas conjuntas 10

Pruebas de compatibilidad. - 10

Pruebas conjuntas de antagonismo de *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. frente a *F. oxysporum*. - 10

Evaluación de la promoción de crecimiento y antagonismo del consorcio *Pseudomonas* spp. y *Trichoderma* spp. frente a *F. oxysporum* YC-3 *in planta* en condiciones de invernadero. - 11

Análisis de datos obtenidos. - 14

RESULTADOS. - 14

DISCUSIÓN. - 17

CONCLUSIONES. - 22

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y CITAS EN TEXTO. - 22

FIGURAS 33

TABLAS. - 47

LISTA DE FIGURAS

Figura No. 1. Proceso de obtención de *Pseudomonas* spp 33

Figura No. 2. Electroforesis en gel de agarosa al 3%.....34

Figura No. 4 Enfrentamiento de *Trichoderma* spp. (T) vs *F. oxysporum* YC-3 (F, Fitopatógeno) en el sexto día. 35

Figura No. 5 Enfrentamiento de *Trichoderma* spp. (T) vs *F. oxysporum* YC-3 (F, Fitopatógeno) en el onceavo día. 36

Figura No. 6 Valoración del micoparasitismo de las cepas de *Trichoderma* spp. sobre *F. oxysporum* YC-3.....37

Figura No. 7 *Pruebas de antagonismo in vitro de Pseudomonas spp. (P)* frente a *F. oxysporum* YC-3 (F, Fitopatógeno) en el onceavo día. 38

Figura No. 8 Pruebas de compatibilidad entre cepas de *Trichoderma* spp. (T) y cepas de *Pseudomonas* spp. (P) con mayor porcentaje de inhibición micelial contra el patógeno. 39

Figura No. 9 Tinción Gram de la compatibilidad entre *T. gamsii* (PI AS) y *P. baetica* (TagR16). 40

Figura No. 10 Comparación de los PICR de los enfrentamientos conjuntos e individuales. 41

Figura No. 11. Observación del crecimiento radial de *F. oxysporum* YC-3 (F, Fitopatógeno) en presencia del consorcio *Pseudomonas* spp (P). y *Tichoderma* spp. (T) durante 11 días. 42

Figura No. 12. *P. koreensis* cepa HzR20 (P) y *T. atroviride* cepa SP2 AS (T) frente *F. osysporum* YC-3 (F). 43

Figura No. 13. Porcentaje de incidencia de la enfermedad observada durante cinco semanas 44

Figura No. 14. Mapa calorimétrico del porcentaje de severidad de la marchitez vascular durante cinco semanas de observación. 45

Figura No. 15. Plantas de uvilla infectadas con los tratamientos evaluados después de cinco semanas de observación. 46

Figura No. 16. Plantas de uvilla con los tratamientos evaluados después de cinco semanas de observación. 46

LISTA DE TABLAS

Tabla No. 1. Aislados bacterianos obtenidos de los muestreos realizados en rizósfera y suelo de los cultivos de *Physalis peruviana* en diferentes plantaciones de la Sierra centro y norte del Ecuador. 47

Tabla No. 2. Pruebas bioquímicas utilizadas para la caracterización metabólica de los aislados de *Pseudomonas* spp. 48

Tabla No. 3. Identificación molecular de cepas obtenidas de *Pseudomonas* spp. 49

Tabla No. 4. Porcentajes de inhibición de crecimiento radial (PICR%) por enfrentamiento de las cepas de *Trichoderma* spp. vs *F. oxysporum* YC-3. 50

Tabla No. 5. Promedios porcentuales de la inhibición micelial por el enfrentamiento de las cepas de *Pseudomonas* spp. vs *F. oxysporum* YC-3. 51

Tabla No. 6. Pruebas de compatibilidad de *Pseudomonas* spp. junto a *Trichoderma* spp..52

Tabla No. 7. Promedios de los resultados obtenidos de evaluación en la capacidad antagonista de los consorcios frente a *F. oxysporum* YC-3 en condiciones de invernadero. Tukey $p<0.05$. 53

Tabla No. 8. Promedios de los resultados obtenidos en los ensayos de la capacidad biofertilizante de los consorcios. Tukey $p<0.05$. 54

In vitro and *in planta* evaluation of the joint biocontroller action of strains of *Pseudomonas* spp. and *Trichoderma* spp. against *Fusarium oxysporum* YC-3 in plants of goldenberry (*Physalis peruviana* L.)

Evaluación *in vitro* e *in planta* de la acción conjunta biocontroladora de cepas de *Pseudomonas* spp. y *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium oxysporum* YC-3 en plántulas de uvilla (*Physalis peruviana* L.)

***Lucía Soria[1]**

[1]Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

*aluciadelgado307@gmail.com

RESUMEN. -

Por primera vez, *Fusarium oxysporum* YC-3 fue reportado como el agente causal del marchitamiento vascular (MV) en cultivos de uvilla, un producto de importancia económica creciente en Ecuador. El presente estudio propone, el uso de los biocontroladores *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp., como alternativa al uso de agroquímicos contaminantes, en el control de *F. oxysporum* YC-3 *in vitro* y en condiciones de invernadero. En los ensayos de laboratorio se realizaron pruebas de enfrentamiento dual, pruebas de inhibición contra el patógeno y pruebas de compatibilidad entre los biocontrolares para la formación de consorcios con mayor efecto contra *F. oxysporum* YC-3. Los consorcios compatibles y de mayor efecto antagonista fueron evaluados en plántulas de uvilla enfermas con MV, y se determinó su capacidad para reducir la incidencia y severidad de la enfermedad. De esta forma, los consorcios formados por *T. atroviride* junto con *P. fluorescens, P. baetica* y *P. putida,* redujeron la severidad del MV en un 0 a 11 %. Además, todas las plántulas tratadas con los biocontroladores presentaron mejor crecimiento en comparación con las plantas testigo. Los resultados de este estudio demuestran

la alta capacidad antagonista y biofertilizante de los consorcios utilizados a nivel de invernadero, y se espera potencial éxito a nivel de campo.

PALABRAS CLAVES. - Biocontroladores, consorcio, *Fusarium oxysporum, Pseudomonas* spp., *Trichoderma* spp.

ABSTRACT.-

For the first time, *Fusarium oxysporum* YC-3 was reported as the causative agent of vascular wilt (VW) in goldenberry crops, a product of increasing economic importance in Ecuador. The present study proposes the use of the biocontrollers agents *Trichoderma* spp. and *Pseudomonas* spp., as an alternative to the use of polluting agrochemicals, in the control of *F. oxysporum* YC-3 *in vitro* and in greenhouse conditions. In laboratory, we used dual culture tests, inhibition tests against the pathogen and compatibility tests between the biocontrollers for the consortium formation with greater effect against *F. oxysporum* YC-3. The compatible consortiums with the greatest antagonistic effect were evaluated in goldenberry seedlings with VW, in order to determined their ability to reduce the incidence and severity of the disease. Therefore, the consortiums formed by *T. atroviride*, *P. fluorescens*, *P. baetica* and *P. putida*, reduced the severity of MV in 0 - 11%. In addition, all seedlings treated with the biocontrollers had better growth compared to control plants. The results of this study showed the high antagonistic and biofertilizing capacity of the consortiums used at the greenhouse level, and it is expected a potential success at the field.

KEY WORDS. - Biocontrollers, consortium, *Fusarium oxysporum, Pseudomonas* spp., *Trichoderma* spp.

INTRODUCCIÓN. -

La uvilla (*Physalis peruviana* Linnaeus) es una planta herbácea perenne, vertical, de producción industrial reciente en Ecuador y endémica de la región andina de América del Sur (Puente et al.

2011). Los frutos de este cultivo producen alrededor de 1000 kilogramos por cada seis hectáreas de plantación (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2018). Gracias al intenso sabor de su fruto y sus propiedades nutricionales y medicinales, la producción de *P. peruviana* representa una actividad de importancia económica para pequeños y medianos agricultores (López. et al 2013). En ese contexto, su producción ha incrementado en el Ecuador durante la última década, especialmente en las provincias del Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi y Tungurahua, donde se establecen sistemas socio-productores de efectos positivos en la región y un gran índice de ganancias en el mercado internacional (Moreno-Miranda et al. 2019).

La creciente producción de uvilla conlleva también el incremento en la incidencia de varias enfermedades, la proliferación de plagas y la infertilidad del suelo ocasionada por la sobreexplotación de los recursos naturales (Ortiz 2015). Entre los patógenos más perjudiciales, por su alta incidencia para el cultivo de uvilla, se encuentra *Fusarium oxysporum* perteneciente al orden Hypocreales y a la familia Nectriaceae. Este es un hongo filamentoso, necrotrófico, cosmopolita, agente causal de la enfermedad de la marchitez vascular (Agrios 2012). Este organismo se encuentra con frecuencia en suelo rizosférico y se presenta en cultivos que crecen a una altura mayor a 1600 m.s.n.m.; característica que corresponde a toda la zona de producción de uvilla en la sierra ecuatoriana (Pássaro 2014). En una investigación realizada por Yánez et al. (2019) se alertó sobre los potenciales problemas que *F. oxysporum* representa para la producción del fruto en el Ecuador y se sugirió la necesidad de implementar programas para controlar la enfermedad en el país.

Las soluciones convencionales a este problema se centran en el uso de agroquímicos contaminantes y altamente tóxicos, las cuales controlan las enfermedades de forma parcial y a corto plazo (Góngora y Rojas 2016; Pássaro 2014). Promover el uso de controladores biológicos ayuda a obtener cultivos orgánicos que aseguren la ausencia de enfermedades y residuos de

agroquímicos en el fruto para mantener su salud, calidad y seguridad alimentaria, además de un manejo sustentable de los recursos naturales (Cárdenas 2018; Fischer et al. 2014).

Trichoderma spp. es un biocontrolador reconocido por su alta eficacia contra varios patógenos (Camargo y Ávila 2014). Este es un hongo filamentoso biotrófico perteneciente a la división Ascomycota, orden Hypocreales y a la familia Hypocreaceae, cuyo nicho ecológico radica en la zona rizosférica y foliar de las plantas (Schmoll y Schuster 2010). *Trichoderma* spp. se emplea en la agricultura, en una gran variedad de formulaciones que aprovechan sus múltiples mecanismos de acción, tales como: la producción de sustancias antimicrobianas (quitinasas, proteasas y glucanasas), la competencia por nutrientes y espacio, y la inhibición o degradación de pectinasas y otras enzimas esenciales para la penetración en la filósfera por parte de los organismos fitopatógenos (Howell 2002; Gupta et al. 2014). *Trichoderma* spp. posee una gran diversidad taxonómica y genética. Muchas de sus especies y variedades actúan eficazmente contra varios fitopatógenos (Chaverri et al. 2015). Sin embargo, la acción antagonista de *Trichoderma* es específica dependiendo del ambiente y cultivo en el que se encuentre (Singh et al. 2011). Por lo tanto, su acción suele limitarse a los patógenos extraídos del mismo cultivo que el biocontrolador (Martínez et al. 2013).

A su vez, algunas especies de *Pseudomonas* han sido referidas como rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas (por sus siglas en inglés PGPR) (Kloepper y Schroth 1978; Singh et al. 2018). Al igual que otros géneros de PGPRs, este bacilo Gramnegativo posee mecanismos directos e indirectos que tienen efecto en el crecimiento de las plantas (Singh et al. 2018). Entre los mecanismos directos se encuentra la solubilización de sustratos, que facilita la absorción de nutrientes esenciales del ambiente por la planta, y la síntesis de compuestos microbianos que aportan al desarrollo vegetal. Asimismo, los mecanismos indirectos consisten en la prevención o mitigación de los efectos negativos de varios fitopatógenos, como la inducción a la resistencia

sistémica en la planta para controlar e impedir infecciones (Maheshwari 2010). El género *Pseudomonas* no solo actúa como antagonista y como promotor de crecimiento, también actúa como inductor (*elicitor*) en la tolerancia del estrés abiótico en las plantas, como la concentración de sal o la deficiencia o exceso de nutrientes. Por ejemplo, *Pseudomonas putida*, al colonizar la superficie de las raíces, secreta hormonas que suprimen el crecimiento de microorganismos fitopatógenos (Singh et al. 2018; Kannan y Bastas 2015).

En el Ecuador, varias empresas como BioGreen (2010), Ecofertil (2019), Fenecsa (2013) y Agritop (2015) comercializan diferentes formulaciones conteniendo cepas de múltiples especies de *Trichoderma*. Sin embargo, según el Ministerio de Agricultura (2018), varios agricultores han optado por el uso tradicional de fungicidas químicos debido a la pobre acción de las formulaciones comercializadas de *Trichoderma* spp. Adicionalmente, *Pseudomonas* spp. no se ha comercializado aún en el Ecuador a pesar de los estudios *in vitro* realizados en diferentes patógenos y cultivos.

Ambos controladores biológicos (*Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp.) han sido reportados por sus efectos positivos en el control de varias enfermedades gracias a su interacción sinérgica dentro de un consorcio. (Yadav et al. 2013). Los consorcios microbianos son inoculantes de poblaciones microbianas asociadas en una mezcla sinérgica y sintrófica que mejoran el crecimiento y el flujo de absorción de nutrientes. Estas asociaciones microbianas poseen diversas funciones en la rizósfera, potencian la resistencia a condiciones adversas en el ambiente, mejoran la estabilidad de los miembros en el tiempo y son consideradas las soluciones más prometedoras para los problemas de producción en la agricultura ecológica (Ochoa Carreño y Montoya Restrepo 2010; Sekar et al. 2016). En relación al cultivo de uvilla en Ecuador, no existen estudios previos que describan la formación de consorcios microbianos biocontroladores y su efecto *in vitro* e *in planta*. En este contexto, el presente estudio evaluó la capacidad biocontroladora, *in vitro* e *in planta*, de *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. contra

Fusarium oxysporum YC-3 en plántulas de uvilla. El efecto individual y conjunto de los biocontroladores frente al patógeno fue evaluado, para determinar si juntos incrementan el antagonismo con respecto a la acción individual. Además de la capacidad antagonista, también se evaluó el efecto fertilizante de los consorcios formados en plantas de uvilla.

MATERIALES Y MÉTODOS. -

Reactivación de cepas biocontroladoras y fitopatógenas.-

Se utilizaron tres cepas biocontroladoras de *Trichoderma* spp., identificadas previamente por Silva (2018) (disertación no publicada) mediante la amplificación de la región ITS (Internal Transcribed Spacer) de los genes 18s ARNr y 28s ARNs, a partir de cultivos de uvilla del centro y norte del Ecuador. Las cepas utilizadas fueron: *T. atroviride* (SP2 AS), *T. gamsii (*PIAS) y *T. gamsii* (RB1 CS). Éstas fueron reactivadas en agar papa dextrosa (PDA) y se incubaron por siete días a 25 ^{o}C (Aquiahuatl y Pérez 2013). De la misma forma, se reactivó la cepa de *Fusarium oxysporum* YC-3 aislada de muestras de plantas de uvillas enfermas con síntomas de marchitez vascular (Yánez 2019).

Aislamiento de *Pseudomonas* spp. -

Se realizó un muestreo aleatorio estratificado de suelo rizosférico y raíces de plantas sanas de uvilla obtenidas de cinco plantaciones provenientes del cantón Cotacachi de la provincia de Imbabura, y tres plantaciones del cantón Sigchos de la provincia de Cotopaxi de la Sierra centro y norte del Ecuador (Tabla No. 1). Las muestras de suelo (10 g) fueron homogenizadas por agitación, durante 5 minutos, en 90 mL de agua peptonada 0.1 % (p/v) (Avendaño et al. 2006). Por otra parte, se removió el suelo superficial de las raíces, mediante un lavado con agua destilada estéril y 10 g de cada muestra fueron sumergidos en 90 mL de una solución de Tween 80 al 0.1% (v/v), agitándose por 5 minutos (Rodríguez y Martin 2009). A partir de suspensiones de los dos tipos de muestras se efectuaron diluciones seriadas en base 10 hasta la dilución 10^{-7}, que fueron sembradas en agar King B e incubadas a 25 ± 3 ^{o}C por 48 horas. Para la subsecuente

identificación y caracterización bioquímica, se seleccionaron las colonias que presentaron fluorescencia al ser expuestas a luz ultravioleta (UV) (Rodríguez y Martin 2009).

Caracterización bioquímica e identificación molecular de *Pseudomonas* spp. .-

Las colonias que presentaron fluorescencia bajo luz UV, se re-aislaron en placas de agar nutritivo (AN) e incubaron por 24 horas a 28 ^{o}C. Posterior a la incubación, se realizó tinción diferencial de Gram para la descripción morfológica microscópica de las bacterias obtenidas. La caracterización bioquímica se realizó mediante la matriz de Schaad (1994) citada por Rodríguez y Martin (2009), con las siguientes pruebas: urea, citrato, lisina carboxilasa, caldo nitrato, oxidación y fermentación de la glucosa y medio de sulfuro indol para movilidad (SIM).

Para el análisis molecular de los aislados se obtuvo ADN de un cultivo de 24 horas en agar nutritivo (Narayanasamy 2014) mediante el kit de extracción Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison, WI). La pureza y concentración del ADN se cuantificó por espectrofotometría mediante el equipo Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, UK) con absorbancia de 260/280 y 260/230 nm para determinar la ausencia de impurezas como proteínas y compuestos fenólicos. Para la identificación de las especies de *Pseudomonas,* se amplificó la región 16S rDNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional, con el uso de los siguientes cebadores específicos para las especies de *Pseudomonas*: PA-GS-F (5'-GACGGGTGAGTAATGCCTA-3') y PA-GS-R (5'-CACTGGTGTTCCTTCCTATA-3') El tamaño de producto esperado fue de 618 pares de bases (pb). La reacción de amplificación se llevó a cabo con el siguiente protocolo: denaturación inicial a 95 ^{o}C por dos minutos en un primer ciclo, seguido de 25 ciclos con: temperatura de denaturación a 94 ^{o}C por 20 segundos, temperatura de hibridación (Tm) de 54 ^{o}C por 20 segundos, temperatura de elongación de 72 ^{o}C por 40 segundos y un ciclo de elongación final por un minuto. Los productos de amplificación fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% a 90 voltios

por 60 minutos con un marcador de peso molecular de 100 pb de la marca Invitrogen. El buffer de corrida empleado fue una solución de TAE a 1X (Barghouthi 2011; Spilker et al. 2004).

El ADN amplificado fue secuenciado por el método Sanger en la empresa surcoreana Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur). Las secuencias consenso fueron obtenidas mediante el software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versión 10.0 (Kumar et al. 2016) y se identificaron mediante la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI).

Pruebas de antagonismo *in vitro*

Pruebas individuales *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium oxysporum* YC-3.-

La evaluación del efecto antagonista frente a *F. oxysporum* YC-3 se realizó con la técnica de cultivos duales descrita por Barbosa y Meza (2009). Estas pruebas se realizaron, por triplicado, en placas de agar PDA. En primer lugar, se colocó un disco de agar PDA de 5 mm con *F. oxysporum* de 5 días, a 10 mm de distancia del borde de la caja (Silva 2018) y se incubó por 72 horas a 22 ºC (Barboza y Meza 2009). Una vez obtenida una colonia visible del patógeno, se procedió a la siembra de un disco de agar PDA de 5 mm con *Trichoderma* spp. en el extremo contrario. La capacidad antagonista de las cepas de *Trichoderma* frente a *F. oxysporum*, se determinó mediante la medición del crecimiento radial de cada una de las colonias durante 10 días y cada 24 horas (Tovar 2008). La capacidad biocontroladora de *Trichoderma* se evidenció por el cálculo de porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) con la fórmula usada por Cabrales (2016):

$$PICR = \frac{R1 - R2}{R1} * 100$$

Donde R_1 = radio de la colonia del patógeno en el cultivo control y R_2 =radio de la colonia obtenido en el enfrentamiento (Barbosa y Meza 2009).

La evidencia del micoparasitismo como mecanismo de acción antagonista se realizó mediante observaciones macroscópicas de los cultivos que presentaron un crecimiento de *Trichoderma* sobre la colonia de *F. oxysporum* (Tovar 2008). Para la identificación microscópica del micoparasitismo se utilizó la guía de Elías y Arcos (1984) citada en Fernández y Suárez (2009). La guía estableció tres características macroscópicas y microscópicas principales que determinaron si el antagonista utilizó al micoparasitismo como mecanismo de acción. Las características fueron: invasión de la superficie, colonización y esporulación del antagonista sobre el patógeno (Fernández y Suárez 2009; Silva 2018)

Pruebas individuales *Pseudomonas* spp. frente a *Fusarium oxysporum* YC-3.-

Se evaluó la capacidad antagonista de los aislados obtenidos de *Pseudomonas* spp. por triplicado con el cálculo del índice de porcentaje de inhibición de *F. oxysporum* YC-3. Para esto se realizaron diluciones seriadas en base 10 de los aislados de *Pseudomonas* spp. hasta llegar a una concentración de 10^7 cel/mL con una turbidez de 0.075 en la escala McFarland (Ingraham 2004). Se dispersó 100 µL de esta concentración sobre la superficie de una placa de agar PDA y se colocó un disco de agar de 5 mm con *F. oxysporum* YC-3 en el centro de la caja de Petri (Yendyo et al. 2017). El halo de crecimiento de *F. oxysporum* YC-3 se midió durante 11 días, cada 24 horas y se calculó el porcentaje de inhibición micelial (PIM) mediante la fórmula:

$$PIM = \frac{D.C.C - D.C.P}{D.C.C} * 100$$

Donde D.C.C corresponde al diámetro de la colonia control y D.C.P corresponde al diámetro de la colonia del hongo que se encuentra en interacción con las bacterias (Tejera et al. 2012). Se utilizó la clasificación de porcentajes de inhibición micelial citada por Corrales Ramírez MSC et al. (2012) y se escogieron las cepas con porcentajes de inhibición medios (40 – 69%) y positivos (70 - 100%).

Pruebas conjuntas

Pruebas de compatibilidad. -

En base a los criterios de selección descritos, se utilizaron nueve cepas de *Pseudomonas* spp., junto a las tres cepas de *Trichoderma* spp. Las pruebas de compatibilidad se realizaron en placas con agar PDA, por triplicado, para determinar la ausencia de inhibición entre ambos biocontroladores. Para esto se colocó un disco de agar de 5 mm con las cepas de *Trichoderma* spp. de tres días de crecimiento, en el centro de la caja de Petri, y se colocó el inóculo de una colonia, con un asa bacteriológica, de cada cepa de *Pseudomonas* spp. en el extremo de la caja a una distancia de 10 mm del borde (Singh et al. 2011). La viabilidad de ambas cepas se confirmó mediante la resiembra del conjunto de ambos microorganismos, y tinción Gram para verificar la presencia de la bacteria (Chaves 2007; Silva 2018).

Pruebas conjuntas de antagonismo de *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. frente a *F. oxysporum*. -

Las combinaciones compatibles obtenidas fueron enfrentadas contra *F. oxysporum* YC-3. Se utilizó una concentración de *Pseudomonas* spp. de 10^6 UFC/mL en una densidad óptica (D.O) de 0.07. La concentración se obtuvo a partir de la correlación entre la absorbancia y el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) obtenidas por la siembra de cada cepa y expresadas en una curva de calibración (Prescott y Dunn 2016). Asimismo, la siembra de *Trichoderma* se ajustó a una concentración de 10^6 conidias/mL, con la ayuda de la cámara de Newbauer. La capacidad antagonista de éstas se evaluó mediante la fórmula PIM, descrita anteriormente. Se evaluó la capacidad antagonista del conjunto de biocontroladores exitosos en el ensayo anterior, por la técnica de cultivos duales en agar PDA, descrita anteriormente por Barbosa y Meza (2009).

Las pruebas se realizaron por triplicado y el antagonismo de los consorcios frente a *F. oxysporum* YC-3 se evaluó mediante la fórmula descrita anteriormente:

$$PICR = \frac{R1 - R2}{R1} * 100$$

Evaluación de la promoción de crecimiento y antagonismo del consorcio *Pseudomonas* spp. y *Trichoderma* spp. frente a *F. oxysporum* YC-3 *in planta* en condiciones de invernadero. -

Para la producción de biomasa de las tres cepas de *Trichoderma* spp. se realizó una fermentación en fase líquida a un volumen final de 950 mL en medio de cultivo artesanal que contenía como fuente de carbono melaza al 5 % y como fuente de nitrógeno, extracto de levadura al 5 %, con pH 5, esterilizado en autoclave a 121 ^{o}C por 20 minutos (Amilcar et al. 2017; Vásquez 2010). A partir de cultivos esporulados en agar PDA de cada cepa de *Trichoderma* se realizó una suspensión de 100 mL (en NaCl 0.85 % estéril) con una concentración de 10^8 conidias/mL y se aforaron 800 mL del medio a base de melaza con esta suspensión. Los cultivos fueron incubados por ocho días a temperatura ambiente en agitador magnético a 80 rpm (Cubillos et al. 2011). A su vez, la fermentación líquida de *Pseudomonas* spp. consistió en inocular 9 mL de cultivo en caldo infusión cerebro corazón (BHI), conteniendo 10^8 UFC/mL (determinado mediante medición de densidad óptica), en 850 mL de caldo BHI fresco y estéril. Este cultivo se incubó por 48h a 25 °C en agitador magnético a 90 rpm (Yobo 2005). Cada 24 horas se verificó la reproducción progresiva de cada una de las cepas. Para esto se realizó un recuento de conidias en cámara de Newbauer para *Trichoderma* y se midió la absorbancia de los cultivos de *Pseudomonas* (Prescott y Dunn, 2016).

Se planteó un diseño experimental completamente aleatorizado de un factor (DCA) con unidades experimentales y condiciones ambientales homogéneas (humedad: 60%, temperatura: 27-30 ^{o}C), en el que se utilizaron 63 plántulas de uvilla de 25 días de crecimiento, sin síntomas, signos de enfermedades o deficiencia nutricional, obtenidas de la empresa Terrafertil/Nature's Heart (Tabacundo, Ecuador). Las plantas fueron transferidas a macetas con sustrato estéril y se

distribuyeron en controles positivos de la enfermedad, controles negativos o tratamientos blancos para verificar la salud de las plantas y tratamientos exitosos de los consorcios obtenidos en el ensayo *in vitro* (Sánchez 2011).

Para la evaluación del efecto antagonista de los consorcios exitosos formados, se infectaron 30 plantas con el patógeno, 27 plantas para los tratamientos, y tres plantas como controles negativos. Para esto se obtuvieron suspensiones, en agua destilada estéril, de una colonia de siete días de *F. oxysporum* YC-3, que se ajustaron a la concentración 1,6 x 10^7 conidias/mL por medio del recuento en cámara de Newbauer (Leslie y Summerell 2006; Cañedo y Ames 2014). De esta forma, se sumergieron las raíces de las plantas en la suspensión obtenida del patógeno durante dos días para lograr el ingreso de las macroconidias al sistema radicular (Yendyo et al. 2017). Una vez infectadas las plantas fueron transferidas a nuevas macetas con sustrato estéril suplementado con 30 mL de cada inóculo de los biocontroladores por cada kilogramo de sustrato (Yendyo et al. 2017). A su vez, se evaluó la capacidad fertilizante de los consorcios y de cada biocontrolador, para lo que se utilizó una población de 30 plantas, 27 de las cuales fueron destinadas para la evaluación de los consorcios y tres como controles negativos (Fotoohiyan et al. 2017).

Se determinó el número de casos de marchitez vascular y el grado de afectación de la misma (incidencia y severidad) (French y Hebert 1980). Para el cálculo de la incidencia, se determinó el número de plantas que presentaron síntomas de la enfermedad, expresadas como porcentaje del número total de plantas durante 28 días de observación. Por otro lado, se estableció una escala de cuatro grados para la evaluación de la severidad, por la cual se compararon las plantas sanas y los diferentes niveles de la enfermedad que se evidenció bajo las condiciones de invernadero (Cristiane-Delmadi et al. 2018). La escala de evaluación de la severidad se planteó según los signos y síntomas de la marchitez vascular descritos en Agrios (2005) y Estupiñán y Ossa (2007).

- Grado 0: Ausencia de síntomas de marchitez vascular, rigidez y turgencia del tallo con hojas verdes extendidas.
- Grado 1: Clorosis amarillenta en hojas basales ligeramente marchitas, pérdida leve de turgencia. Síntomas sin mucha evidencia.
- Grado 2: Síntomas evidentes de la marchitez y sequedad de las hojas, tallos con pérdida media de turgencia. Encopamiento de la planta, marchitez y sequedad de las hojas.
- Grado 3: Necrosis vascular del tallo (pudrición seca). Pérdida total de hojas, tamaño reducido de la planta.

La severidad de la enfermedad se determinó utilizando la siguiente fórmula $S=\sum [(n \times V)/3 \times N] \times 100$. Donde, n se refiere al número de plantas en cada categoría de infección, V es el valor numérico de las categorías de infección, N es el total de plantas en el ensayo y 3 es la constante del número de réplicas (Yendyo et al. 2017; Estupiñán y Ossa 2007).

Para determinar el efecto de los antagonistas sobre el patógeno en las plantas y para evaluar su acción como promotores de crecimiento o biofertilizantes, se compararon los resultados del área foliar, el grosor del tallo y la longitud de las raíces y los tallos (Estupiñán y Ossa 2007). La medición se llevó a cabo el último día de observación del ensayo.

Finalmente, se determinó el porcentaje de humedad de la materia foliar de las plantas para evidenciar la influencia de los consorcios, establecer su capacidad de absorción de agua y la cantidad de materia orgánica presente. Para esto se utilizó la fórmula:

$$\%H = \frac{PH+B-Ps-B}{PH+B} *100$$

Donde, PH+B es el peso en gramos de la muestra húmeda más bandeja, Ps+B es el peso en gramos de la muestra seca más bandeja y PB es el peso en gramos de la bandeja (AOAC 2012).

Análisis de datos obtenidos. -

Los parámetros determinados con las pruebas de invernadero fueron comparados mediante el análisis de varianza (ANOVA) y prueba post hoc Tukey (Sánchez, 2011). Estas pruebas estadísticas se procesaron mediante el programa SPSS Statistics Base 22.0 (IBM, 2018) con un nivel de significancia de 95%. Además, la severidad fue analizada mediante un mapa de color o calorimétrico (Hotjar 2019).

RESULTADOS. -

Las cinco plantaciones de la región norte mantenían la producción de uvilla en cultivos libres de pesticidas, mientras que, las tres plantaciones de la región centro utilizaban dos agroquímicos (oxicloruro de cobre y benzidimazol). Del muestreo se obtuvieron 20 aislados bacterianos, 13 aislados de la región norte y 7 aislados de la región centro. La morfología macroscópica y microscópica, además de la producción de fluorescencia bajo luz ultravioleta coincidía con el género *Pseudomonas,* (Figura No. 1) (Tabla No. 2). Los resultados de la tinción Gram y las pruebas bioquímicas realizadas, confirmaron la morfología y la presencia del género *Pseudomonas* spp.

La extracción de ADN dio como resultado una concentración de 1,53 - 1,78 debajo de la ratio 260/280 nm y 1,44 - 1,85 debajo de la ratio de 260/230 en Nanodrop. Así mismo, la reacción en cadena de la polimerasa produjo amplicones de 618 pares de bases, visualizados por electroforesis horizontal en gel de agarosa, coincidente al tamaño del amplicón obtenido con los cebadores utilizados (Figura No.2). El análisis de las secuencias mediante el programa BLAST resultó en la identificación de seis cepas de *Pseudomonas fluorescens* y 14 cepas de varias especies de *Pseudomonas* (Tabla No. 3).

En el enfrentamiento de las tres cepas de *Trichoderma* spp. frente a *F. oxysporum* YC-3 se obtuvo porcentajes de inhibición de crecimiento radial que oscilaron entre el 53% y el 63%

(Tabla No. 4) (Figura No. 3). Se observó micoparasitismo como mecanismo de acción contra el patógeno en las tres cepas de *Trichoderma* evaluadas. *Trichoderma atroviride* SP2AS presentó hiperparasitismo por el crecimiento del antagonista sobre la colonia del patógeno, además de una gran esporulación (Figura No. 4).

Por su parte, los enfrentamientos de las cepas de *Pseudomonas* spp. frente a *F. oxysporum* YC-3 presentaron resultados de 10 cepas con un PIM de categoría baja y nueve cepas de categoría media (Tabla No. 5) (Figura No. 6). Los aislamientos que presentaron el mayor PIM fueron *P. tolasii* SvS10 y *P. tolasii* TagS12, con valores de 58 y 52 %, respectivamente, mientras que, los siete aislados restantes obtuvieron un PIM en un rango del 39 al 44 %. Estas últimas correspondían a las especies *P. fluorescens, P. reinekei, P. korensis, P. baetica y P. putida*.

En los ensayos de compatibilidad, se observó que cuatro cepas bacterianas fueron compatibles con las tres cepas de *Trichoderma* spp. (Tabla No. 6) (Figura No. 7, B). En contraste, los cinco aislamientos restantes inhibieron el crecimiento de las cepas evaluadas de *Trichoderma* spp. (Tabla No. 6) (Figura No.7, A). La tinción Gram y la re-siembra de las bacterias revelaron la presencia conjunta de ambos microorganismos. Se observaron hifas hialinas y esporas de *Trichoderma* spp. y la morfología bacilar característica de *Pseudomonas* spp. (Figura No. 8).

Finalmente, la evaluación antagonista de los consorcios conseguidos resultó en PICRs mayores en relación a los ensayos realizados de forma individual (Figura No. 9). El PICR de los 12 conjuntos establecidos osciló dentro de un rango de 72,2 % a 91,6 % y se observó un crecimiento abundante de ambos antagonistas (Figura No. 9) (Figura No. 10). Los consorcios de *P. koreensis* HzR20 y *T. atroviride* SP2AS, *T. gamsii* PIAS o *T. gamsii* RB1CS no se utilizaron para los estudios de invernadero posteriores, debido a que presentaron el PICR más bajo en comparación a las demás combinaciones. Además, *F. oxysporum* YC-3 produjo un halo de inhibición alrededor del consorcio (Figura No.12).

La evaluación de la marchitez vascular en las plantas de uvilla determinó una disminución de la incidencia y la severidad durante cinco semanas de observación tras la inoculación con el patógeno. Durante la primera semana tras inoculación, se determinó una incidencia de la enfermedad del 100 % en la población total de plantas con síntomas de marchitez vascular. No obstante, durante la quinta semana de observación se registró una incidencia del 60 % con 18 plantas que presentaron síntomas de la enfermedad (Figura No. 12).

La severidad de la enfermedad registró un rango de 44,4 a 66,7 % durante las dos primeras semanas tras la inoculación en la población total de plantas. Dentro de este marco, los tratamientos con consorcios formados por *T. atroviride* SP2AS + *P. fluorescens* TfS7, *T. atroviride* SP2AS + *P. baetica* TagR16 y *T. atroviride* SP2AS + *P. putida* TagR17 disminuyeron la severidad de la enfermedad a porcentajes ≤ 11.1 %, hasta la quinta semana de observación. Sin embargo, los tratamientos restantes lograron una disminución de la enfermedad hasta un 44,44 %. Además, las plantas tratadas con el consorcio formado por *T. gamsii* RB1CS + *P. putida* TagR17 no presentaron evidencias de disminución de la severidad de la enfermedad (Figura No. 13).

Al finalizar los ensayos de evaluación de los consorcios como antagonistas en condiciones de invernadero, únicamente los tratamientos *T. atroviride* SP2 AS + *P. fluorescens* TfS7, *T. atroviride* SP2 AS + *P. baetica* TagR16 y *T. atroviride* SP2 AS + *P. putida* TagR17, mostraron una diferencia significativa ($P<0.05$) en todos los parámetros observados, en comparación al testigo de infección con el patógeno (Tabla No. 7) (Figura No. 14). Asimismo, fueron los únicos que contrarrestaron la severidad de la enfermedad. Aunque los consorcios *T. gamsii* RB1CS + *P. baetica* TagR16 y *T. gamsii* PIAS + *P. fluorescens* TfS7, mostraron diferencias significativas ($P<0.05$) en todos los parámetros (Tabla No. 7), únicamente disminuyeron la severidad de la enfermedad hasta un 44%. Por otro lado, los consorcios restantes registraron diferencias

significativas (P<0.05) en el área foliar a comparación del control de infección que presentó una marchitez y pérdida absoluta de las hojas.

En la evaluación de los consorcios como biofertilizantes se observaron diferencias significativas (P<0.05) en todos los parámetros en contraste con las plantas testigo sin ningún tratamiento (Tabla No. 8) (Figura No. 15). De esta manera, se determinó un mayor crecimiento de las plantas tratadas con los biocontroladores, a excepción de las raíces, ya que, presentaron una longitud menor a la de las plantas testigo, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa (P<0.05) (Tabla No. 8).

DISCUSIÓN. -

Todas las especies de *Pseudomonas* identificadas en el presente estudio se catalogan como bacterias saprófitas del suelo (Marina-Cotes 2018). Las bacterias identificadas son inofensivas para cultivos de producción industrial, con excepción de *P. aeruginosa* TfS4. Esta no puede utilizarse como biocontrolador debido a su infectividad oportunista en seres humanos, animales y algunas plantas (Prescott y Dunn 2016). La mayoría de aislados se obtuvieron de cultivos orgánicos sanos de uvilla a excepción de *P. baetica* TagR7 y *P. putida* TagR17, extraídos de una plantación tratada con pesticidas químicos. El aislamiento de estas especies, a partir de suelos con presencia de xenobióticos, refleja una gran capacidad de adaptación en función de su versatilidad genética y metabólica. Esto puede asociarse con la capacidad antagonista relativamente mayor en comparación con los demás aislados (Maheshwari 2010). Sin embargo, en este estudio *Pseudomonas* spp. presentó un PIM de categoría intermedia. Las dos cepas de *P. tolassi* obtuvieron el mayor PIM comparado con las demás especies. Este fenómeno podría explicarse por la producción de la toxina extracelular tolasina, característica de la especie. Esta toxina posee propiedades detergentes que lisan las vacuolas de los hongos (Kosanovic et al. 2019).

De manera interesante, se observó que la capacidad antagónica de los aislados fue variable entre diferentes cepas de la misma especie. Así, por ejemplo, *Pseudomonas fluorescens* TfS3 presentó un PIM de categoría baja, mientras que *P. fluorescens* TfS7 registró un PIM de categoría media. Esto sugiere que la eficiencia, en términos de antagonismo bajo condiciones determinadas, es dependiente de la cepa en función de la variabilidad genética existente en cada especie (Álvarez-López et al., 2014).

El micoparasitismo observado durante los ensayos de enfrentamiento de *Trichoderma* y *F. oxysporum* YC-3 representa un mecanismo de acción directo, caracterizado por la adhesión y enrollamiento de las hifas (Sallam et al. 2019). Se evidenció la efectividad de *Trichoderma* como antagonista *in vitro* por su crecimiento sobre la colonia del patógeno. Además, la formación de clamidosporas y la esporulación demuestran la competencia por espacio debido a la formación de estructuras de resistencia frente la presencia del patógeno (Kosanovic et al. 2019).

La incompatibilidad de cinco cepas de *Pseudomonas* spp. con *Trichoderma* spp. (Tabla No. 6) se puede deber a que *Pseudomonas* spp. sintetiza un amplio espectro de metabolitos bioactivos, como sideróforos fluorescentes con efecto antifúngico, que pueden crear amensalismo contra *Trichoderma* (Jambhulkar et al. 2018). De igual manera, los biocontroladores pueden competir por el espacio y los nutrientes existentes en el medio, dando paso a una inhibición conjunta (Sallam et al. 2019). No obstante, la compatibilidad observada de las cuatro cepas restantes de *Pseudomonas* spp. condujo a la formación del consorcio microbiano y la estimulación mutua. Estos resultados corroboran lo reportado por Chemeltorit et al. (2017) y Jambhulkar et al. (2018), donde se expone el sinergismo y la capacidad de *Pseudomonas* spp. para formar consorcios con otros agentes de control biológico (por sus siglas en inglés BCAs) como, *P. aeruginosa* y *Bacillus* spp. o *P. fluorescens* y *Trichoderma* spp.

El incremento de la capacidad antagonista en un PICR mayor a 20%, una vez obtenido el consorcio, demuestra la actividad conjunta de ambos microorganismos y su mayor efectividad para disminuir el crecimiento de *F. oxysporum* YC-3. Estos resultados coinciden con los resultados de los experimentos realizados por Sandheep (2013), donde sugiere que la aplicación de dos BCAs es más efectiva que su aplicación individual.

Los resultados de efectividad de los consorcios durante los ensayos en condiciones de invernadero difirieron de los resultados obtenidos *in vitro*, ya que, únicamente tres consorcios lograron contrarrestar los efectos de la marchitez vascular. Estos resultados se asemejan al estudio realizado por Jangir et al. (2019), donde la combinación de *T. harzianium* y *Bacillus subtilis in vitro* obtuvo un PICR de 85%, en condiciones de invernadero. La severidad de la enfermedad sólo se redujo en un 40%. Estas diferencias en los resultados indican que el desarrollo y la capacidad antagonista de los BCAs son dependientes de las condiciones ambientales y la microbiota del suelo. Por lo tanto, factores como la humedad, temperatura y la disponibilidad de nutrientes varían en el campo y por ende, para determinar la efectividad de un BCA es importante probar su capacidad antagonista *in vivo* y no solo *in vitro* (Jambhulkar et al. 2018).

La efectividad de los consorcios *T. atroviride* SP2AS + *P. fluorescens* TfS7, *T. atroviride* SP2 AS + *P. baetica* TagR16 y *T. atroviride* SP2AS + *P. putida* TagR17, determinan el beneficio de combinar BCAs. La utilización de consorcios puede ayudar a mejorar la colonización de antagonistas y reducir la variabilidad del control de la enfermedad en el campo. Además, se determinó la interacción directa de los antagonistas con el patógeno y la reducción de una enfermedad en progreso, ya que, las plántulas fueron infectadas antes de la inoculación con los antagonistas. Esto, en contraste con los estudios convencionales que pre-inoculan agentes biocontroladores para prevenir el ataque de un patógeno, por la inducción de resistencia a la enfermedad en la planta y el incremento de metabolitos secundarios benéficos en el suelo

(Rajeswari and Kapoor 2018). Así, por ejemplo, (Fotoohiyan et al. 2017) probaron el efecto biocontrolador de *T. harzianum* frente a *V. dahliae* en semillas de pistacho, donde se trataron a las semillas y al suelo con el biocontrolador antes de la infección con el patógeno. De la misma forma, (Chemeltorit et al. 2017) probaron la combinación de *T. hamatum* y *P. aeruginosa* contra *Phytophthora capsici* en semillas de ají. Este tipo de estudios aprovecha la capacidad de los biocontroladores de liberar moléculas bioactivas que se comportan como elicitores de resistencia vegetal. Sin embargo, no se puede determinar la acción directa contra el patógeno, ya que, únicamente actúan como un sistema de prevención hacia la enfermedad (Yendyo et al. 2017). El estudio aprovechó los mecanismos de acción directos de los biocontroladores en las plantas. Por ejemplo, *Trichoderma* posee la capacidad de colonizar e interactuar con la exorrizósfera y la endorriza, para competir por espacio y nutrientes, y micoparasitar hongos fitopatógenos (Chemeltorit et al. 2017). A su vez, *Pseudomonas* posee la habilidad competitiva de adherirse y colonizar la rizósfera gracias al uso de monosacáridos, ácidos grasos y poliaminas contenidos en los exudados radicales, donde produce las sustancias fungicidas antes mencionadas (A.R. Sandheep 2013). Gracias al establecimiento exitoso del consorcio, ambos BCAs coexistieron para combatir a *F. oxysporum* YC-3.

Se determinó la capacidad de los consorcios como potentes promotores de crecimiento, debido al incremento significativo en los valores de los tallos, hojas y porcentajes de humedad. Este incremento se debe al efecto directo que poseen PGPRs como *Pseudomonas*, al inducir la producción de fitohormonas suministrando nitrógeno biológicamente fijo e incrementando la absorción de fósforo por la solubilización de fosfato inorgánico (Hafeez et al., 2006; Beltrán Pineda 2015). Asimismo, el género *Trichoderma* aumenta el metabolismo de carbohidratos y la fotosíntesis generando más energía y fuentes de carbono disponibles para la planta (Maheshwari 2010). Este BCA interactúa con la rizósfera de la planta liberando moléculas bioactivas y enzimas como xilasas, proteasas y quitinasas capaces de estimular el crecimiento

vegetal y las respuestas de defensa (Kubicek et al. 2011). Además, tanto *Trichoderma* spp. como *Pseudomonas* spp. excretan metabolitos que ayudan a las plantas a mejorar la absorción de nutrientes (Jambhulkar et al. 2018).

A su vez, el aumento en el porcentaje de humedad de las plantas tratadas con los biocontroladores determina un mejoramiento en la absorción de agua y nutrientes, esto según el estudio realizado por Rosas et al. (2006), es causado por la capacidad de *Pseudomonas* para solubilizar el hierro y el fósforo.

De forma interesante, en la evaluación de los consorcios como biofertilizantes, se observó que la longitud de las raíces de las plantas tratadas con los BCAs fue menor que la de las raíces de las plantas testigo sin tratamiento, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa ($P<0.05$). Este fenómeno se explicaría por la gran cantidad de fitohormonas y nutrientes proporcionados por los BCAs. Esto permitió a las plantas crecer sin la necesidad de formar nuevas raíces.

El género *Pseudomonas* ha sido evaluado en el Ecuador como potencial promotor de crecimiento y antagonista (Sangoquiza Caiza et al. 2019). Sin embargo, aún no se dispone de productos industrializados para su uso en el campo, debido a que, esta bacteria no posee estructuras de resistencia como el género *Bacillus*, el cual forma endosporas en condiciones de estrés y, por tanto, resiste al proceso de deshidratación celular durante la producción industrial (Marcial-Coba. et al 2018; Marina-Cotes 2018). Esta problemática determina la necesidad de estudios posteriores a su evaluación como antagonista o biofertilizante, donde se establezcan las condiciones específicas para producir *Pseudomonas* spp. a gran escala, por ejemplo, la microencapsulación (Marcial-Coba. et al 2018). En este contexto, es importante la valoración de la producción industrial de los consorcios para continuar con los estudios en campo.

Los resultados exitosos obtenidos plantean nuevas aplicaciones de los consorcios en los suelos ecuatorianos, así como, nuevos productos de uso industrial gracias a su destacable potencial como biocontrolador y promotor de crecimiento.

CONCLUSIONES. -

Los consorcios formados de *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. presentaron mayor inhibición del patógeno que los biocontroladores individuales durante la fase de laboratorio. La supresión de la patogenicidad de *Fusarium oxysporum* YC-3, causante de la marchitez vascular en cultivos de uvilla, por los consorcios formados de *T. atroviride* y *P. fluorescens, P. putida* y *P. baetica*, fue estadísticamente significativa para los ensayos *in vivo*. Mientras que, todos los consorcios obtenidos de *Trichoderma* spp y *Pseudomonas* spp. presentaron una alta inhibición en los ensayos *in vitro*. Esto determina que, la efectividad de un BCA difiere por las condiciones ambientales en el que se desarrolle. El presente estudio evidenció el efecto directo de *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. contra *F. oxysporum* YC-3 en las plantas, por la reducción de la severidad de una enfermedad en curso y su re-aislamiento a partir de las raíces. El crecimiento abundante de las plantas tratadas con los BCAs, demuestran el potencial biofertilizante, así como, la alta capacidad antagonista de los consorcios evaluados para su uso en campo. Es importante continuar con estudios, para establecer condiciones específicas de la producción industrial de estos microorganismos, y evaluar su efecto en campo, para promover el uso de productos biológicos efectivos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y CITAS EN TEXTO. -

Agrios G. 2012. Fitopatología. 3rd ed. Nueva York: Academic Press, Inc.

Agritop. 2020. Agritop.com.ec. [acceso 2020 Feb 25]. http://www.agritop.com.ec/

Álvarez-López C, Osorio-Vega W, Díez-Gómez MC, Marín-Montoya M. 2014. Caracterización bioquímica de microorganismos rizosféricos de plantas de vainilla con

potencial como biofertilizantes. Agron Mesoam. 25(63):225–241. doi:10.15517/am.v25i2.15426.

Amilcar J, Napoleón E, Alejandro C, Javier F, Sulay E, Elizabeth S, Pineda-insuasti JA, Benavides-sotelo EN, Duarte AS, Burgos-rada CA, et al. 2017. Producción de biopreparados de *Trichoderma* spp: una revisión. ICIDCA Sobre los Deriv la Caña Azúcar. 51(1):47–52.

AOAC. 2020. Procedimiento específico de ensayo de determinación de humedad en muestras foliares. In: Latimer G, ed. by. Official Methods of Analysis of AOAC International. Maryland, EEUU: Beine. p. 111. [acceso 2019 Sept 4]

Aquiahuatl M, Pérez M. 2013. Manual de Prácticas de Laboratorio de Microbiología General. Izapalpa, México: Universidad Autónoma Metropolitana. [acceso 2019 Sept 4]

A.R. Sandheep AKA and MSJ. 2013. Combined Inoculation of *Pseudomonas fluorescens* and *Trichoderma harzianum* for Enhancing Plant Growth of Vanilla (Vanilla planifolia). زاانرژی نفتی هایفرآرده پخش ملی شرکت. 16(12):580–584.

Astorga-Quirós K, Meneses-Montero K, Zúñiga-Vega C, Brenes-Madriz J, Rivera-Méndez W. 2014. Evaluación del antagonismo de *Trichoderma* sp. y *Bacillus* subtilis contra tres patógenos del ajo. Rev Tecnol en Marcha. 27(2):82. doi:10.18845/tm.v27i2.1929.

Avendaño, Camila; Arbeláez, Germán; Rondón G. 2006. Control biológico del marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. phaseoli en fríjol *Phaseolus vulgaris* L., mediante la acción combinada de *Entrophospora* colombiana, *Trichoderma* sp. y *Pseudomonas fluorescens*. Agron Colomb. 24(1):62–67.

Barghouthi SA. 2011. A universal method for the identification of bacteria based on general PCR primers. Indian J Microbiol. 51(4):430–44. doi:10.1007/s12088-011-0122-5.

[acceso 2019 Marzo 9]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23024404.

Beltrán Pineda ME. 2015. La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. Corpoica Cienc y Tecnol Agropecu. 15(1):101. doi:10.21930/rcta.vol15_num1_art:401.

BioGreen. 2010. BioGreen. Biogreenecuador.com. [acceso 2020 Feb 25]. http://biogreenecuador.com/

Cabrales CP. 2016. Identificación de especies de cepas nativas de *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. y evaluación de su potencial antagonista *in vitro* frente al hongo fitopatógeno nativo *Moniliophthora roreri* en el departamento de Norte de Santander. Identificación especies cepas Nativ *Trichoderma* sp y *Bacillus* sp y evaluación su potencial Antagon Vitr frente al hongo fitopatógeno Nativ *Moniliophthora roreri* en el Dep Norte Santander. 13(1):45–56. doi:10.22463/r.v13i1.553.

Camargo-Cepeda DF, Ávila ER. 2014. Efectos del *Trichoderma* sp. sobre el crecimiento y desarrollo de la arveja (*Pisum sativum* L.). Cienc Y Agric. 11(1):91. doi:10.19053/01228420.3492.

Cárdenas A. 2018. Frutas exóticas de Ecuador abren y ganan mercados en Europa y Estados Unidos. El Universo:1-3. [acceso 2019 Nov 3]. https://www.eluniverso.com/noticias/2018/07/24/nota/6873881/frutas-exoticas-abren-ganan-mercados

Cañedo V, Ames T. 2014. Manual de laboratorio para manejo de hongos entomopatógenos. Lima, Perú: Cetro Internacional de la Papa.

Chaverri P, Branco-Rocha F, Jaklitsch W, Gazis R, Degenkolb T, Samuels GJ. 2015. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. Mycologia. 107(3):558–590. doi:10.3852/14-147.

Chaves N. 2007. Utilización de bacterias y hongos endofíticos para el control biológico del nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorn [Tesis de Pregrado]. El Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza.

Chemeltorit PP, Mutaqin KH, Widodo W. 2017. Combining *Trichoderma hamatum* THSW13 and *Pseudomonas aeruginosa* BJ10–86: a synergistic chili pepper seed treatment for *Phytophthora capsici* infested soil. Eur J Plant Pathol. 147(1):157–166. doi:10.1007/s10658-016-0988-5. http://dx.doi.org/10.1007/s10658-016-0988-5.

Corrales Ramírez MSC LC, Sánchez Leal MSC LC, Cuervo Andrade PhD JL, Joya JA, Márquez K. 2012. Efecto Biocontrolador de "*Bacillus*" spp., Frente a "*Fusarium*" sp., Bajo Condiciones de Invernadero en Plantas de Tomillo ("*Thymus Vulgaris* l".). Nova. 10(17):64. doi:10.22490/24629448.518.

Cristiane-Delmadi L, De Pieri C, Sander-Porcena A, Luiz-Furtado E. 2018. Escala diagramática para cuantificación de la severidad de la roya en hojas de teca. Rev Mex Fitopatol Mex J Phytopathol. 36(2). doi:10.18781/r.mex.fit.1708-5.

Cubillos JG, Páez A, Mejia L. 2011. Evaluación de la Capacidad Biocontroladora de *Trichoderma harzianum* Rifai contra *Fusarium solani* (Mart .) Sacc . Asociado al Complejo " Secadera " en Maracuyá ,. RevFacNalAgrMedellín. 64(1):5821–5830.

Ecofertil. 2020. Ecofertil | Ecoalternativas. Ecoalternativas.com.ec. [acceso 2020 Feb 25]. http://www.ecoalternativas.com.ec/website/?wineproducts=ecofertil

Estupiñan H, Ossa J. 2007. Efecto del agente causal de la marchitez vascular de la uchuva

(*Physalis peruviana*) el hongo *Fusarium oxysporum* Schlecht sobre algunas solanáceas y otras especies cultivadas afectadas por formas especiales del microorganismo [Tesis de Pregrado]. Pontificia Universidad Javeriana.

FENECSA. 2020. Productos Orgánicos en Ecuador. Fenecsa.com.ec. [acceso 2020 Feb 25]. http://www.fenecsa.com.ec/nosotros/

Fernández R, Suárez C. 2009. Antagonism *in vitro* of *Trichoderma harzianum* Rifai AGAINST *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp passiflorae in passion fruit *(Passiflora edulis* Sims var. Flavicarpa) from colombian bananera zone municipality. Rev Fac Nac Agron Medellín. 62(1):4743–4748. [acceso 2019 Enero 4]. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-28472009000100001.

Fischer G, Almanza-Merchán PJ, Miranda D. 2014. Importancia y cultivo de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). Rev Bras Frutic. 36(1):40. doi:10.1590/0100-2945-441/13.

Fotoohiyan Z, Rezaee S, Bonjar GHS, Mohammadi AH, Moradi M. 2017. Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* in controlling wilt disease of pistachio caused by *Verticillium dahliae*. J Plant Prot Res. 57(2):185–193. doi:10.1515/jppr-2017-0025.

French E, Hebert T. 1980. Métodos de investigación fitopatológica. 2nd ed. San José, Costa Rica: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas.

Góngora A, Rojas P. 2016. Incidencia de las enfermedades en uchuva *Physalis peruviana* l. por estado fenológico y de acuerdo con la ubicación en los diferentes estratos de la planta, en el departamento de Cundinamarca [Tesis de Pregrado]. Pontificia Universidad Javeriana.

Gupta V, Schmoll M, Herrera-Estrella A, Upadhyay R, Druzhinina L, Tuohy M. 2014.

Biotechnology and Biology of *Trichoderma*. Oxford: Elsevier.

Hafeez FY, Yasmin S, Ariani D, Mehboob-ur-Rahman, Zafar Y, Malik KA. 2006. Plant growth-promoting bacteria as biofertilizer. Agron Sustain Dev. 26(2):143–150. doi:10.1051/agro:2006007.

Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. 2004. *Trichoderma* species - Opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat Rev Microbiol. 2(1):43–56. doi:10.1038/nrmicro797.

Hotjar. 2019. Heat Map Analysis: How to Analyze Heatmaps to Improve UX | Hotjar. Hotjar.com. [acceso Abr 7]. https://www.hotjar.com/heatmaps/analysis

Howell C. 2002. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concept. Oxford: Plant disease.

Ingraham J, Ingraham C. 2004. Introducción a la microbiología. 10th ed. Barcelona [etc.]: Reverté.

Jambhulkar PP, Sharma P, Manokaran R, Lakshman DK, 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. Eur J Plant Pathol. 152(3):747–757. doi:10.1007/s10658-018-1519-3.

Jangir M, Sharma Satyawati, Sharma Shilpi. 2019. Target and non-target effects of dual inoculation of biocontrol agents against *Fusarium* wilt in *Solanum lycopersicum*. Biol Control. 138(May):104069. doi:10.1016/j.biocontrol.2019.104069. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104069.

Kannan V, Bastas K. 2015. Sustainable Approaches to Controlling Plant Pathogenic Bacteria. Washington, EEUU: CRC Press.

Kloepper J, Schroth M. 1978. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. Angers, Francia.

Kosanovic D, Sheehan G, Grogan H, Kavanagh K. 2019. Characterisation of the interaction of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas tolaasii* with *Trichoderma aggressivum*. Eur J Plant Pathol. doi:10.1007/s10658-019-01867-z.

Kubicek CP, Herrera-Estrella A, Seidl-Seiboth V, Martinez DA, Druzhinina IS, Thon M, Zeilinger S, Casas-Flores S, Horwitz BA, Mukherjee PK, et al. 2011. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. Genome Biol. 12(4). doi:10.1186/gb-2011-12-4-r40.

Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol Biol Evol. 33(7):1870–1874. doi:10.1093/molbev/msw054. [acceso 2019 Sept 4]. https://academic.oup.com/mbe/article-lookup/doi/10.1093/molbev/msw054.

Leslie J, Summerell B. 2006. *Fusarium* Laboratory Manual. Kansas, EEUU: Blackwell Publishing.

López, J. et al. (2013) 'Effect of dehydration temperature on physico-chemical properties and antioxidant capacity of goldenberry (*Physalis peruviana* L.)', Chilean Journal of Agricultural Research. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA, 73(3), pp. 293–300. doi: 10.4067/S0718-58392013000300013.

Maheshwari K. 2010. Plant Growth and Health Promoting Bacteria. 2nd ed. Munster Alemania: Alexander Steinbu¨chel.

Marcial-Coba MS, Cieplak T, Cahú TB, Blennow A, Knøchel S, Nielsen DS. 2018. Viability of microencapsulated: *Akkermansia muciniphila* and *Lactobacillus plantarum* during

freeze-drying, storage and *in vitro* simulated upper gastrointestinal tract passage. Food Funct. 9(11):5868–5879. doi:10.1039/c8fo01331d.

Marina-Cotes A. 2018. Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros. Mosquera, Colombia: Agrosavia.

Martínez B, Infante D, Reyes Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Rev Protección Veg. 28(1):1–11. [acceso 2019 Nov 3]. https://www.researchgate.net/publication/262514806_Trichoderma_spp_y_su_funcion_en_el_control_de_plagas_en_los_cultivos.

Mastouri F. 2010. Use of *Trichoderma* spp. to Improve Plant Performance under Abiotic Stress [Tesis doctoral]. Cornell University.

Moreno-Miranda C, Moreno-Miranda R, Pilamala-Rosales AA, Molina-Sánchez JI, Cerda-Mejía L. 2019. El sector hortofrutícola de Ecuador: Principales características socio-productivas de la red agroalimentaria de la uvilla (*Physalis peruviana*). Cienc y Agric. 16(1):31–51. doi:10.19053/01228420.v16.n1.2019.8809.

Narayanasamy P. 2014. Biological Management of Disease Crops. 2nd ed. Puram, India: Springer

Ministerio de Agricultura y Ganadería. 2018. El Ministerio de Agricultura y Ganadería, MAG. [acceso 2019 Jul 3]. https://www.agricultura.gob.ec/

Ochoa Carreño DC, Montoya Restrepo A. 2010. Consorcios microbianos: una metáfora biológica aplicada a la asociatividad empresarial en cadenas productivas agropecuarias. Rev Fac Ciencias Económicas. 18(2):55–74. doi:10.18359/rfce.2272.

Ortiz J. 2015. Agricultores en riesgo por el uso de agroquímicos. El Universo:1-3. [acceso 2019 Enero 15].

Pássaro C. 2014. *Physalis peruviana* L.: Fruta Andina para el Mundo. Murcia, España: CYTED, Cornocupia.

Puente LA, Pinto-Muñoz CA, Castro ES, Cortés M. 2011. *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. Food Res Int. 44(7):1733–1740. doi:10.1016/j.foodres.2010.09.034. [acceso 2019 Abr 15]. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996910003571.

Promega. 2020. Promega Corporation. Fishersci.com. [acceso 2020 Feb 26]. https://www.fishersci.com/us/en/brands/I9C8M21W/promega-corporation.html

Prescott S, Dunn C. 2016. Industrial Microbiology. 10th ed. New Delhi, India: McGraw-Hil.

Rajeswari P, Kapoor R. 2018. Combinatorial efficacy of *Trichoderma* spp. and *Pseudomonas fluorescens* to enhance suppression of cell wall degrading enzymes produced by *Fusarium* wilt of *Arachis hypogaea*.L. Int J Agric Res Innov Technol. 7(2):36–42. doi:10.3329/ijarit.v7i2.35320.

Rodríguez C, Martin M. 2009. Aislamiento y selección de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en cultivos de uchuva (*Physalis peruviana* l.) con capacidad antagónica frente a *Fusarium* spp. [Tesis de Pregrado]. Pontificia Universidad Javeriana.

Sallam NMA, Eraky AMI, Sallam A. 2019. Effect of *Trichoderma* spp . on *Fusarium* wilt disease of tomato. Mol Biol Rep.(0123456789). doi:10.1007/s11033-019-04901-9. https://doi.org/10.1007/s11033-019-04901-9.

Sánchez J. 2011. Introducción al Diseño Experimental. Quito, Ecuador: Pontificia Universidad Católica el Ecuador.

Sangoquiza Caiza CA, Yánez Guzman CF, Borges M. 2019. Respuesta de la absorción de

nitrógeno y fósforo de una variedad de maíz al inocular *Azospirillum* sp . y *Pseudomonas fluorescens* Influencia de los biofertilizantes.

Schmoll M, Schuster A. 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. Appl Microbiol Biotechnol. 87(3):787–799. doi:10.1007/s00253-010-2632-1.

Sekar J, Raj R, Prabavathy VR. 2016. Microbial consortial products for sustainable agriculture: Commercialization and regulatory issues in India. In: Agriculturally Important Microorganisms: Commercialization and Regulatory Requirements in Asia. Springer Singapore. p. 107–132.

Silva, A. (2018). Acción *in vitro* de *Trichoderma* spp. y *Bacillus subtilis* como controladores biológicos conjuntos contra *Fusarium oxysporum* en uvilla (*Physalis peruviana*), ecotipo colombiano, en la sierra norte y centro del Ecuador. [Tesis de Pregrado)] Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Singh BN, Singh A, Singh SP, Singh HB. 2011. *Trichoderma harzianum*- mediated reprogramming of oxidative stress response in root apoplast of sunflower enhances defence against *Rhizoctonia solani*. Eur J Plant Pathol. 131(1):121–134. doi:10.1007/s10658-011-9792-4.

Singh M, Singh D, Gupta A, Pandey K, Singh P, Kumar A. 2018. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Application in Biofertilizers and Biocontrol of Phytopathogens. In: Singh A, Kumar A, Kumar Singh P, ed. by. PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture. Duxford: Woodhead Publishing. p. 41-66. [Acceso 2020 Feb 25]. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815879-1.00003-3

Spilker T, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. 2004. PCR-Based Assay for Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from Other *Pseudomonas Species* Recovered from Cystic Fibrosis Patients. J Clin Microbiol. 42(5):2074–2079. doi:10.1128/JCM.42.5.2074-

2079.2004.

Tejera B, Heydrich M, Rojas MM. 2012. Antagonismo de *Bacillus* spp . frente a hongos fitopatógenos del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). 27(2):117–122. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522012000200008.

Thermo Fisher Scientific. 2020. Thermo Fisher Scientific - UK. Thermofisher.com. [acceso 2020 Feb 26]. https://www.thermofisher.com/ec/en/home.html

Tovar J. 2008. Evaluación de la capacidad antagonista *in vivo* de asilamientos de *Tricoderma* spp. frente al hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani* [Tesis de Pregrado]. Pontificia Universidad Javeriana.

Vázquez J. 2010. Caracterización microbiológica y producción de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* en un cultivo artesanal [Tesis de Pregrado]. Pontificia Universidad Javeriana.

Yadav SK, Dave A, Sarkar A, Singh HB. 2013. *Pseudomonas* and *Rhizobium* Improves Crop Growth in Cicer arietinum and *Phaseolus vulgaris*. Int J Agric Environ Biotechnol. 6(Junio):255–259.

Yánez JM, Arellano MJ, Silva AD, Garzón CD. 2019. First Report of *Fusarium* Wilt by *Fusarium oxysporum* in *Physalis peruviana* in Ecuador . Plant Dis. 103(10):2678. doi:10.1094/pdis-10-18-1807-pdn.

Yendyo S, G.C. R, Pandey BR. 2017. Evaluation of *Trichoderma* spp., *Pseudomonas fluorescence* and *Bacillus subtilis* for biological control of Ralstonia wilt of tomato. F1000Research. 6(0):2028. doi:10.12688/f1000research.12448.1.

Yobo K. 2005. Biological control and plant growth promotion by selected *Trichoderma* and *Bacillus* species [Tesis de doctorado]. Universidad de KwaZulu-Natal,.

FIGURAS. -

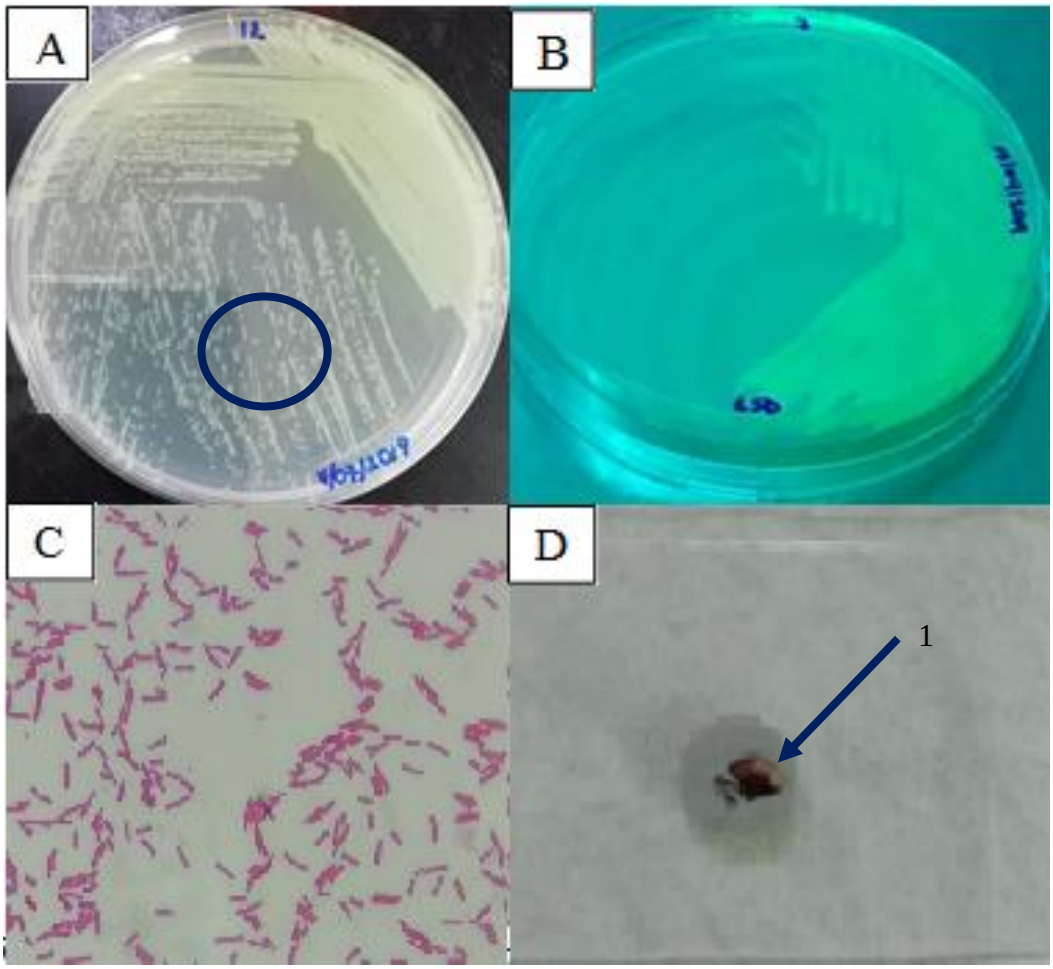


Figura No. 1. Proceso de obtención de *Pseudomonas* spp. A) Colonias aisladas en agar King B. B) Producción de fluorescencia de las colonias aisladas en agar King B bajo luz ultravioleta. C) Tinción Gram: bacilos largos Gram negativos en cadenas y solos, no capsulados. D) Prueba en disco de oxidasa positiva, 1, colonia bacteriana

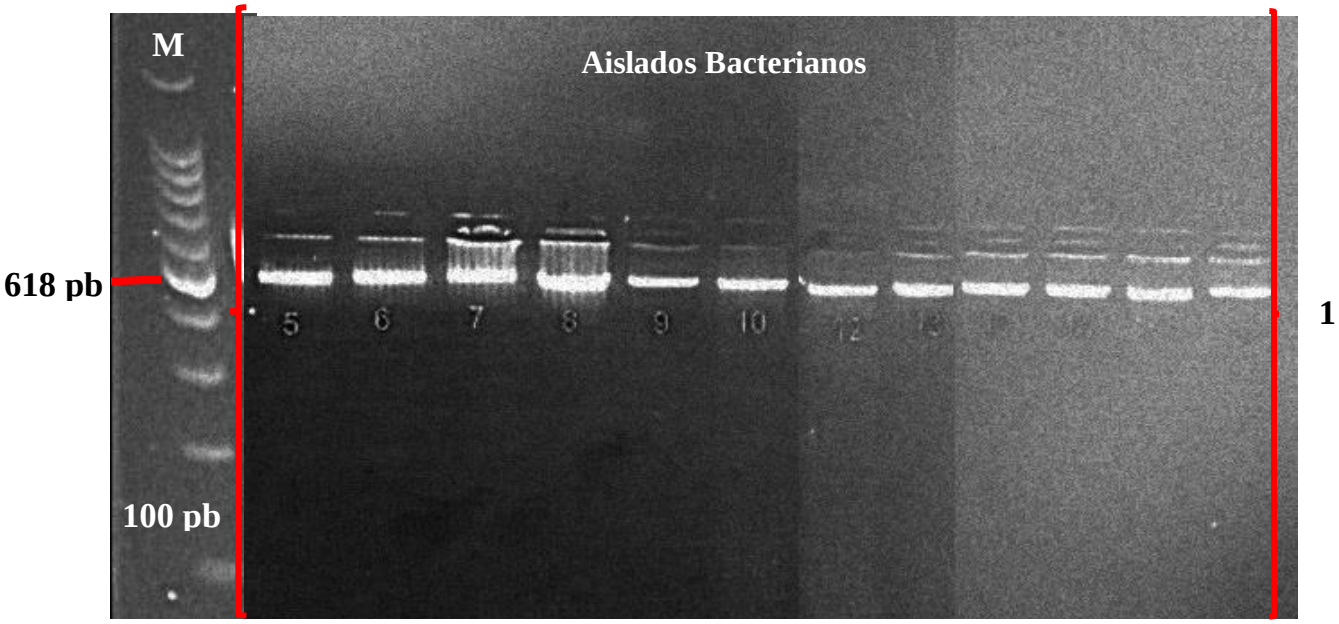


Figura No. 2. Electroforesis en gel de agarosa al 3% por 60 minutos a 90 voltios; M, marcador de peso molecular de 100 pb; 1, pocillos 5 al 10, presentan bandas producto de la amplificación de la región 16S ARNr, con un peso molecular de 618 pb.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Pseudomonas baetica strain S1WB 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1055	1055	100%	0.0	100.00%	MN128027.1
Pseudomonas baetica partial 16S rRNA gene, isolate P2_22B	1055	1055	100%	0.0	100.00%	LT838076.1
Pseudomonas moraviensis partial 16S rRNA gene, isolate P2_20	1055	1055	100%	0.0	100.00%	LT838074.1
Pseudomonas sp. strain p55 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1055	1055	100%	0.0	100.00%	MK559911.1
Pseudomonas helmanticensis strain H16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1055	1055	100%	0.0	100.00%	MK106156.1
Pseudomonas sp. strain MPSM-28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1055	1055	100%	0.0	100.00%	MG494725.1
Pseudomonas sp. strain MPSM-23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1055	1055	100%	0.0	100.00%	MG494724.1

Figura No. 3. Análisis molecular de los aislados mediante la comparación de sus secuencias consenso con secuencias de ADN identificadas con el GenBank NCBI. Porcentaje de identidad del 100% para la especie *Pseudomonas moraviensis.*

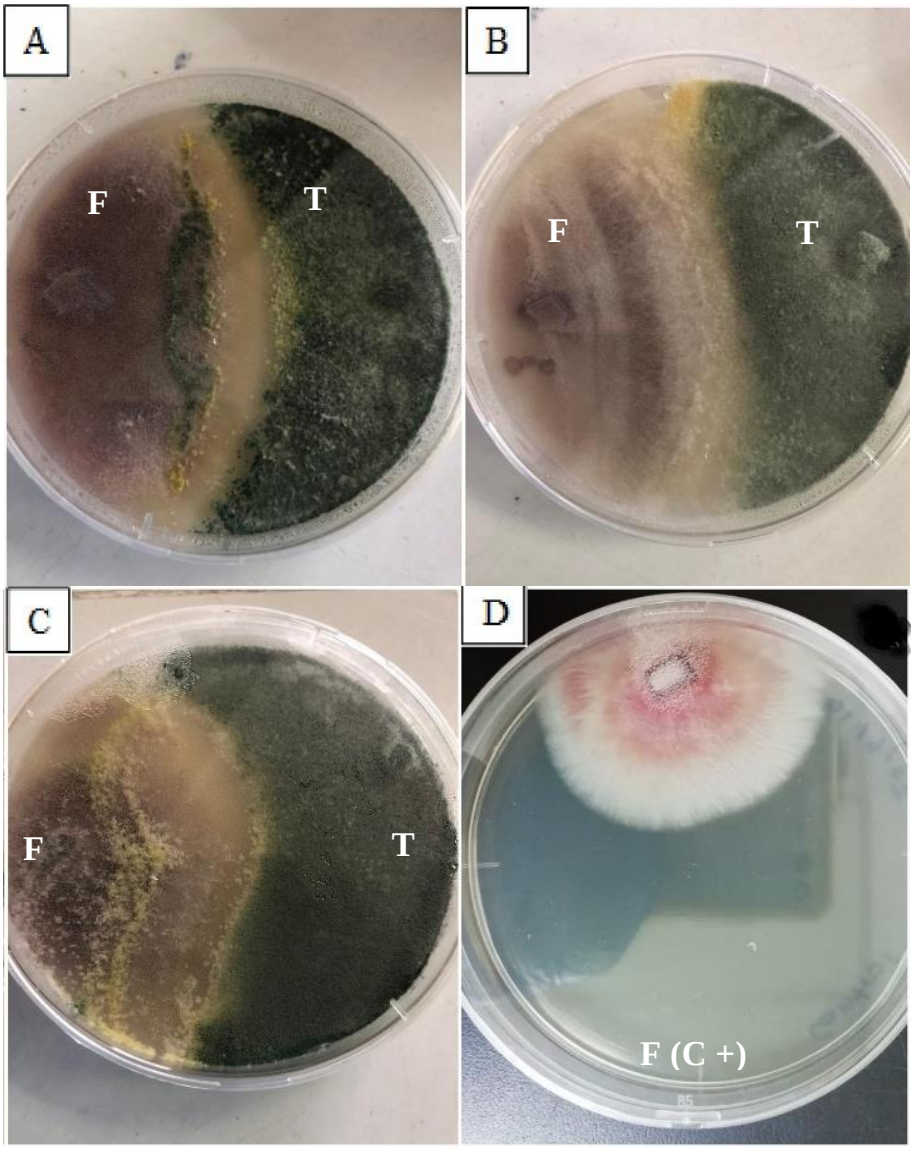


Figura No. 4. Enfrentamiento de *Trichoderma* spp. (T, biocontrolador) vs *F. oxysporum* YC-3 (F, fitopatógeno) en el sexto día. A) Invasión de la cepa SP2AS (*T. atroviride*) sobre el patógeno. B) Enfrentamiento de la cepa PI AS (*T. gamsii*) con el patógeno. C) Colonización de la cepa RB1CS (*T. gamsii*) sobre el patógeno. D) Control positivo del crecimiento de *F. oxysporum* YC-3.

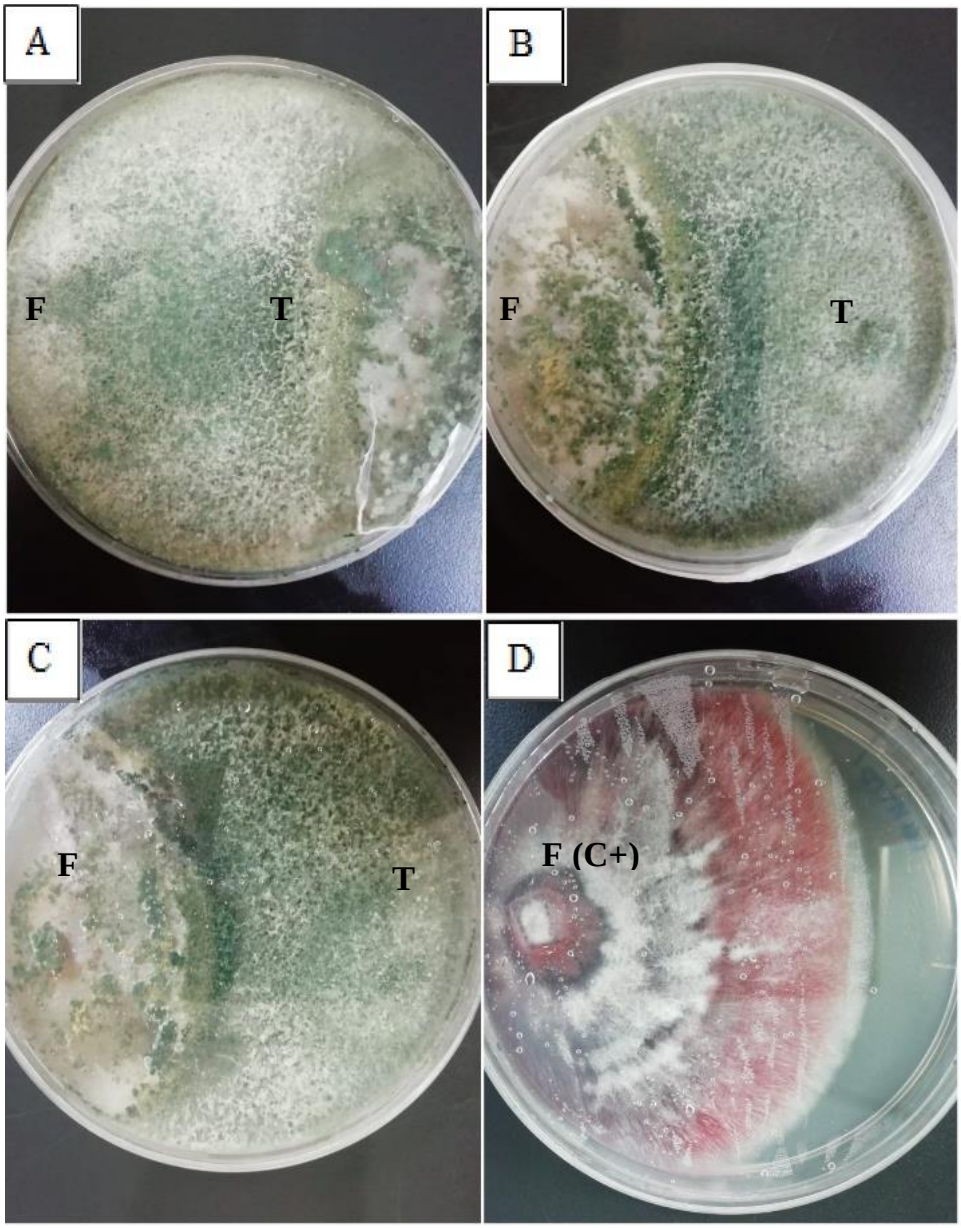


Figura No. 5. Enfrentamiento de *Trichoderma* spp. (T, biocontrolador) vs *F. oxysporum* YC-3 (F, fitopatógeno) en el onceavo día. A) Cubrimiento completo cepa SP2AS (*T. atroviride*) sobre el patógeno. B) Cubrimiento completo de la cepa PIAS (*T. gamsii*) con el patógeno. C) Colonización de la cepa RB1CS (*T. gamsii*) sobre el patógeno. D) Control positivo (F C+) del crecimiento de *F. oxysporum* YC-3.

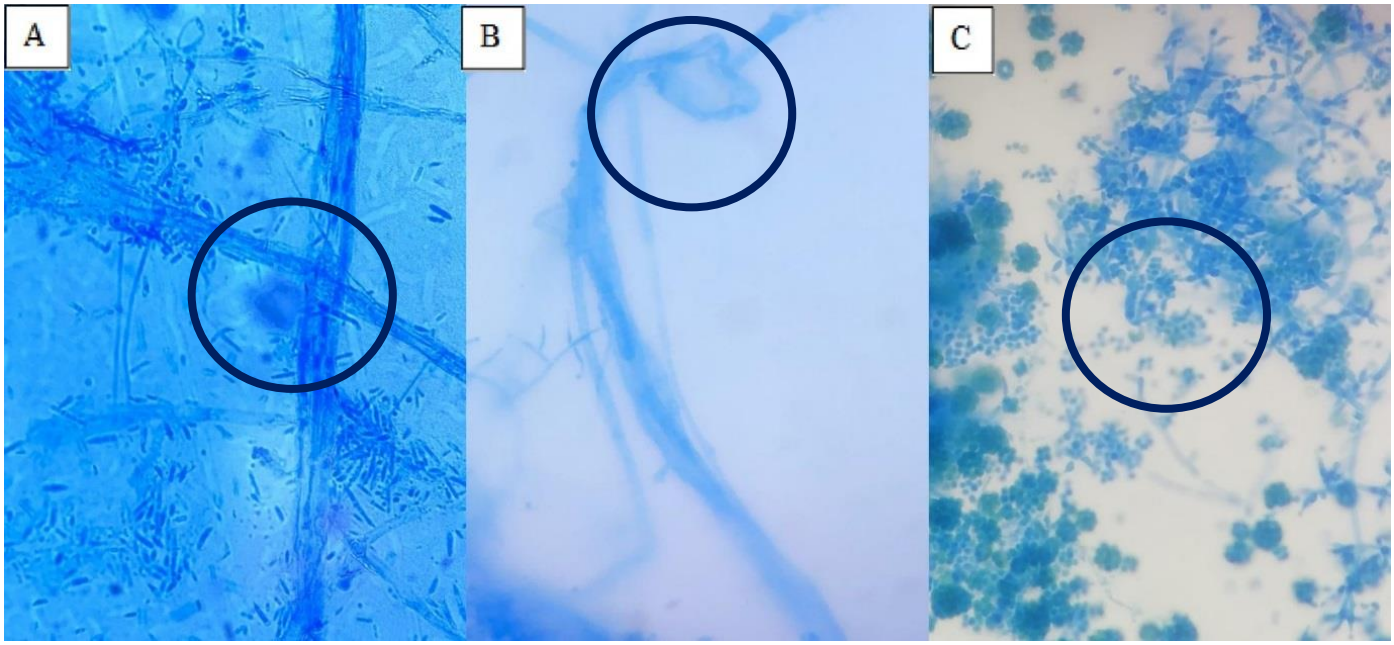


Figura No. 6. Valoración del micoparasitismo de las cepas de *Trichoderma* spp. sobre *F. oxysporum* YC-3. A) Enrollamiento de las hifas de *F. oxysporum*, presencia de micoparasitismo. B) Formación de clamidosporas cepa RB1CS (*T. gamsii*). C) Esporulación de cepa SP2 AS de *Trichoderma atroviride.*

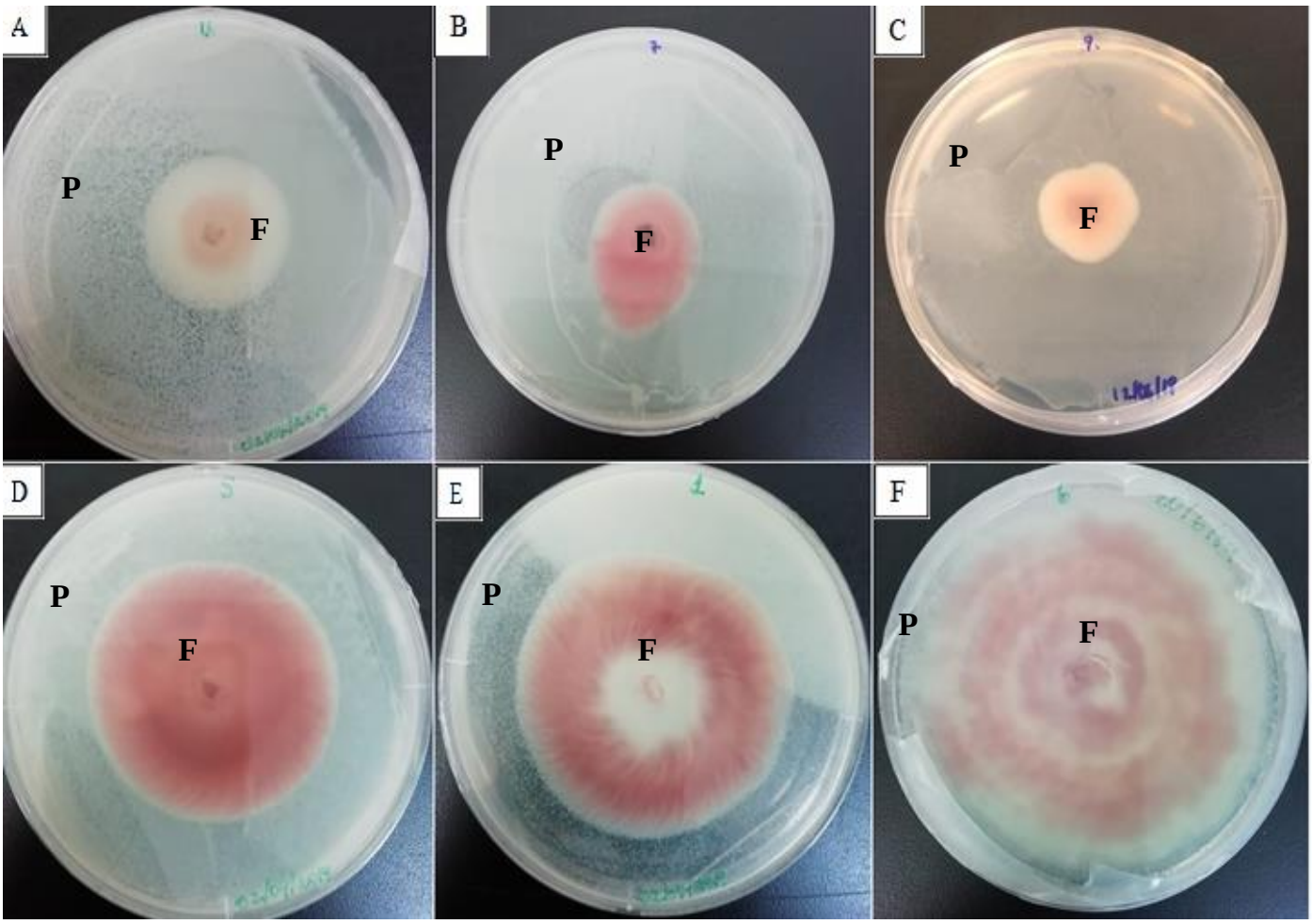


Figura No. 7. Pruebas de antagonismo *in vitro* de *Pseudomonas* spp. (P) frente a *F. oxysporum* YC-3 (F, Fitopatógeno) en el onceavo día. A) Crecimiento radial del patógeno sobre *Pseudomonas baetica* (cepa TagR16). B) Crecimiento radial del patógeno sobre *Pseudomonas putida* (cepa TfS7). Crecimiento radial del patógeno sobre *Pseudomonas reinekei* (cepa SvS9). **A, B y C)** Cepas con porcentaje de inhibición micelial medio. D) Crecimiento radial del patógeno sobre *Pseudomonas fluorescens* (cepa SnR5). E) Crecimiento radial del patógeno sobre *Pseudomonas moraviensis* (cepa TfR1). F) Crecimiento radial del patógeno sobre *Pseudomonas fluorescens* (cepa SnR6). **D, E y F)** Cepas con porcentaje de inhibición micelial negativo.

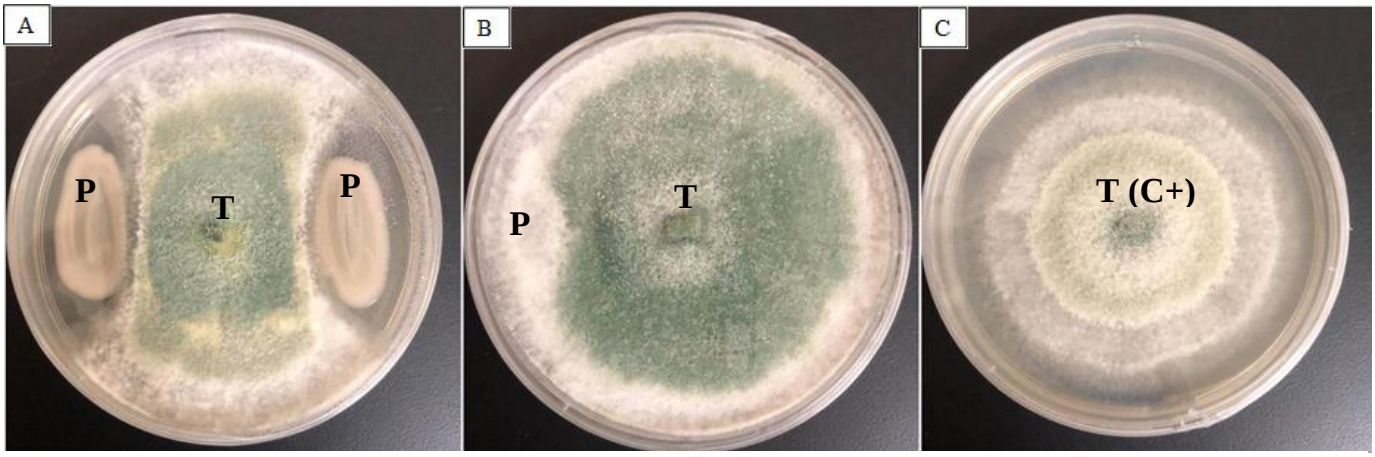


Figura No. 8. Pruebas de compatibilidad entre cepas de *Trichoderma* spp. (T) y cepas de *Pseudomonas* spp. (P) con mayor porcentaje de inhibición micelial contra el patógeno. A) Incompatibilidad de los microorganismos: inhibición de *Trichoderma gamsii* (cepa PI AS) por la acción de las colonias de *Pseudomonas tolaasi* (cepa TagS12) sembradas por estriamiento en los extremos de la caja de Petri. B) Compatibilidad de los microorganismos: crecimiento de *Trichoderma gamsii* (cepa PI AS) sobre las colonias de *Pseudomonas putida* (cepa TfS7). C) Control positivo T (C+) de crecimiento de *Trichoderma gamsii* (cepa PI AS).

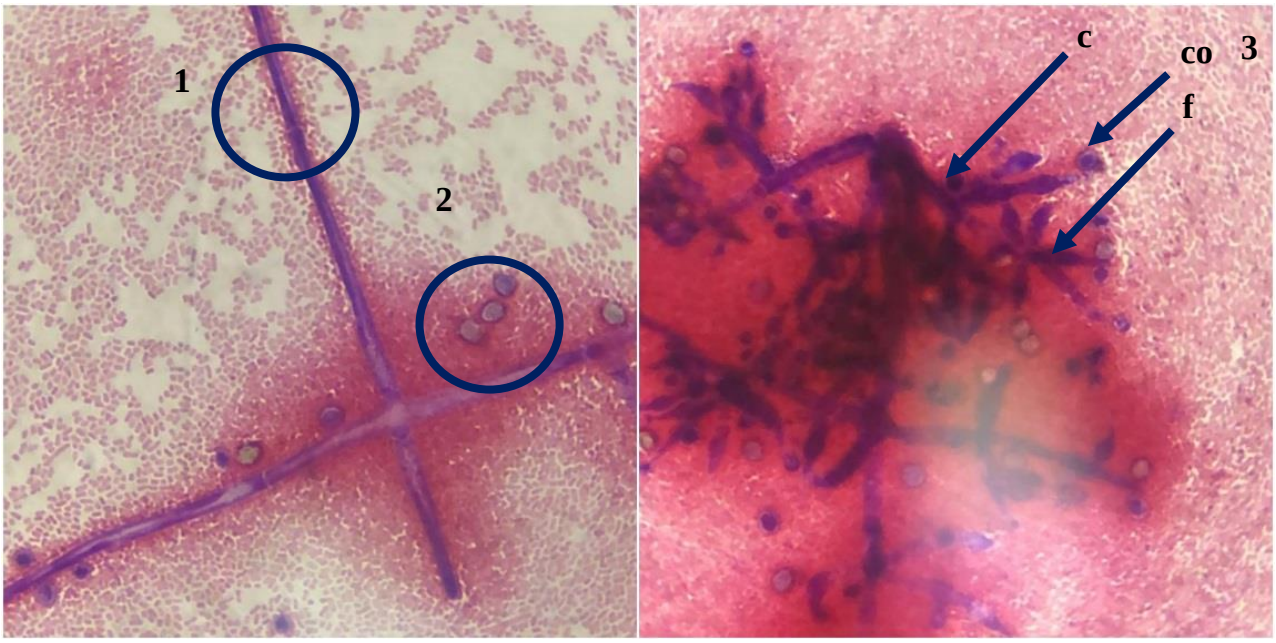


Figura No. 9. Tinción Gram de la compatibilidad entre *T. gamsii* (PI AS) **y *P. baetica* (TagR16).** (1) Hifas y células bacterianas a su alrededor. (2) Esporas fúngicas junto a células bacterianas. (3) Estructuras de *Trichoderma*, donde se distinguen: conidióforos (c), fiálides (f) y conidias (co)

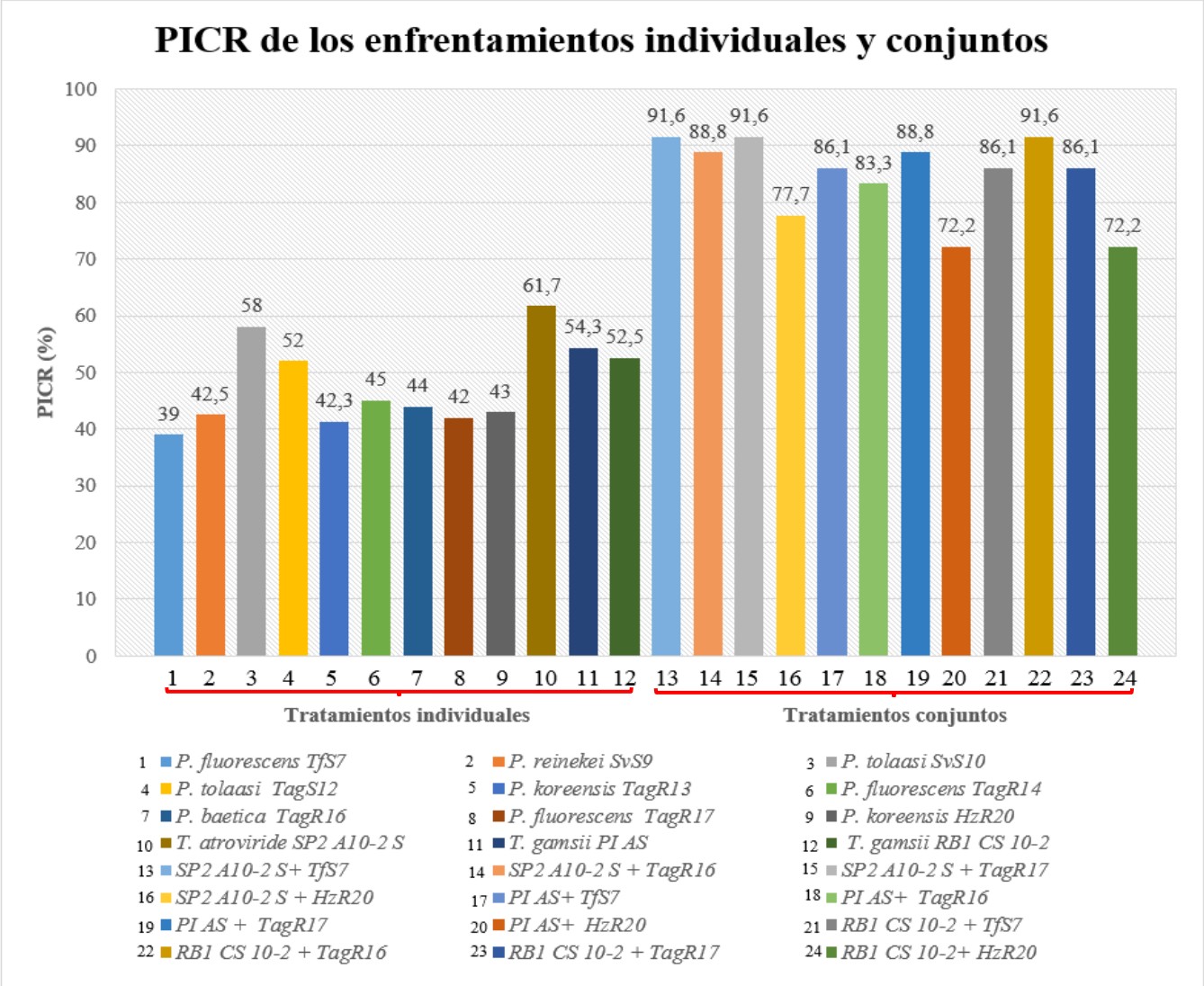


Figura No. 10. Comparación de los PICR de los enfrentamientos conjuntos e individuales. Cada valor representado en el gráfico indica el porcentaje de inhibición de los BCAs frente a *F. oxysporum* YC-3, diferenciados por distintos colores.

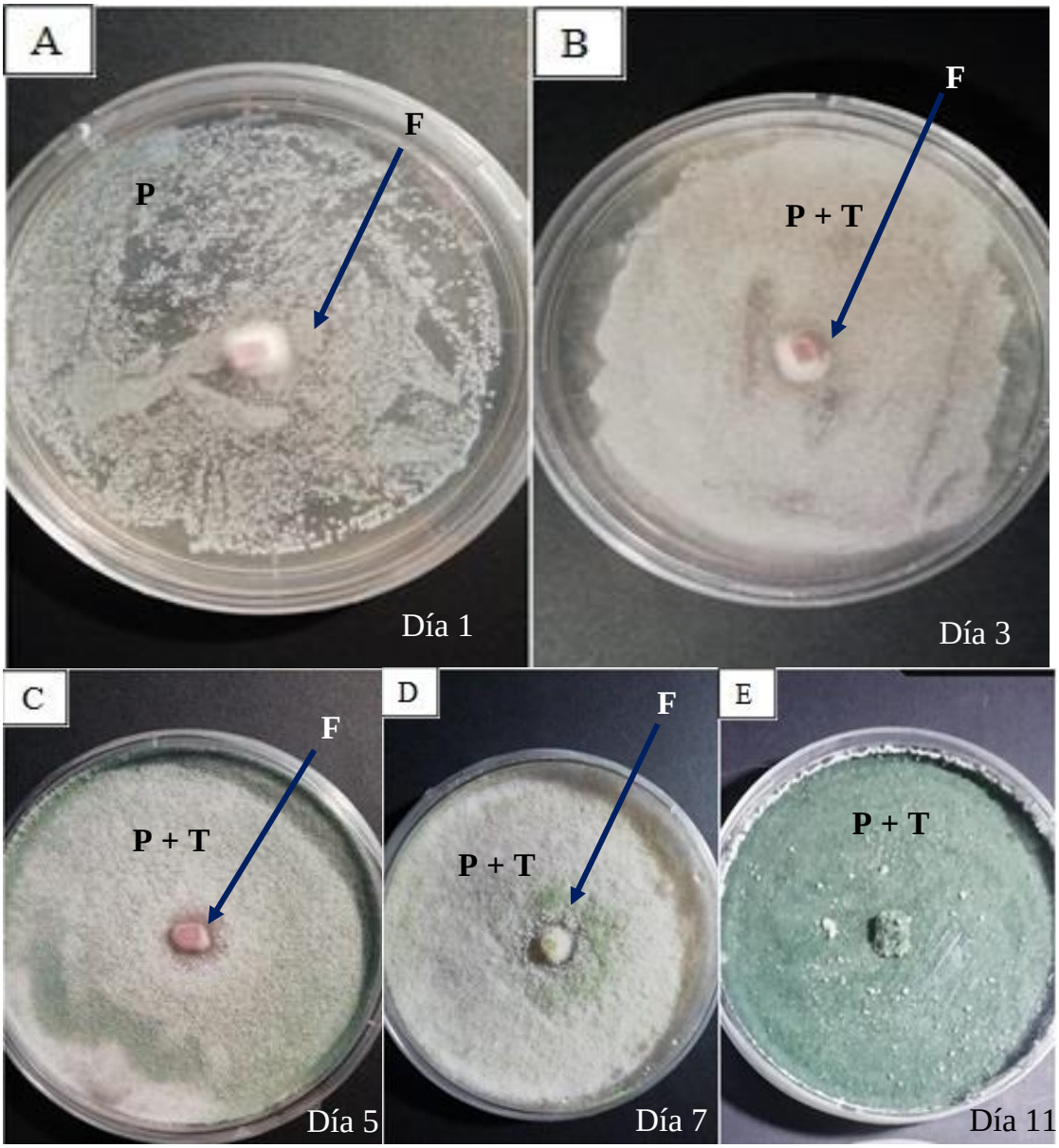


Figura No. 10. Observación del crecimiento radial de *F. oxysporum* YC-3 (F, Fitopatógeno) en presencia del consorcio *Pseudomonas* spp (P). y *Tichoderma* spp. (T) durante 11 días. A) Día 1, crecimiento bacteriano alrededor de colonia del patógeno. B) Día 3, crecimiento de *Trichoderma* junto a *Pseudomonas* alrededor del aumento de la colonia del patógeno. C) Día 5, zona de inhibición en el consorcio (P+T) alrededor del crecimiento del consorcio. D) Día 7, contacto del consorcio con el patógeno y disminución de la zona de inhibición. E) Día 11, crecimiento del consorcio sobre la colonia del patógeno.

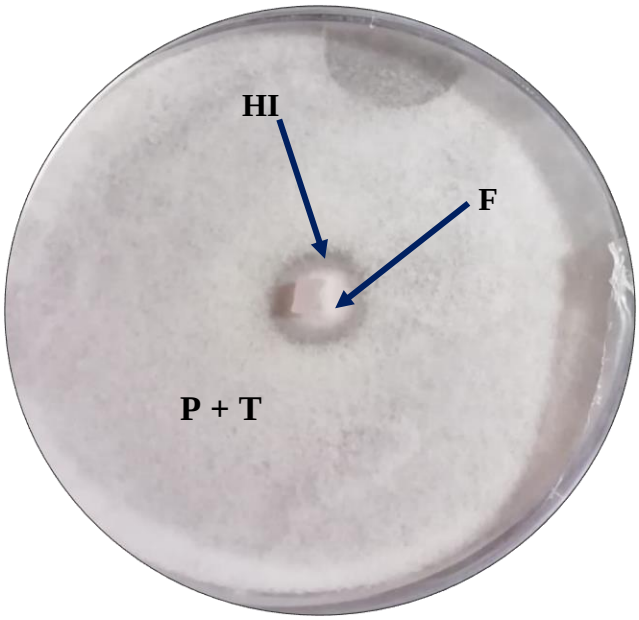


Figura No. 11. *P. koreensis* cepa HzR20 (P) y *T. atroviride* cepa SP2 AS (T) frente *F. osysporum* YC-3 (F, Fitopatógeno). Halo de inhibición (HI) alrededor de la colonia del patógeno.

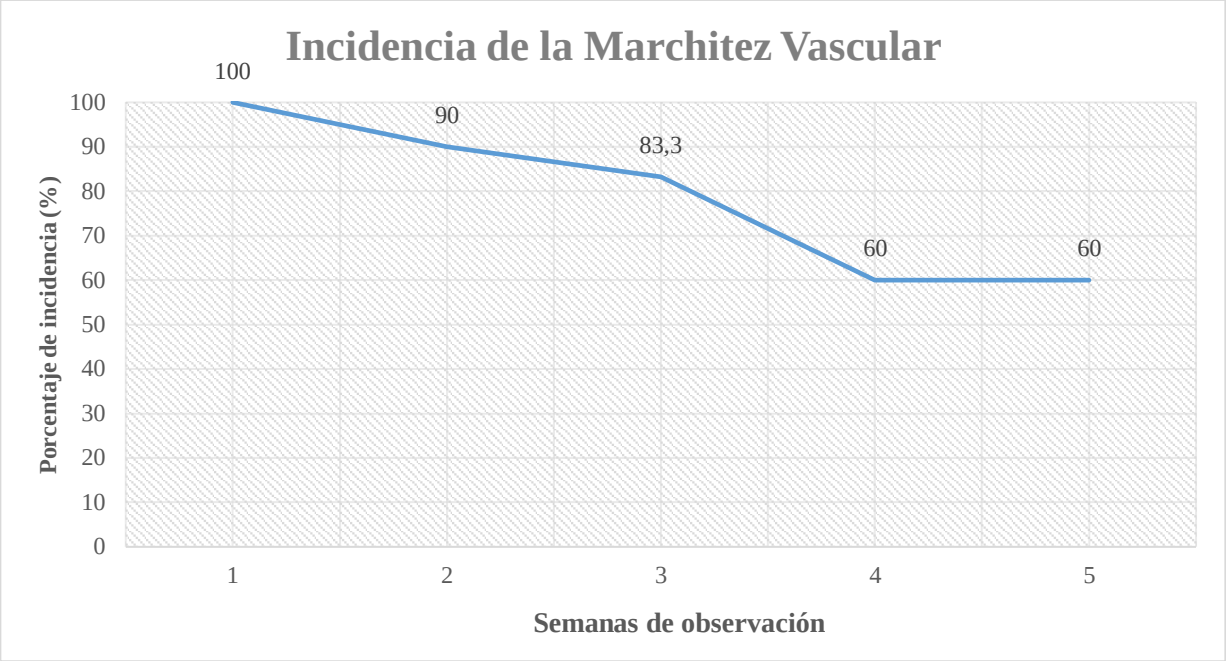


Figura No. 12. Porcentaje de incidencia de la enfermedad observada durante cinco semanas. Cada porcentaje representa el número de plantas enfermas divididas entre la población total de plantas.

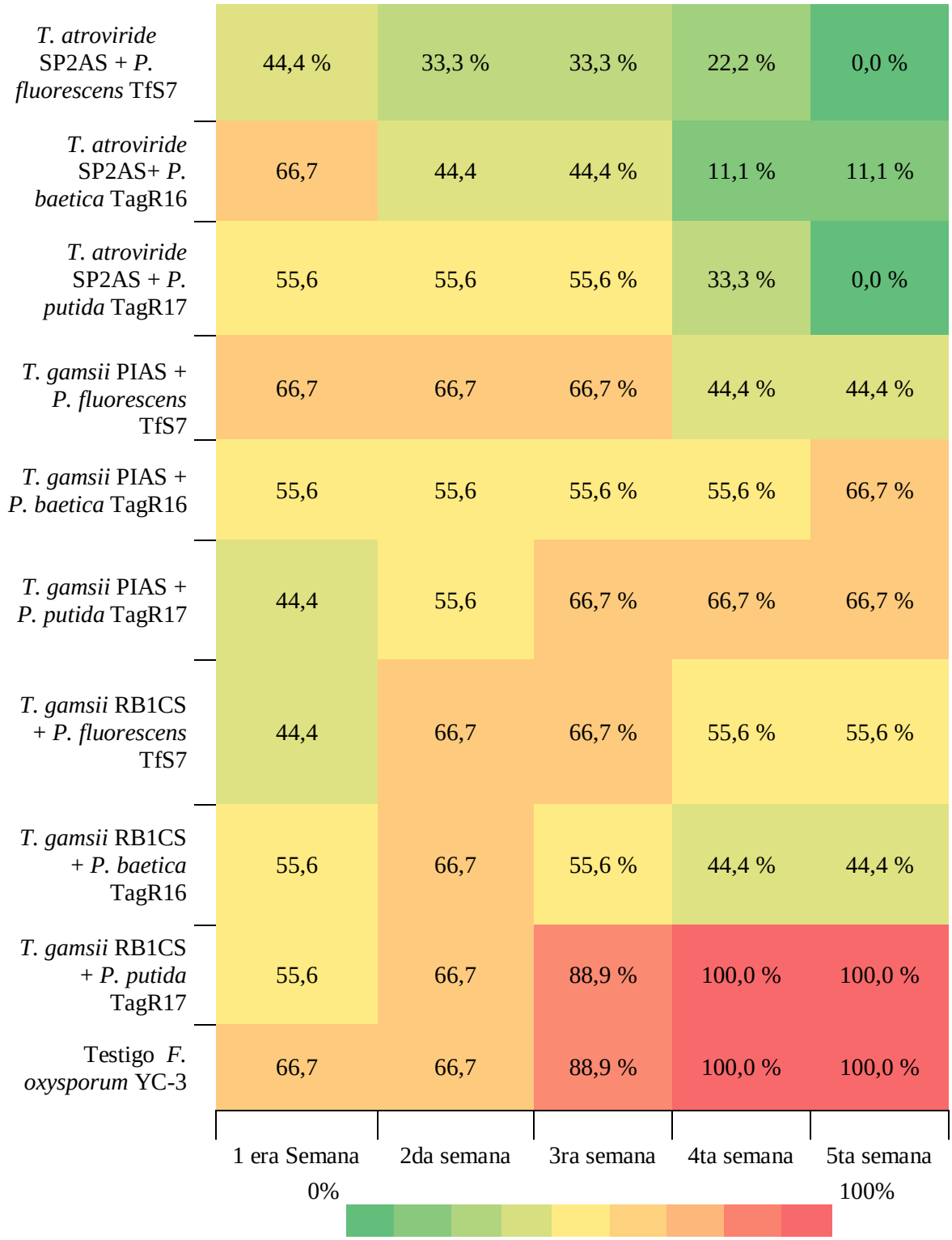


Figura No. 13. Mapa calorimétrico del porcentaje de severidad de la marchitez vascular durante cinco semanas de observación. Los colores representan el porcentaje calculado por la escala de severidad propuesta, donde: **Grado 0** (color verde, 0 -22,2 %)= Ausencia de síntomas de marchitez vascular, rigidez y turgencia del tallo con hojas verdes extendidas. **Grado I** (color verde claro, 33,3- 44,4 %)= Clorosis amarillenta en hojas basales ligeramente marchitas y pérdida leve de turgencia. Síntomas sin mucha evidencia. **Grado II (**color amarillo y naranja, 55,6- 66,7 %)= Síntomas evidentes de la marchitez y sequedad de las hojas, tallos con pérdida media de turgencia. Encopamiento de la planta, marchitez y sequedad de las hojas. **Grado III** (color rojo, 88,9- 100,0 %)= Necrosis vascular del tallo (pudrición seca), pérdida total de hojas y tamaño reducido de la planta.

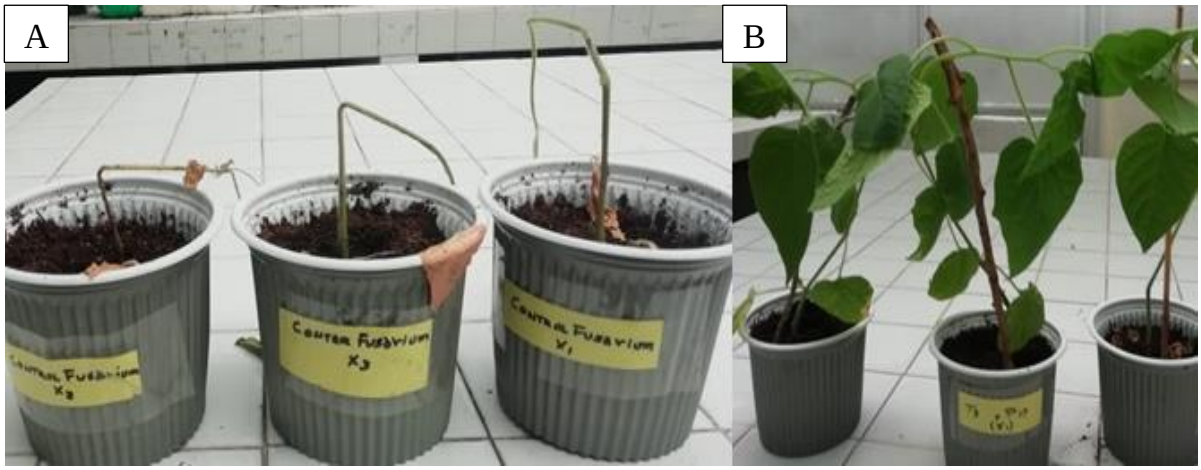


Figura No. 14. Plantas de uvilla infectadas con los tratamientos evaluados después de cinco semanas de observación. A) Control de infección de *F. oxysporum*. (B) Tratamiento *T. atroviride* SP2 AS + *P. putida* TagR17.



Figura No. 15. Plantas de uvilla con los tratamientos evaluados después de cinco semanas de observación. A) Plantas testigo sin inoculación B) Plantas tratadas con los consorcios. C) Hoja perteneciente al tratamiento *T. atroviride* SP2 AS + *P. putida* TagR17.

TABLAS. -

Tabla No. 1. Aislados bacterianos obtenidos de los muestreos realizados en rizósfera y suelo de los cultivos de *Physalis peruviana* en diferentes plantaciones de la Sierra centro y norte del Ecuador.

Código de Aislado	Tipo de Muestra	Porcentaje de Humedad	Cantón y Provincia	Origen de la muestra	Coordenadas
TfR1	Rizósfera	-	Pedro Moncayo/ Pichincha	Plántulas	N 00 14' 21.7"
TfR2	Rizósfera	-	Pedro Moncayo/ Pichincha	Plántulas	N 00 14' 21.7"
TfS3	Suelo	21%	Pedro Moncayo/ Pichincha l	Plantas	N 00 14' 21.7"
TfS4	Suelo	21%	Pedro Moncayo/ Pichincha	Plantas	N 00 14' 21.7"
SnR5	Rizósfera	20.02%	Pedro Moncayo/ Pichincha	Plantas	N 00 01' 52.8"
SnR6	Suelo	20.02%	Pedro Moncayo/ Pichincha	Plantas	N 00 01' 52.8"
TfS7	Suelo	23%	Pedro Moncayo/ Pichincha	Plantas	N 00 14' 21.7"
SvS8	Rizósfera	-	Sigchos/ Cotopaxi	Plántulas	N 00 14' 21.7"
SvS9	Suelo	19%	Sigchos/ Cotopaxi	Plantas	N 00 14' 21.7"
SvS10	Suelo	19%	Sigchos/ Cotopaxi	Plantas	N 00 14' 21.7"
TagS11	Suelo	14%	Sigchos/ Cotopaxi	Plantas	N 00 18’ 09.7
TagS12	Suelo	11%	Sigchos/ Cotopaxi	Plantas	N 00 18’ 09.7
TagR13	Rizósfera	-	Sigchos/ Cotopaxi	Plantas	N 00 18’ 09.7
TagR14	Rizósfera	-	Sigchos/ Cotopaxi	Plantas	N 00 18’ 09.7
TagR15	Rizósfera	-	Sigchos/ Cotopaxi	Plantas	N 00 18’ 09.7
TagR16	Rizósfera	-	Sigchos/ Cotopaxi	Plantas	N 00 18’ 09.7
TagR17	Rizósfera	-	Sigchos/ Cotopaxi	Plantas	N 00 18’ 09.7
HzS18	Rizósfera	-	Cotacachi/Imbabura	Plantas	N 00 15' 17.3"
NjS19	Suelo	14%	Cotacachi/Imbabura	Plantas	S 00 40' 41 5"
HzR20	Rizósfera	-	Cotacachi/Imbabura	Plantas	N 00 15' 17.3"

Códigos de aislados obtenidos en el laboratorio de Fitopatología y Control biológico de la PUCE. Los códigos hacen referencia i) al lugar del muestreo: Tf= Tierra Fértil, Sn= San Luís de Ichisí, Sv= Sivicusig, Tag= Tagna, Hz=Hualzaquí, Nj= Niño Jesús; ii) al tipo de muestra de donde se aislaron: R= rizósfera, S= suelo; y iii) al número de aislado de acuerdo al orden cronológico de obtención: 1-20.

Tabla No. 2. Pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación y caracterización metabólica de los aislados de *Pseudomonas* spp.

Código de Aislado	Dilución	Oxidasa	U	Oxidación Fermentación		SIM	Indol	CN	CIT	LIA	
				O	F					Lisina decarboxilasa	Lisina deaminasa
TfR1	10^{-3}	V+	+	+	+	+	-	-	-	K/A	-
TfR2	10^{-4}	V+	+	+	+	-	-	-	+	K/A	-
TfS3	10^{-6}	+	+	-	-	-	-	-	+	K/K	-
TfS4	10^{-5}	+	+	+	-	+	-	+	+	K/K	-
Sn 5	10^{-4}	+	+	+	-	+	-	-	+	K/A	-
SnR6	10^{-6}	+	+	+	-	+	-	-	-	K/A	-
TfS7	10^{-5}	+	+	+	+	-	-	-	+	K/A producción de gas	-
SvS8	10^{-5}	V+	+	-	-	+	-	+	+	K/K	-
SvS9	10^{-5}	V+	+	+	-	+	-	+	+	K/K	-
SvS10	10^{-5}	+	+	+	-	+	-	+	+	K/K	-
TagS11	10^{-6}	+	+	+	-	-	-	+	+	K/K	-
TagS12	10^{-5}	+	+	+	+	+	-	-	+	K/K	-
TagR13	10^{-5}	+	-	+	-	+	-	+	+	K/K	-
TagR14	10^{-5}	+	+	+	-	+	-	+	+	K/K	-
TagR15	10^{-6}	+	-	+	+	+	-	+	+	K/K	-
TagR16	10^{-6}	+	+	+	-	+	-	+	+	K/K	-
TagR17	10^{-7}	+	+	+	-	+	-	+	-	K/K	-
HzS18	10^{-5}	+	+	+	+	+	-	+	-	K/K	-
NjS19	10^{-6}	+	+	V+	V+	+	-	+	+	K/A	-
HzR20	10^{-5}	+	+	V+	V-	+	-	-	+	K/K	-

Las pruebas bioquímicas utilizadas se basan en el consumo o la producción de un compuesto específico. Los resultados obtenidos se clasifican en positivo (+), negativo (-), variable positiva (V+), variable negativa (V-). Las siglas: U: capacidad de un microorganismo para producir ureasa, Oxidación y fermentación de la glucosa, SIM movilidad, producción de indol y ácido sulfhídrico, CN: caldo nitrato- capacidad de un microorganismo para consumir nitratos y convertirlo en nitrito o nitrógeno, CT: capacidad de un microorganismo para consumir citrato como única fuente de carbono, LIA: lisina hierro agar, determina la decarboxilación y desaminación de la lisina, con resultados K/K superficie alcalina/ profundidad alcalina, K/A superficie alcalina/ profundidad ácida. Los caracteres de la primera columna representan los códigos de cada uno de los aislados bacterianos

Tabla No. 3. Identificación molecular de los aislados obtenidos de *Pseudomonas* spp.

Cepa	Identificación	% de similitud	Valor e	# Acceso gen bank
TfR1	*Pseudomonas moraviensis*	100	0.0	LT838014.1
TfR2	*Pseudomonas putida*	100	0.0	gil1475400886IMH889110.1
TfS3	*Pseudomonas fluorescens*	100	0.0	gil1693841381IMN100098.1
TfS4	*Pseudomonas aeruginosa*	100	0.0	KT943976.1
SnR5	*Pseudomonas fluorescens*	98	0.0	gil1693841381IMN1000981
SnR6	*Pseudomonas fluorescens*	97	0.0	gil1693841359IMN100076.1
TfS7	*Pseudomonas fluorescens*	98	0.0	gil1693841381IMN1000981
SvS8	*Pseudomonas fluorescens*	100	0.0	gil1693841359IMN100076.1
SvS9	*Pseudomonas reinekei*	100	0.0	gil1696260382IMN121224.1
SvS10	*Pseudomonas tolaasi*		0.0	gil1633436583IMK883064.1
TagS11	*Pseudomonas vancouverensis*	100	0.0	gil1621556927IMK3302259.1
TagS12	*Pseudomonas tolaasi*	97	0.0	gil1633436583IMK883064.1
TagR13	*Pseudomonas koreensis*	98	0.0	gil1720567254IMN272363.1
TagR14	*Pseudomonas fluorescens*	98	0.0	gil1705115122IMN180839.1
TagR15	*Pseudomonas baetica*	100	0.0	gil1633436655IMK883135.1
TagR16	*Pseudomonas baetica*	100	0.0	gil1633436627IMK883107.1
TagR17	*Pseudomonas putida*	98	0.0	gil1475400886IMH889110.1
HzS18	*Pseudomonas reinekei*	97	0.0	gil1696260382IMN121224.1
NjS19	*Pseudomonas gessardi*	99	0.0	Gil1633436654IMK883134.1
HzR20	*Pseudomonas koreensis*	100	0.0	Gil1720567254IMN272363.1

Los caracteres de la primera columna representan los códigos de cada uno de los aislados bacterianos

Tabla No. 4. Porcentajes de inhibición de crecimiento radial (PICR%) por enfrentamiento de las cepas de *Trichoderma* spp. vs *F. oxysporum* YC-3.

Tratamiento	PICR (%)	Capacidad antagonista
***T. atroviride* SP2AS**	61,7 ± 1,32	Colonización del patógeno, esporulación, micoparasitismo y enrollamiento de hifas del patógeno.
***T. gamsii* PIAS**	54,3± 0,76	Invasión al patógeno, formación de clamidosporas, micoparasitismo y esporulación.
***T. gamsii* RB1CS**	52,5± 0,59	Colonia del patógeno cubierto por completo, esporulación y micoparasitismo

Los valores obtenidos representan la media y la desviación estándar de tres réplicas diferentes del mismo ensayo. La capacidad antagonista se presenta por los mecanismos de acción y características observadas de *Trichoderma* spp. durante el enfrentamiento con el patógeno.

Tabla No. 5. Promedios porcentuales de la inhibición micelial por el enfrentamiento de las cepas de *Pseudomonas* spp. vs *F. oxysporum* YC-3.

Tratamiento	Promedio (%)	Resultados
TfR1 *P. moraviensis*	24,4 ± 0,87	IB
TfR2 *P. putida*	19,4 ± 1,75	IB
TfS3 *P. fluorescens*	23,2 ± 2,33	IB
TfS4 *P. aeruginosa*	33,9 ± 1,68	IB
SnR5 *P. fluorescens*	33,8 ± 1,49	IB
SnR6 *P. fluorescens*	0 ± 0	N
TfS7 *P. fluorescens*	39 ± 1,53	IM
SvS8 *P. fluorescens*	33,3 ± 0,88	IB
SvS9 *P. reinekei*	42,5 ± 1,66	IM
SvS10 *P. tolaasi*	58 ± 0,42	IM
TagS11 *P. vancouverensis*	35,6 ± 1,29	IB
TagS12 *P. tolaasi*	52 ± 0,61	IM
TagR13 *P. koreensis*	41,3 ± 0,95	IM
TagR14 *P. fluorescens*	45 ± 0,97	IM
TagR15 *P. baetica*	24,3 ± 1,24	IB
TagR16 *P. baetica*	44 ± 1,74	IM
TagR17 *P. fluorescens*	42 ± 2,31	IM
HzS18 *P. reinekei*	29,5 ± 2,04	IB
NjS19 *P. gessardi*	36,9 ± 1,81	IB
HzR20 *P. koreensis*	43 ± 1,76	IM

Los valores obtenidos representan la media y la desviación estándar del PIM. N) Negativo= porcentaje menor al 10% o ausencia de inhibición, IB) inhibición baja: porcentaje entre 10-39%, IM) inhibición media: porcentaje entre 40- 69% y P) positivo= porcentaje entre 70- 100% (Tejera et al. 2012). Los caracteres de la primera columna representan los códigos de cada uno de las cepas bacterianas

Tabla No. 6. Pruebas de compatibilidad de *Pseudomonas* spp. junto a *Trichoderma* spp.

Combinaciones	Crecimiento radial (mm)	Resultado
T. atroviride SP2AS + *P. fluorescens* TfS7	4,3 ± 0,2	C
T. atroviride SP2AS + *P. reinekei* SvS9	1,8 ± 0,21	I
T. atroviride SP2AS + *P. tolaasi* SvS10	2,0 ± 0,45	I
T. atroviride SP2AS + *P. tolaasi* TagS12	2,0 ± 1,32	I
T. atroviride SP2AS + *P. koreensis* Tag R13	1,7 ± 1,21	I
T. atroviride SP2AS + *P. fluorescens* TagR14	2,0 ± 0,82	I
T. atroviride SP2AS + *P. baetica* TagR16	5 (Cubierto) ± 0,1	C
T. atroviride SP2AS + *P. fluorescens* TagR17	5 (Cubierto) ± 0,1	C
T. atroviride SP2AS + *P. koreensis* HzR20	3,6 ± 0,59	C
CONTROL *T. atroviride* SP2AS	4,5 ± 2,65	
T. gamsii PIAS + *P. fluorescens* TfS7	5 (Cubierto) ± 1,75	C
T. gamsii PIAS + *P. reinekei* SvS9	2,3 ± 1,90	I
T. gamsii PIAS + *P. tolaasi* SvS10	2,1 ± 0,73	I
T. gamsii PIAS + *P. tolaasi* TagS12	2,0 ± 2,0	I
T. gamsii PIAS + *P. koreensis* TagR13	1,9 ± 1,33	I
T. gamsii PIAS + *P. fluorescens* TagR14	2,1 ± 2,76	I
T. gamsii PIAS + *P. baetica* TagR16	5 (Cubierto) ± 0,4	C
T. gamsii PIAS + *P. fluorescens* TagR17	4,6 ± 0,76	C
T. gamsii PIAS + *P. koreensis* HzR20	4,3 ± 1,47	C
CONTROL *T. gamsii* PIAS	5,0 ± 1,87	
T. gamsii RB1CS + *P. fluorescens* TfS7	5 (Cubierto) ± 0,55	C
T. gamsii RB1CS + *P. reinekei* SvS9	2,3 ± 0,91	I
T. gamsii RB1CS + *P. tolaasi* SvS10	2,0 ± 1,26	I
T. gamsii RB1CS + *P. tolaasi* TagS12	1,5 ± 0,67	I
T. gamsii RB1CS + *P. koreensis* TagR13	1,7 ± 0,39	I
T. gamsii RB1CS + *P. fluorescens* TagR14	1,9 ± 1,45	I
T. gamsii RB1CS + *P. baetica* TagR16	5,0 ± 0,26	C
T. gamsii RB1CS + *P. fluorescens* TagR17	4,0 ± 0,41	C
T. gamsii RB1CS + *P. koreensis* HzR20	5 (Cubierto) ± 0,79	C
CONTROL *T. gamsii* RB1CS	4,7 ± 1,58	-

Los valores obtenidos representan la media y la desviación estándar del crecimiento radial de *Trichoderma* spp. en combinación con *Pseudomonas* spp y sus controles. Los resultados se clasifican en C) Compatible: crecimiento de la colonia de *Trichoderma* spp. sobre las colonias de *Pseudomonas* spp. sin la presencia de halos de inhibición. I) Incompatible: Inhibición del crecimiento radial de la colonia de *Trichoderma* spp. causada por las colonias de *Pseudomonas* spp.

Tabla No. 7. Promedios de los resultados obtenidos de evaluación en la capacidad antagonista de los consorcios frente a *F. oxysporum* YC-3 en condiciones de invernadero. Tukey p<0.05.

Tratamiento	Longitud de raíces (cm)	Longitud de tallos (cm)	Área foliar (cm)	Porcentaje de humedad del material vegetal (%)
Testigo *F. oxysporum*	14,06 ± 1,67^{bcdefghij}	32,53 ± 0,29^{bcij}	0 ± 0^{bcdefghij}	5,71 ± 0,10^{bcdehi}
T. atroviride SP2AS + *P. fluorescens* TfS7	34,83 ± 1,28^{abcdefghij}	43,57 ± 1,40 aeghij	81,74 ± 3,03 acefgh	19,81 ± 2,98^{adfgij}
T. atroviride SP2AS+ *P. baetica* TagR16	20 ± 1,87^{abhi}	42,87 ± 1,01 aeghij	97,63 ± 2,29 aefghj	20,46 ± 3,23^{adfgij}
T. atroviride SP2AS + *P. putida* TagR17	18,66 ± 0,57^{abhi}	39,9 ± 2,05^{aei}	105,6 ± 1,49 abcefghj	28,71 ± 0,60^{abcefgj}
T. gamsii PIAS + *P. fluorescens* TfS7	18,63 ± 1,40^{abhi}	27,3 ± 0,75 bcdfhi	13,24 ± 3,20 abcdij	14,82 ± 1,13^{adfhi}
T. gamsii PIAS + *P. baetica* TagR16	17,83 ± 1,04^{abhi}	36,3 ± 1,51^{ei}	25,19 ± 2,86 abcdij	4,13 ± 1,02^{bcdehij}
T. gamsii PIAS + *P. putida* TagR17	20 ± 1,91^{abhi}	31,57 ± 2,93^{bci}	12,34 ± 1,69 acdij	9,11 ± 1,44^{bcdhi}
T. gamsii RB1CS + *P. fluorescens* TfS7	19,46 ± 0,55^{abcdefgj}	35,23 ± 4,21^{bcei}	11,53 ± 1,79 abcdij	24,17 ± 2,09^{aefgij}
T. gamsii RB1CS + *P. baetica* TagR16	29,06 ± 1,90^{abcdefgj}	52,1 ± 2,53 abcdfghj	98,05 ± 0,42 aefghj	40 ± 3,36^{abcefghj}
T. gamsii RB1CS + *P. putida* TagR17	16,16 ± 1,03^{abdhi}	33,4 ± 2,62^{bci}	15,4 ± 2,33 acdefghi	8,13 ± 1,61^{bcdhi}

Cada valor es la media ± desviación estándar de tres experimentos separados del mismo tratamiento. [a] ES*en comparación con el tratamiento testigo de infección con *F. oxysporum*.[b] ES en comparación con el consorcio *T. atroviride* SP2AS + *P. fluorescens* TfS7. [c] ES en comparación con el consorcio *T. atroviride* (SP2AS) + *P. baetica* TagR16. [d] ES en comparación con el consorcio *T. atroviride* (SP2AS) + *P. putida* TagR17. [e] ES en comparación con el consorcio *T. gamsii* PI AS + *P. fluorescens* TfS7. [f] ES en comparación con el consorcio *T. gamsii* PI AS + *P. baetica* TagR16. [g] ES en comparación con el consorcio *T. gamsii* PI AS + *P. putida* TagR17. [h] ES en comparación con el consorcio *T. gamsii* RB1 CS + *P. fluorescens* TfS7. [i] ES en comparación con el consorcio *T. gamsii* RB1CS + *P. baetica* 16tTagR. [j] ES en comparación con el consorcio *T. gamsii* RB1 CS + *P. putida* TagR17. ***ES**= Estadísticamente significativo en el nivel de confianza p <0.05)

Tabla No. 8. Promedios de los resultados obtenidos en los ensayos de la capacidad biofertilizante de los consorcios. Tukey p<0.05.

Tratamiento	Longitud de raíces (cm)	Longitud de tallos (cm)	Área foliar (cm)	Porcentaje de humedad del material vegetal (%)
Blanco	19,66 ± 2,52^{hij}	42,55 ± 2,13 ^{bcdefghij}	64,51 ± 1,38^{defhij}	22,16 ± 1,74^{defghj}
T. atroviride SP2AS + *P. fluorescens* TfS7	17,6 ± 2,42^{cdghij}	60,86 ± 3,06 ^{ae}	110,66 ± 2,01^{adefij}	25,78 ± 3,04^{defhj}
T. atroviride SP2AS + *P. baetica* TagR16	23,23 ± 0,68^{bhij}	66,63 ± 2,12 ^{ae}	105,12 ± 2,0^{adefhij}	25,28 ± 3,04^{defhj}
T. atroviride SP2AS + *P. putida* TagR17	23,2 ± 1,58 ^{bhij}	63,66 ± 3,04 ^{ae}	126,67 ± 1,17 ^{abcfghij}	37,11 ± 2,28^{abcfg}
T. gamsii PIAS + *P. fluorescens* TfS7	21,733 ± 1,12^{hij}	79,23 ± 3,22 ^{a}	120,86 ± 1,33 ^{abcdfghij}	36,44 ± 2,71 ^{abcfgh}
T. gamsii PIAS + *P. baetica* TagR16	21,83 ± 1,80^{hij}	65,56 ± 3,27 ^{ae}	150 ± 2,5 ^{abceghij}	44,43 ± 0,45^{abcdegij}
T. gamsii PIAS + *P. putida* TagR17	23,9 ± 0,95 ^{bhij}	64,2 ± 2,30 ^{ae}	110,72 ± 2,47 ^{adefij}	22,82 ± 3,56^{defhij}
T. gamsii RB1CS 1 + *P. fluorescens* TfS7	37,56 ± 2,37 ^{abcdefgij}	63,33 ± 3,16 ^{ae}	111,04 ± 3,06 ^{acdefij}	43,82 ± 1,02^{abcegij}
T. gamsii RB1CS + *P. baetica* TagR16	43,73 ± 1,41 ^{abcdefghj}	69,33 ± 2,51 ^{a}	73,81 ± 2,69 ^{abcdefghj}	30,97 ± 0,712 ^{afgh}
T. gamsii RB1CS + *P. putida* TagR17	42,5 ± 1,80 ^{abcdefghi}	63 ± 3,40 ^{ae}	141,56 ± 1,43 ^{abcdefghi}	36,74 ± 1,83 ^{abcfgh}

Cada valor es la media ± desviación estándar de tres experimentos separados del mismo tratamiento. [a] *ES en comparación con el tratamiento testigo blanco sin inoculación. [b] ES en comparación con el consorcio *T. atroviride* SP2 AS + *P. fluorescens* TfS7. [c] ES en comparación con el consorcio *T. atroviride* SP2AS + *P. baetica* TagR16 [d]. ES en comparación al consorcio *T. atroviride* SP2 AS + *P. putida* TagR17. [e] ES en comparación con el consorcio *T. gamsii* PIAS + *P. fluorescens* TfS7. [f] ES en comparación con el consorcio *T. gamsii* PIAS + *P. baetica* TagR16. [g] ES en comparación con el consorcio *T. gamsii* PIAS + *P. putida* TagR17. [h] ES en comparación con el consorcio *T. gamsii* RB1CS + *P. fluorescens* TfS7. [i] ES en comparación con el consorcio *T. gamsii* RB1CS + *P. baetica* TagR16. [j] ES en comparación con el consorcio *T. gamsii* RB1CS + *P. putida* TagR17. ***ES=** Estadísticamente significativo en el nivel de confianza p <0.05)