

Bacterias *Bacillus* sp. de suelo y de rizósfera en consorcio para el biocontrol de fitopatógenos de la raíz en *Capsicum annum* L.

Atzin Fraire Mayorga¹, Yadira Yumiko de La Cruz Rodríguez¹,
Alejandro Alvarado Gutiérrez¹, Miguel Alvarado Rodríguez², Saúl Fraire Velázquez¹

¹Unidad Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Zacatecas,
Av. Preparatoria s/n, Col. Agronómica, Zacatecas, Zac. CP. 98607

²Unidad Académica de Agronomía, Universidad Autónoma de Zacatecas,
Carr. Zacatecas-Guadalajara km 15, Cieneguillas, Zac. CP. 98170.

atzinFM@hotmail.com

Resumen: Ante problemas de contaminación ambiental y toxicidad en humanos por el uso de pesticidas en la agricultura, el biocontrol de fitopatógenos cobra cada vez mayor importancia. Pérdidas cuantiosas por problemas de pudrición de la raíz en el cultivo del chile son una constante en las zonas productoras de esta hortaliza en México. El propósito de este trabajo fue analizar la funcionalidad de tres consorcios de bacterias *Bacillus* sp. en condiciones *in vitro* e invernadero, para contrarrestar simultáneamente tres patógenos de la raíz en chile, a partir de una colección de cepas previamente probadas individualmente como avirulentas en plántulas de chile e inhibitoras de los patógenos de la raíz en pruebas *in vitro*. En resultados, en estudios *in vitro* el consorcio 1 compuesto por cuatro cepas bacterianas (2A-2B, 2A-10A, 3A-25B y 3A-6BI) compromete la interacción avirulenta en planta. Los tres consorcios probados forman biopelícula sobre la raíz en planta y compiten por espacio contra los patógenos. El consorcio 3 (cepas 1-10A, 2A-10A y MR50-11A) ofrece mayor efecto protector en planta. En pruebas de invernadero, los tres consorcios de bacterias protegen en raíz ante los patógenos, forman biopelícula sobre la raíz y además promueven crecimiento en la planta.

Palabras clave: biocontrol, fitopatógenos, chile, consorcios bacterianos.

Abstract: Faced with problems of environmental contamination and toxicity in humans due to the use of pesticides in agriculture, the biocontrol of phytopathogens is becoming increasingly important. Large losses due to root rot problems in the cultivation of chili are a constant in the producing areas of this vegetable in Mexico. The purpose of this work was to analyze the functionality of three consortiums of *Bacillus* sp. under *in vitro* and greenhouse conditions, to simultaneously counteract three root pathogens in chili, from a collection of strains previously individually tested as friendly in chili seedlings and inhibitors of root pathogens in *in vitro* tests. In results, in *in vitro* studies, consortium 1 composed of four bacterial strains (2A-2B, 2A-10A, 3A-25B and 3A-6BI) compromises the friendly interaction in the plant. The three consortia tested form biofilm on the plant root and compete for space against pathogens. Consortium 3 (strains 1-10A, 2A-10A and MR50-11A) offers a greater protective effect on the plant. In greenhouse tests, the three consortia of bacteria protect the roots against pathogens, form biofilm on the root and also promote plant growth.

Keywords: biocontrol, phytopathogens, chilli pepper, bacterial consortiums.

1. Introducción

En la agricultura convencional predomina el uso intensivo de productos químicos en carácter de pesticidas y fertilizantes, con el propósito de lograr un sistema de producción de alta eficiencia, para un rápido retorno del capital invertido que genere además las mayores ganancias [1]. En la producción mundial de chiles México destaca en segundo lugar después de China, seguido por Turquía; aunque en chile seco la India, Paquistán y Etiopía sobresalen después de China, quedando México en 5º lugar [2]. Así, México se ha convertido en uno de los principales países productores de chile en el mundo; se cultiva en los 32 estados de la república, donde destacan Chihuahua, Sinaloa,

Guanajuato, Zacatecas y Sonora. Para el periodo del 2014 al 2018, la superficie sembrada a nivel nacional con chile verde ascendió en promedio anual a 122,997 hectáreas, arrojando un valor de la producción de 17,111.8 millones de pesos por año [4].

El estado de Zacatecas es líder a nivel nacional en la producción de chile seco, sin embargo, se tiene un rendimiento bajo, pues apenas se obtienen 1.7 t/h [3]. Un escaso rendimiento es reflejo de un bajo nivel de tecnología, donde figuran como problemas relevantes las enfermedades que afectan al cultivo. La marchitez del chile causada por hongos que afectan el sistema radical es un problema constante año con año en las parcelas de chile. Las especies *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* comúnmente se

presentan en consorcio para causar los mayores daños a la raíz de las plantas, donde se considera que el oomiceto *P. capsici* es uno de los patógenos causantes de necrosis mas agresivos.

Por otro lado, en relación a la inocuidad, el mercado y los consumidores imponen cada vez mas exigencias forzando al menor uso de pesticidas, potenciando las prácticas agrícolas amigables al medio ambiente y además con contenido biotecnológico. En este escenario el control biológico de los patógenos en plantas, emerge como una opción plausible que puede permitir la notable disminución de los efectos adversos causados por los microorganismos perjudiciales, y de paso, con la menor cantidad de pesticidas aplicados se reducen los riesgos de contaminación ambiental. Control biológico en fitopatología comprende la utilización de microorganismos capaces de suprimir a los patógenos causantes de enfermedades, y en un contexto mas amplio y mas reciente, el biocontrol implica el uso de organismos silvestres u organismos modificados, sus genes, o sus productos, para favorecer a los organismos deseables tales como microbios, insectos y las mismas plantas [5].

Una variedad de especies de bacterias se viene utilizando como agentes de biocontrol para hacer frente a los fitopatógenos. En algunos casos, en estas bacterias se manifiesta la doble funcionalidad, por un lado, ayudan en la inhibición de los patógenos, y por el otro, pueden favorecer el crecimiento de las plantas, razón por la cual, también se les ha llamado bacterias promotoras del crecimiento vegetal, y si estas son nativas de la rizósfera (capa de suelo que rodea las raíces) se les ha llamado rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, pero en sentido mas amplio, los microorganismos antagonistas hacia los fitopatógenos que se vienen utilizando a escala global, han sido encontrados y aislados a partir de la filósfera (tejido foliar), rizósfera, o del suelo, sea este de uso agrícola o forestal [6].

Un agente benéfico, sea bacteria u hongo, puede ejercer su función de inhibir o suprimir a los fitopatógenos de diferentes maneras, puede ser por antibiosis, que significa la producción de ciertos metabolitos que tienen función de ser tóxicos hacia los patógenos, pueden ser enzimas capaces de destruir las células del organismo pernicioso, o por la competencia por nutrientes, o por la inducción de resistencia sistémica en la planta. La resistencia sistémica en la planta, quiere decir que la bacteria benéfica cuenta con moléculas propias que son capaces de ser reconocidas por las células de los tejidos de la planta y activar en ellas mecanismos de respuesta de defensa, esto en forma sistémica, en todos los tejidos de la planta, y así, cuando hace su aparición el microorganismo patógeno, se enfrenta a un tejido vegetal mas restringente y resistente ante el embate del patógeno [6].

Las formulaciones que se preparan con los agentes de biocontrol para aplicar en campo abierto o en agricultura protegida (invernadero) pueden ser sólidas, en microcápsulas, o líquidas [7, 8]. Las sólidas se manejan en polvo o en gránulos, mientras que las líquidas contienen los microorganismos suspendidos en agua o en acarreadores de base aceite. Las formulaciones líquidas se preparan mas fácilmente y son manejables con los implementos agrícolas, y son muy prácticos cuando se decide realizar aplicaciones foliares. Para un mejor desempeño de los agentes de biocontrol de fitopatógenos se

pueden manejar microbios en consorcio en mas de dos especies o cepas de una misma especie, así se ha reportado para el control de patógenos causantes de la pudrición de la papaya en donde se probó con éxito un consorcio de cuatro especies de bacterias de los géneros *Serratia*, *Enterobacter* y *Rahnella* [8], o en mijo perla *Pennisetum glaucum* para el combate de hongos patógenos de la raíz mediante consorcio de tres cepas de *Bacillus* spp. [9]. De manera similar, se ha demostrado que en maíz, con la aplicación de bacterias benéficas de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* en consorcio de dos y de tres cepas, se incrementa el efecto positivo sobre la promoción del crecimiento de la planta [10]. En un trabajo previo en nuestro laboratorio se aisló seis bacterias de la rizósfera y se secuenció el genoma, y mediante genómica comparativa se determinó que dos de estas bacterias corresponden a la especie *Bacillus velezensis* y una a *Bacillus halotolerans*; en las otras esta pendiente la determinación de la especie [11-13].

El objetivo en este estudio fue analizar la funcionalidad de tres consorcios de tres y de cuatro bacterias *Bacillus* sp. en condiciones *in vitro* e invernadero, para inhibir simultáneamente tres patógenos de la raíz en planta de chile, bacterias previamente preseleccionadas individualmente como avirulentas en las plántulas de chile e inhibidoras en porcentajes variables de los patógenos de la raíz en pruebas *in vitro*.

2. Materiales y métodos

2.1 Bacterias y organización de consorcios bacterianos

Un grupo de 12 cepas de bacterias provenientes de rizósfera y de suelos agrícolas y forestales, preseleccionadas por su potencial de inhibición contra cuatro patógenos causantes de la marchitez del chile, y por su interacción avirulenta al ser inoculadas en la raíz de plantas de chile (ya que algunas resultan hostiles causando necrosis en los tejidos), fueron organizadas por funcionalidad en dos grupos de bacterias: en un primer grupo, bacterias inhibidoras de los patógenos señalados y a la vez con interacción avirulenta cuando son inoculadas en raíz en planta de chile, en el cual se decidió armar dos sub-grupos, uno proveniente del sitio de colecta en campo en zona agrícola del municipio de Morelos, Zac., y el otro proveniente de El Zancarrón, Santo Domingo, San Luis Potosí; en un segundo grupo, cepas inhibidoras de los fitopatógenos, avirulentas en planta de chile y a la vez productoras de sideróforos. Las combinaciones de cepas bacterianas con el propósito de armar los consorcios quedaron como se indica en la tabla 1. En los grupos de bacterias en cada consorcio se consideró incluir juntas a aquellas que tuvieran como origen un mismo lugar de colecta en campo, además de tener un buen índice de inhibición contra los hongos patógenos; con estos criterios, se esperaba entonces que estas bacterias fueran compatibles entre sí, es decir, que no hubiera inhibición entre ellas.

En patógenos se trabajó con cepas virulentas de las especies *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* causantes de la marchitez del chile.

Tabla 1. Consorcios bacterianos, especie y cepas dentro de cada consorcio.

Consorcio	Especie	Cepas
1	<i>Bacillus velezensis</i>	2A-2B, 3A-25B
	desconocida	2A-10A, 3A-6A
2	<i>Bacillus halotolerans</i>	MS50-18A
	desconocida	MS50-10, 2A-10A.
3	desconocida	1-10A, 2A-10A y MR50-11A.

2.2 Pruebas de ausencia de inhibición entre cepas bacterianas por metabolitos de secreción

Se realizaron cultivos bacterianos simples para cada bacteria en medio líquido KB para determinar la cinética de crecimiento característica de cada cepa. Los cultivos se realizaron en placa de 96 pozos de 250 µl con 200 µl de medio de cultivo en agitación a 28°C, con toma de lectura de absorbancia cada hora hasta las 24 hs.

Posteriormente, filtrados de la fase acuosa de cultivos líquidos de bacterias en medio KB fueron obtenidos a partir de cultivos individuales de cada bacteria en cada consorcio. Cada una de las ocho cepas de bacterias se cultivó en medio líquido KB a 28°C por 24 hs y estos crecimientos bacterianos se centrifugaron a 4000 rpm, se obtuvo el sobrenadante y se esterilizó por filtración en membrana con poro de corte de 0.22 µm (Durapore PVDF hidrófila, Millipore). Con cada filtrado se realizaron pruebas de cultivo bacteriano para descartar cualquier remanente de bacteria.

Se armaron las combinaciones posibles dentro de cada consorcio para confrontar cada bacteria ante cada uno de los filtrados estériles, con metabolitos secundarios de secreción de las otras bacterias, dentro del consorcio respectivo (Tabla 2).

Para proceder con la confrontación de bacterias con los filtrados de crecimientos bacterianos de las otras cepas, a 125 µl de suspensión bacteriana en medio KB tomados del crecimiento fresco del punto final de la fase de crecimiento exponencial (en base a la cinética de crecimiento de cada cepa previamente determinada), se adicionó 125 µl de medio KB filtrado estéril a una concentración de 0.12 de densidad óptica (DO).

Los cultivos bacterianos procedieron en placas de 96 pozos para lo cual se incubó a 28°C en agitación constante tomando el dato de DO cada hora hasta las 24 hrs.

2.3 Pruebas in vitro de protección en planta con los consorcios bacterianos ante inoculación simultánea de los cuatro patógenos en la raíz

Con crecimientos bacterianos de 24 hs en agitación a 28°C, todos los consorcios bacterianos conteniendo el grupo de bacterias respectivas, fueron ajustados a una DO final de 1.0 en agua destilada estéril.

Tabla 2. Combinaciones de confrontación de bacterias con filtrados de fase líquida de crecimiento de cada una de las otras bacterias.

Bacteria/consorcio	Filtrados		
Consorcio 1			
2A-2B	2A-10A	3A-25B	3A-6BI
2A-10A	2A-2B	3A-25B	3A-6BI
3A-25B	2A-2B	2A-10A	3A-6BI
3A-6BI	2A-2B	2A-10A	3A-25B
Consorcio 2			
MS50-10	MS50-18A	2A-10A	
MS50-18A	MS50-10	2A-10A	
2A-10A	MS50-10	MS50-18A	
Consorcio 3			
1-10 ^a	2A-10A	MR50-11A	
2A-10A	1-10A	MR50-11A	
MR50-11A	1-10A	2A-10A	

Plantas de chile mirasol de 15 días de edad crecidas en asepsia *in vitro*, se sumergieron por la raíz por 5 minutos en la suspensión del consorcio bacteriano según el tratamiento respectivo, con agitación manual cada minuto. Enseguida fueron transplantadas a cajas Petri con medio MS al 20%. Las cajas Petri con medio MS previamente inoculadas 24 hs antes de colocar las plantas, con parche de crecimiento fresco de cada uno de los hongos y oomiceto patógenos.

Considerando las velocidades de crecimiento diferentes de cada uno de los patógenos, para tratar de igualar el momento del alcance de la raíz para la colonización por las hifas de los patógenos, en cajas de Petri con medio MS previo a la colocación de las plantas, se colocó en parche de 3 x 5 mm de crecimiento micelial de cada uno de los patógenos de crecimientos frescos, colocando a *P. capsici* a 5 mm de distancia del sitio donde se colocaría la raíz de la planta, para *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* la distancia fue de 8 mm, mientras que *R. solani* se colocó a 10 mm de distancia. El diseño experimental abarcó seis tratamientos como se aprecia en la Tabla 3.

Se documentó la evolución de la enfermedad en las plantas en cada tratamiento cada 24 hs por 5 días. Para la evaluación de la enfermedad en planta se utilizó una escala de 5 niveles, donde 1 equivale a planta sana sin síntomas; 2 equivale a planta con necrosis en zona de transición entre tallo y raíz, de 0.5 a 1.0 cm, con 15% de hojas marchitas; 3 equivale a daño en la base del tallo con daño abarcando entre 1.1 y 1.5 cm y 30% de hojas marchitas; 4, necrosis entre 1.6 y 2.0 cm y 50% de hojas marchitas; y 5, necrosis abarcando entre 2.1 y 2.5 cm y al menos el 75% de hojas marchitas [11]. Se realizó el análisis de varianza (ANDEVA) con StatPlus v6.1.25 [14] y la comparación de medias con Prueba de Tukey.

2.4 Prueba en invernadero de la funcionalidad de protección de los consorcios bacterianos ante patógenos

Se trabajó con plantas de 18 días de edad en macetas de 1 litro con sustrato Peat-Moss previamente esterilizado en autocla-

Tabla 3. Tratamientos. Confrontación de bacterias con filtrados de fase líquida de crecimiento de cada una de las otras bacterias.

Consortio / bacterias	Patógenos
Consortio 1: 2A-2B, 2A-10A, 3A-25B, 3A-6BI	<i>P. capsici</i> <i>F. solani</i> <i>F. oxysporum</i> <i>R. solani</i>
Consortio 1: 2A-2B, 2A-10A, 3A-25B, 3A-6BI	Sin patógenos
Consortio 2 : MS50-10, MS50-18A, 2A-10A	<i>P. capsici</i> <i>F. solani</i> <i>F. oxysporum</i> <i>R. solani</i>
Consortio 2 : MS50-10, MS50-18A, 2A-10A	Sin patógenos
Consortio 3 : 1-10A, 2A-10A, MR50-11A	<i>P. capsici</i> <i>F. solani</i> <i>F. oxysporum</i> <i>R. solani</i>
Consortio 3 : 1-10A, 2A-10A, MR50-11A	Sin patógenos

clave. Las plantas fueron retiradas de su maceta y por la raíz fueron lavadas en agua estéril para desprender el sustrato adherido, y enseguida se inoculó con los consorcios bacterianos, con el mismo protocolo que se aplicó en las pruebas con plantas *in vitro*. Las plantas inoculadas con las bacterias en consorcio fueron plantadas nuevamente en maceta de 1 litro con sustrato Peat-moss estéril, y a las 24 hs después se inoculó con los patógenos utilizando como unidades formadoras de colonia, granos de trigo esterilizados en autoclave e inoculados y colonizados por los patógenos de forma independiente. Se inoculó con un grano de trigo crecido con patógenos colocándolo a 0.5 cm de distancia de la base del tallo de cada planta. En las plantas control se colocaron granos de trigo sin crecimiento de patógenos. Las macetas con las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero, con riego cada tercer día para favorecer el desarrollo de los hongos y el oomiceto patógenos. Se documentó la aparición de síntomas de la enfermedad por cuatro semanas aplicando la escala de 5 niveles antes descrita y se realizó el análisis estadístico.

3. Resultados

3.1 Inhibición entre cepas bacterianas por metabolitos de secreción

La lectura de la absorbancia por 24 hs en los crecimientos bacterianos en medio líquido KB mostró dinámica de crecimiento bastante diferente para cada bacteria. Las cepas 2A-10A y MS50-10 muestran el inicio de la fase logarítmica desde las 4 a 5 hs de iniciado el cultivo, mientras que las cepas 1-10A y 3A-6BI lo hacen entre las 8 y 9 hs. Las cepas MR50-11A y 3A-25B son las más rezagadas con su fase logarítmica entre las 14 y 15 hs. Las cepas 1-10A y 2A-2B muestran un mayor crecimiento bacteriano con una DO de alrededor de 1.6 alcanzada a las 24 hs

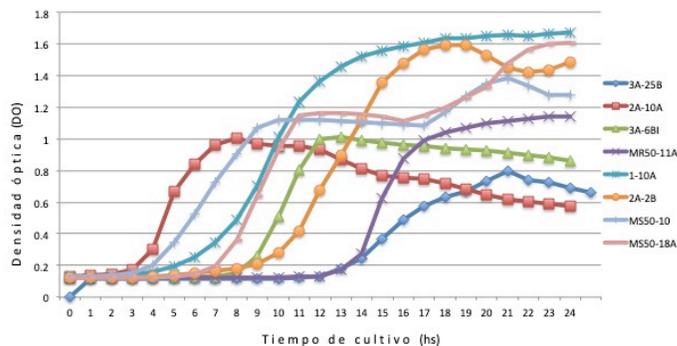


Fig. 1. Curva de crecimiento característica de cada una de las ocho cepas bacteriana en un periodo de 24 hs. La de mayor densidad celular la cepa 1-10A, mientras que las más baja es la cepa 3A-25-B. La más rápida la cepa 2A-10A.

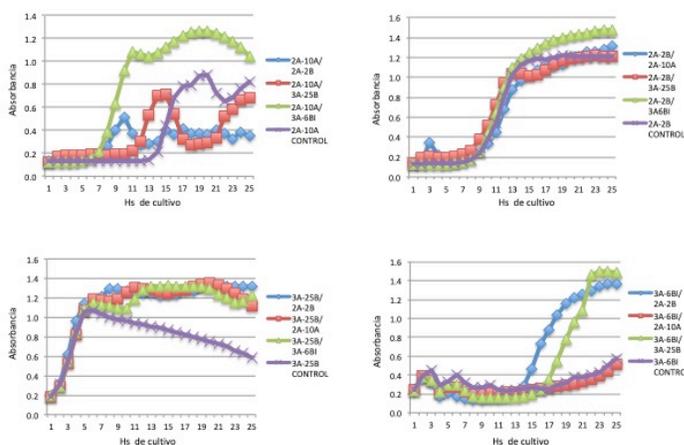


Figura 2. Curva de crecimiento de cada una de las cuatro cepas del consorcio 1 en presencia de filtrado acuoso estéril de crecimiento bacteriano de las otras cepas. Solo la cepa 2A-10A se ve afectada en grado medio por la presencia de filtrado acuoso estéril de crecimiento de bacterias 3A-25B y 2A-2B.

de cultivo. La mayoría de bacterias llegan a su punto máximo de crecimiento entre las 11 y 16 hs de cultivo (Figura 1).

Para la obtención de los filtrado estéril de fase acuosa de crecimientos de bacterias, se reclutó cada cepa en 5 ml de medio KB líquido parando el crecimiento al llegar a la parte alta de la fase exponencial que mostró previamente cada bacteria. Se centrifugó a 4000 rpm y el sobrenadante se esterilizó por filtración en membrana con por de corte de 0.22 μ m.

Para las pruebas de inhibición entre bacterias por la presencia de productos de secreción de las otras bacterias, una vez obtenida la dinámica de crecimientos bacterianos y obtenidos los filtrados estériles, se procedió con las confrontaciones de cada bacteria con los filtrados de las bacterias de su respectivo consorcio. Así, en el consorcio 1 compuesto por 4 cepas de bacterias, en la cepa 2A-10A se aprecia efecto medio de inhibición por la presencia de metabolitos de secreción de las cepas 3A-25B y 2A-2B (Figura 2).

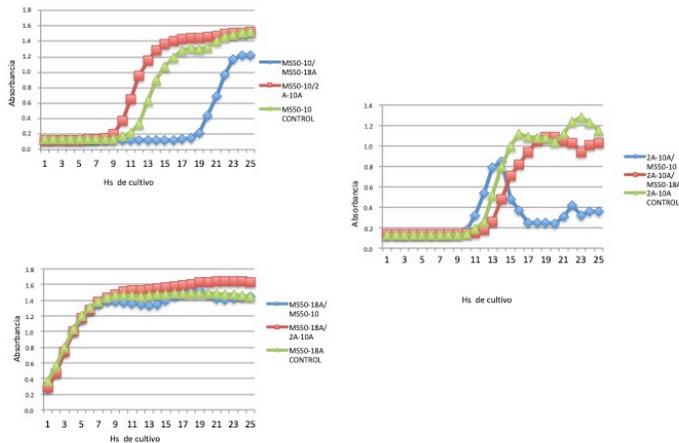


Figura 3. Curva de crecimiento de cada una de las tres cepas del consorcio 2 en presencia de filtrado acuoso estéril de crecimiento bacteriano de las otras dos cepas. Solo la cepa 2A-10A se ve afectada en grado medio por la presencia de filtrado acuoso estéril de crecimiento de bacterias MS50-10.

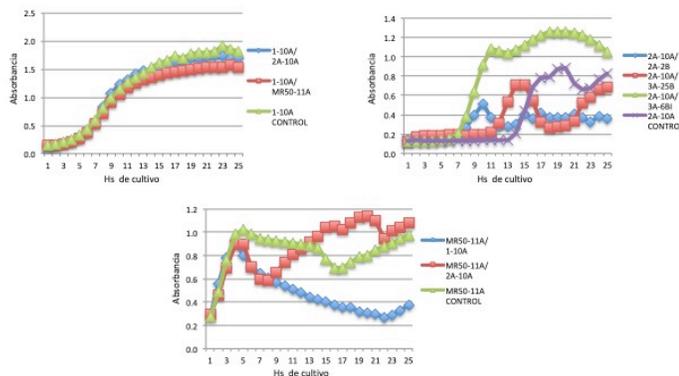


Figura 4. Curva de crecimiento de cada una de las tres cepas del consorcio 3 en presencia de filtrado acuoso estéril de crecimiento bacteriano de las otras dos cepas. La cepa 2A-10A se ve afectada por la presencia de filtrado acuoso estéril de crecimiento de bacterias 3A-25B y 2A-2B.

Para el consorcio 2, se muestra un impacto parcial donde la cepa MS50-10 se retrasa su fase exponencial por 7 hs en presencia de filtrado de fase acuosa de cepa MS50-18A, y la cepa 2A-10A baja su crecimiento a la mitad de la fase exponencial en presencia de filtrado de fase acuosa de la cepa MS50-10 (Figura 3).

En el consorcio 3 compuesto por tres cepas, en la cepa 2A-10A se afecta su crecimiento por la presencia de metabolitos secundarios de secreción presentes en la fase acuosa del crecimiento de las bacterias 3A-25B y 2A-2B, y se ve favorecida en su crecimiento por presencia de metabolitos secundarios de la cepa 3A-6BI (Figura 4).

Con estos resultados de curvas de crecimiento de bacterias en presencia de metabolitos secundarios de secreción de las otras bacterias en cada consorcio, solo la cepa 2A-10A resulta afectada por los metabolitos de tres bacterias, lo cual indica que en los consorcios 1 y 3 habría menos impacto por efecto de inhibición

de la cepa afectada 2A-10A sobre los patógenos. El consorcio 2 tendría mas expectativas de buen desempeño dado que solo la misma bacteria 2A-10A se ve afectada parcialmente una vez que llega a la mitad de la fase de crecimiento exponencial (Figura 3).

En base a las gráficas de crecimiento de cada bacteria en sus combinaciones de filtrados de crecimiento de bacterias de su respectivo consorcio, se consideró que la inhibición no es determinante para descartar el consorcio 2, tomando en cuenta que en algunas de esas combinaciones también se presentan efectos positivos donde se da un mayor crecimiento bacteriano, lo que podría traer efecto de compensación, es decir, un efecto de amortiguamiento de los efectos de disminución del crecimiento de bacteria.

Así entonces, se consideró que estos datos no son determinantes para excluir ninguna combinación de bacterias en los tres consorcios planteados.

3.2 Funcionalidad de protección en planta por los consorcios bacterianos ante patógenos en pruebas *in vitro*

Las plantas de chile de 15 días de edad inoculadas con bacterias en la raíz y enseguida con los patógenos en caja de Petri fueron mantenidas en cámara de fotoperiodo con un lapso de 12 hs luz y 12 hs oscuridad. Enseguida se registró el avance de la enfermedad de las plantas para cada tratamiento cada 24 hs, en base a una escala de 5 niveles antes descrita. A las 24 hs post-inoculación (hpi) con bacterias y después con patógenos, se pudo documentar el inicio de los síntomas en el tratamiento donde se inoculó solo con los patógenos; el resto de los tratamientos no manifestó síntomas.

A las 72 hpi el tratamiento donde se inoculó solo con los patógenos alcanzó un grado de enfermedad en nivel 3, fue evidente la necrosis entre el tallo y la raíz con alrededor de un 30% de hojas marchitas; y en el tratamiento donde se aplicó el consorcio 1 mas patógenos, el grado de daño por patógenos alcanzó el nivel de 2, con necrosis entre el tallo y la raíz y aproximadamente un 15% de hojas marchitas. A las 120 hpi, el avance de la enfermedad en varios tratamientos se hizo mas evidente. En el tratamiento donde solo se inoculó con patógenos, el grado de daño alcanzó el nivel de 4, con necrosis entre el tallo y la raíz, 1.6 a 2 cm, 50 % hojas marchitas; donde se aplicó el consorcio 1 mas patógenos también la enfermedad alcanzó un nivel de 3; con consorcios 2 y 3 mas patógenos, comenzaron a observarse algunos síntomas con la enfermedad en nivel 1.

A las 168 hpi en 3 de los tratamientos, en consorcios 1 y 2 mas patógenos, e inoculación solo con patógenos, se pudo documentar un avance de la enfermedad de manera ascendente, con mayor daño, en nivel de 5, en el tratamiento donde solo se inoculó con patógenos (Figura 5 D), mientras que con consorcios 1, 2 y 3 con patógenos, los niveles de daño alcanzaron valores de 3 y 2 respectivamente (Figura 5 A, B y C).

Finalmente, a las 216 hpi el tratamiento donde solo se inoculó con patógenos, el grado de enfermedad llegó a su máximo nivel con valor de 6, en donde la planta mostró tejido necrótico en la raíz de manera profusa y marchitez extensiva en toda la planta; en los tratamientos consorcio 1 y 2 con inocula-

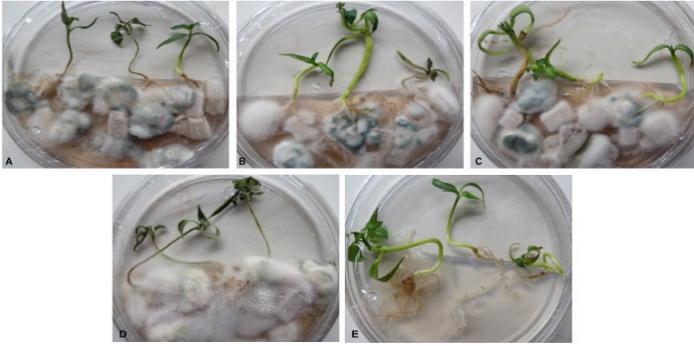


Fig. 5. Plantas inoculadas con consorcios bacterianos y efecto protector ante los 4 patógenos a 168 hs post-inoculación. En A, B y C, consorcios 1, 2 y 3 con patógenos, respectivamente; en D, patógenos; en E, plantas control sin inocular.

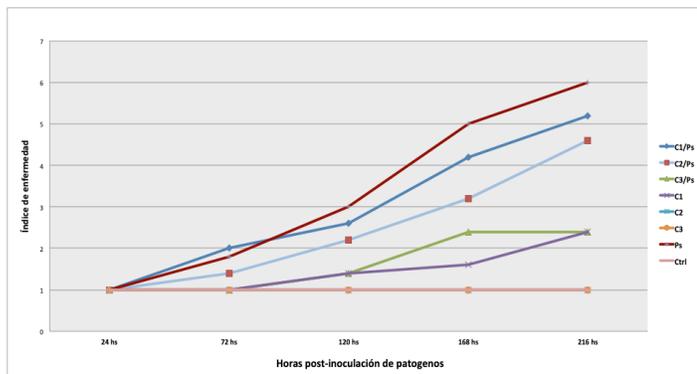


Fig. 6. Progreso de la enfermedad en pruebas *in vitro* en los tratamientos con consorcios bacterianos más patógenos. C1, C2, y C3, consorcios 1, 2 y 3 respectivamente; C1/Ps, C2/Ps y C3/Ps, consorcios 1, 2 y 3 más patógenos respectivamente; Ps, solo patógenos; Ctrl, sin inoculación. Con menor nivel de daño por los patógenos, el tratamiento C3/Ps (consorcio 3 y patógenos). Con mayor nivel de daño, el tratamiento inoculación solo con patógenos, seguido de consorcio 1 y consorcio 2 e inoculación con patógenos. Plantas control sin inocular, siempre sanas.

ción de patógenos, también se documentó daño en nivel de 4 y 3 respectivamente. En el control donde no se aplicó bacterias ni patógenos, a lo largo del experimento no se documentó ningún nivel de daño (planta sana). En el progreso de la enfermedad de las plantas por tratamientos, fue evidente que el daño más temprano y más severo fue en plantas inoculadas con patógenos sin pre inoculación de bacterias, mientras que las plantas más sanas correspondieron con el tratamiento control donde no se aplicó patógenos ni bacterias, seguida del tratamiento donde se inoculó con bacterias en consorcio 3 y después con los patógenos (Figura 6).

En datos de estadística descriptiva donde se consideró el resultado final de índice de enfermedad a las 216 hpi, la media donde el valor de 1 equivale a planta sana, se puede apreciar que tanto el tratamiento control (planta sin inocular) así como los consorcios 2 y 3 sin patógenos, concluyen al final del experimento en calidad de tratamientos con plantas sanas; mientras que el tratamiento de consorcio 1 sin inocular patóge-

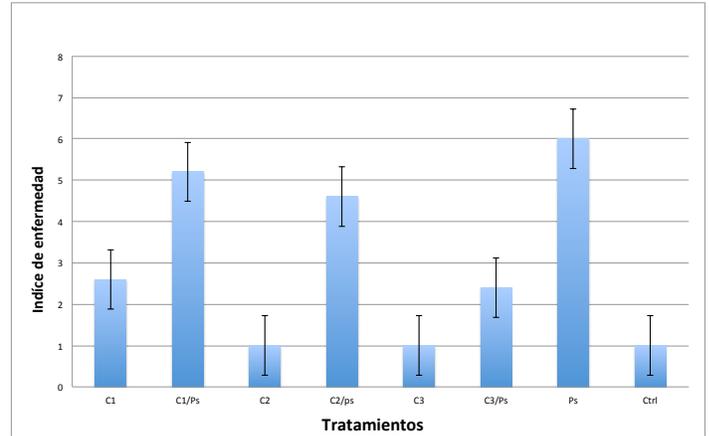


Fig. 7. Índice de enfermedad al final del experimento a las 216 hpi en tratamientos con consorcios bacterianos y co-inoculación con patógenos. El consorcio 3 con mayor nivel de protección en planta ante los patógenos.

nos, el nivel de daño asciende a un valor promedio de 2.4. En los tratamientos donde se inoculó con consorcios bacterianos y además los patógenos, el consorcio 3 resulta con menor daño, en un nivel de 2.4, mientras que con los consorcios 2 y 1, el índice de enfermedad llega a un valor promedio de 4.6 y 5.2 respectivamente (Figura 7).

El análisis de varianza con StatPlus mostró que con un nivel de confianza del 95 % ($\alpha=0.05$) el valor de p fue menor a 0.05, lo indica que existen diferencias estadísticas entre los tratamientos.

En la prueba de Tukey (HSD), en las comparaciones de medias entre los tratamientos donde se inoculó con los consorcios 2 y 3 sin patógenos y el tratamiento control, no muestran diferencias estadísticas significativas, las plantas permanecen sanas. Con el criterio de disminución de la enfermedad causada por los hongos patógenos, el tratamiento de consorcio 3 más patógenos se sitúa con un nivel de daño de 2.4, valor menor incluso que el del tratamiento donde se inoculó solo con bacterias de consorcio 1 sin patógenos (daño en nivel de 2.6), mas sin embargo no alcanza a marcar diferencias estadísticas significativas con respecto al tratamiento donde se inoculó solo con patógenos. Los tratamientos consorcios 1 y 2 más patógenos, el nivel de enfermedad se sitúan muy arriba, en valores promedio de 5.2 y 4.6 respectivamente, valores muy cercanos al máximo observado que corresponde al tratamiento donde se inoculó solo con patógenos y que fue de 6, quedando así estadísticamente dentro del mismo grupo (Tabla 4).

3.3. Funcionalidad de protección en plantas por los consorcios bacterianos ante patógenos en condiciones de invernadero

Los mismos tratamientos que se corrieron *in vitro* se corrieron también en condiciones de invernadero. Las macetas con las plantas se mantuvieron húmedas mediante riego cada tercer día

Tabla 4. Matriz de diferencias estadísticas de los valores promedio entre tratamientos, en la protección ante los patógenos con inoculación de consorcios bacterianos.

		a	a	b	b	b	b	b	b
		a	a	a	a	a			
		Ps	C1/Ps	C2/Ps	C1	C3/Ps	C2	C3	Ctrl
		6.0	5.2	4.6	2.6	2.4	1.0	1.0	1.0
Ctrl	1.0	4.0*	4.2*	3.6	1.6	1.4	0.0	0.0	
C3	1.0	4.0*	4.2*	3.6	1.6	1.4	0.0		
C2	1.0	4.0*	4.2*	3.6	1.6	1.4			
C3/Ps	2.4	3.6	2.8	2.2	0.2				
C1	2.6	3.4	2.6	2.0*					
C2/Ps	4.6	1.4	0.6						
C1/Ps	5.2	0.8							
Ps	6.0								

W= 3.68

* = diferencias estadísticas significativas

para favorecer el desarrollo de los patógenos. Se documentó la aparición de síntomas de la enfermedad por cuatro semanas aplicando la misma escala de 5 niveles como se definió y aplicó anteriormente en la prueba de plantas *in vitro*.

A los 6 días post-inoculación con los patógenos, en el tratamiento donde sólo se aplicó hongos y oomiceto, se presentaron síntomas de flacidez en la base del tallo de la planta y marchitez en hojas, registrándose un nivel 2 de daño en promedio; en los otros tratamientos no se observó daño por los patógenos. A los 18 días post-inoculación de los patógenos, en el tratamiento correspondiente a inoculación exclusiva con los hongos y oomiceto, el nivel de la enfermedad alcanzó el valor de 4. En el tratamiento con consorcio 3 de bacterias e inoculación con patógenos, también comenzó a observarse daño por los patógenos en un nivel de 2, aunque de una forma no generalizada en todas las plantas. Las plantas que recibieron solamente consorcio bacteriano continuaron saludables, sin ningún síntoma de marchitez. A los 24 días (última semana de observación) en los tratamientos correspondientes a consorcios 1 y 2 de bacterias e inoculación con patógenos, el daño por los hongos se hizo evidente en un nivel de 2, con impacto sólo a dos plantas (repeticiones) en cada tratamiento; mientras que en el tratamiento donde se inoculó con consorcio 3 de bacterias mas patógenos, apareció daño de marchitez en nivel de 2 en sólo una planta. En plantas inoculadas con los patógenos sin inoculación de bacte plantas inoculadas con los patógenos sin inoculación de bacterias, el nivel de enfermedad llegó a 6, con alto número de plantas muertas. En los tratamientos donde solo se aplicó consorcio de bacterias sin patógenos, las plantas permanecieron saludables, turgentes, incluso se notó mayor crecimiento en el tallo y follaje. Estos datos en el eje del tiempo se pueden apreciar de forma resumida en la figura 8.

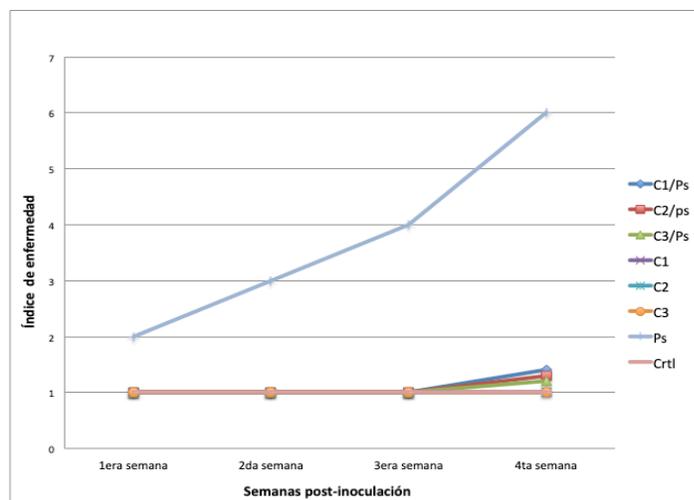


Fig. 8. Progresión de la enfermedad en invernadero en los tratamientos con consorcios bacterianos mas patógenos, solo patógenos, y tratamiento control sin bacterias ni patógenos. C1, C2, y C3, consorcios 1, 2 y 3 respectivamente; C1/Ps, C2/Ps y C3/Ps, consorcios 1, 2 y 3 más patógenos respectivamente; Ps, solo patógenos, Ctrl, sin inoculación. Con mayor nivel de daño por necrosis y marchitez en el tratamiento inoculación con patógenos desde la primer semana post-inoculación. En tratamientos con consorcio bacteriano mas patógenos, la aparición de síntomas de la enfermedad se hizo evidente después de la 3er semana post-inoculación, sin comprometer la salud de las plantas.

En datos de estadística descriptiva donde se consideró el resultado final del experimento de índice de enfermedad a la 4ª semana, la media donde el valor de 1 equivale a planta sana, se puede apreciar que los tres tratamientos donde se incluyó consorcios bacterianos (1, 2 y 3) mas patógenos, muestran un valor de índice de enfermedad de 1.4, 1.4 y 1.2, muy cercanos a los tratamientos con solo consorcios de bacterias y el control (sin inoculación) con valores de 1. El valor promedio de enfermedad máximo se presenta en el tratamiento con solo patógenos con un valor de 6 (Figura 9). El análisis de varianza arrojó diferencias estadísticas entre tratamientos. La prueba de Tukey permitió observar que todos los tratamientos excepto donde se inoculó solo con patógenos (sin bacterias), quedaron dentro de un mismo grupo sin diferencias estadísticas significativas, marcando todos ellos diferencias estadísticas con respecto al tratamiento con patógenos (Tabla 5).

4. Discusión

4.1. Dinámicas de crecimiento bacteriano variable entre cepas de consorcios

Las curvas de crecimiento de las bacterias en medio líquido en agitación a 28°C analizadas por un periodo de 24 hs, mostró que presentan bastantes diferencias. La cepa más rápida como lo es la 1-10A, inicia con la fase exponencial desde las 4 hs y su crecimiento estacionario se alcanza desde las 8 hs, con una densidad máxima en el medio de cultivo KB de 1.0; un grupo de cuatro bacterias (2A-10A, 1-10A, 2A-2B y MS50-10) con una

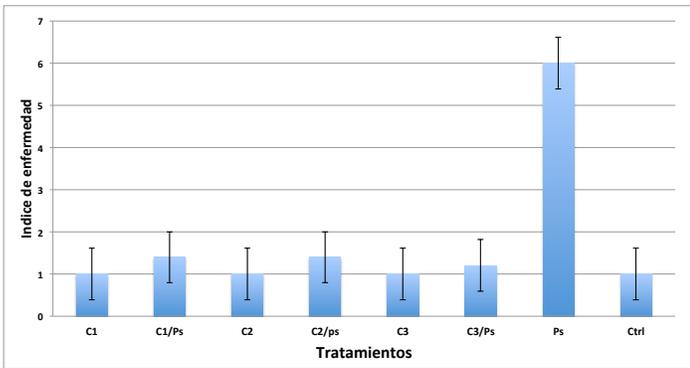


Fig. 9. Índice de enfermedad en tratamientos con consorcios bacterianos y co-inoculación con patógenos. Los tres consorcios muestran similares efectos de protección en planta ante los patógenos.

Tabla 5. Matriz de diferencias de los valores promedio entre tratamientos, en la protección ante los patógenos con inoculación de consorcios bacterianos.

		a	b	b	b	b	b	b
	a							
	Ps							
	C1/Ps	6.0						
	C2/Ps	6.0	1.4					
	C3/Ps	6.0	1.4	1.2				
	C1	6.0	1.4	1.2	1.0			
	C2	6.0	1.4	1.2	1.0	1.0		
	C3	6.0	1.4	1.2	1.0	1.0	1.0	
	Ctrl	6.0	1.4	1.2	1.0	1.0	1.0	1.0
Ctrl	1.0	5.0*	0.4	0.4	0.2	0.0	0.0	0.0
C3	1.0	5.0*	0.4	0.4	0.2	0.0	0.0	
C2	1.0	5.0*	0.4	0.4	0.2	0.0		
C1	1.0	5.0*	0.4	0.4	0.2			
C3/Ps	1.2	4.8*	0.2	0.2				
C2/Ps	1.4	4.6*	0.0					w = 0.82
C1/Ps	1.4	4.6*						
Ps	6.0							

* = diferencias estadísticas significativas

velocidad de crecimiento intermedia las cuales presentan su fase exponencial entre las 5 y 15 hs de iniciado su cultivo en medio KB. Las cepas 3A-6BI y 3A-25B son mas tardías iniciando su fase exponencial hasta las 15 hs. (Figura 1). Estas diferencias en velocidad de crecimiento no son de extrañar, entre especies de bacterias es notable las diferencias en el tiempo de duplicación generacional, así por ejemplo, se ha reportado que para *Escherichia coli* el tiempo de duplicación generacional es de 0.35 hs, para *Rhizobium meliloti* es de 1.8 hs y para *Nitrobacter* sp. es de 20 hs. [15, 17].

4.2 Consorcios bacterianos funcionales aun con disminución de crecimiento de cepa 2A-10A

El crecimiento individual de las bacterias en presencia de extractos acuosos filtrados estériles provenientes de crecimientos de las otras bacterias dentro de los consorcios respectivos, demostró que en la mayoría de las combinaciones no fue

relevante los niveles de inhibición. La excepción es el caso de la cepa 2A-10A que resulta afectada al tercer tercio de la fase exponencial de crecimiento en presencia de filtrado de fase acuosa de las cepas MS50-10 y 2A-2B, y su densidad celular poblacional final se ve disminuida respecto a su curva de crecimiento normal (Figura 2). Situación similar se presenta en el caso de la cepa MR50-11 por metabolitos de la cepa 1-10A, en la que su densidad poblacional se ve afectada negativamente al final de la fase de crecimiento exponencial, y su nivel de densidad celular en la fase estacionaria se ubica también por debajo de lo que sucede en un crecimiento normal (Figura 4).

En otro sentido, en algunas combinaciones de bacterias se pudo observar un incremento de la velocidad de crecimiento comparado con los cultivos control. Tal es el caso de la cepa 2A-10A en presencia de filtrado de fase acuosa de la cepa 3A-6BI en donde la fase exponencial se adelanta en 5 hs aproximadamente y la densidad celular se incrementa en la fase estacionaria cerca de un 30% (Figura 5); esto se repite aunque con menor nivel, en el caso de la cepa 3A-25B con filtrado de fase acuosa proveniente de las cepas 2A-10A, 2A-2B y 3A-6BI (Figura 3).

En su nicho ecológico los microorganismos existen en comunidades en constante interacción entre los mismos, y en su medio las bacterias liberan metabolitos secundarios, algunos de estos son antibióticos y otros por el contrario actúan como factores de crecimiento para otras especies. De esta forma, pueden actuar positiva o negativamente en el crecimiento de otras bacterias en el mismo espacio donde coexisten [16, 17].

La inhibición o promoción del crecimiento entre bacterias en los consorcios de *Bacillus* aquí estudiadas, es entendible en el sentido de que estas cepas provienen de rizósfera de plantas cultivadas o silvestres, o de suelo agrícola o forestal, en donde suceden infinidad de interacciones y en muchos casos es de esperarse se da la lucha por espacio o por nutrientes, y en esa confrontaciones es muy posible la producción de metabolitos específicos de carácter antibiótico para otras bacterias y microorganismos competidores. Considerando los niveles de inhibición entre las cepas de bacterias en los consorcios, así como la situación opuesta en donde se promueve el crecimiento, se tomó la definición de que no era relevante las inhibiciones entre cepas bacterianas como para invalidar las combinaciones de bacterias establecidas desde ante establecidas.

4.3 El consorcio 1 compuesto por 4 bacterias compromete la interacción avirulenta en planta en condiciones in vitro

La funcionalidad de los consorcios bacterianos ante patógenos analizadas en pruebas *in vitro* demostró que las bacterias en consorcio en interacción en la raíz en las plantas de chile guajillo, no muestran hostilidad, a excepción del consorcio 1 compuesto por las cepas 2A-2B, 2A-10A, 3A-25B y 3A-6BI en donde a las 120 hpi se manifiesta ya en promedio de enfermedad en nivel 1.3 y sube a 1.6 al día 7 post-inoculación, para cerrar en 2.3 en el 9º día (Figura 15). En trabajos previos estas bacterias por separado inoculadas individualmente no habían mostrado hostilidad al ser inoculadas en las raíces de las plantas de chile,

sin embargo, cuando se trabaja en consorcio con estas 4 cepas de bacterias la situación es diferente.

En su interacción con microorganismos en el suelo, las plantas tienen la capacidad de reclutar en la rizósfera una comunidad de microbiota protectora ante los patógenos. Esto significa que las plantas pueden manipular el proceso protector en la rizósfera para su beneficio, y esto es dependiente del genotipo en la planta [18, 19, 20]. En el ensamblaje del microbioma de la rizósfera son importantes el ácido salicílico y el ácido jasmónico, dos fitohormonas relacionadas con defensa ante patógenos [21]. En el presente estudio, posiblemente el genotipo de la planta, en este caso chile cultivar mirasol como hospedera en el patosistema, está determinando que las mejores combinaciones *in vitro* para el consorcio de bacterias en la raíz sean los consorcios 3 y 2. Una segunda consideración es que en el consorcio 1 se tienen cuatro cepas de bacterias, mientras que en los consorcios 2 y 3 se incluyeron solo tres cepas, lo que sugiere que en la confección de consorcios, entre más alto sea el número de cepas a incluir se pone en riesgo la interacción avirulenta con la planta.

4.4. Los tres consorcios bacterianos en condiciones de invernadero protegen la raíz contra patógenos

Muy diferente a los que sucede en condiciones *in vitro*, en condiciones de invernadero los consorcios bacterianos aquí estudiados se demostró resultan efectivos para proteger en planta ante los patógenos que afectan la raíz en Chile. En el tratamiento donde solo se inoculó con los patógenos, sin bacterias, la enfermedad se hizo evidente con los primeros síntomas desde la primera semana post-inoculación, con necrosis de tejidos así como la marchitez fue gradual y notoriamente ascendente hasta llegar a nivel máximo en la 4ª semana de transcurrido el experimento.

En base a los resultados del análisis estadístico, con el propósito de disminución del daño por patógenos, cualquiera de los tres consorcios bacterianos además de patógenos, ofrece diferencias significativas con respecto al tratamiento donde solo se inoculó con los patógenos. Y para mayor validez, los mismos tratamientos de pre-inoculación con consorcios bacterianos y enseguida con patógenos, no presentan diferencias estadísticas significativas con respecto al tratamiento control donde no se aplicó ningún microorganismo (Tabla 6). Lo anterior significa que, la pre-inoculación con cualquiera de los tres consorcios de bacterias, protege efectivamente contra los patógenos que dañan la raíz en planta de Chile en condiciones de invernadero en donde la disminución de la enfermedad alcanza niveles del 77 al 80%. Estos porcentajes de disminución de la enfermedad se sitúan por encima de valores reportados en otros patosistemas donde se incluyen los patógenos de la raíz *R. solani*, *F. oxysporum* y *Sclerotium rolfsii* en donde se probó también con consorcios de bacterias benéficas *Bacillus* sp. En esos estudios el nivel de protección alcanza el 71.96% [9].

En relación a la confección de consorcios bacterianos para biocontrol de fitopatógenos y/o promoción del crecimiento vegetal, otros estudios señalan que no siempre en consorcio se

logran mejores resultados comparado con inoculaciones simples. En maíz en condiciones de invernadero, combinaciones triples de cepas específicas de bacterias *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* sp, y *Streptomyces* sp. promueven crecimiento de la planta y protegen contra el patógeno *Fusarium graminearum* [10]. En los resultados obtenidos en el presente trabajo, al menos en condiciones de invernadero, tal parece que cualquiera de los tres consorcios probados, en combinación triple o cuádruple, ofrece altos niveles de protección contra cuatro patógenos (*P. capsici*, *F. solani*, *F. oxysporum* y *R. solani*) que atacan la raíz en Chile.

El resultado del buen desempeño de los consorcios bacterianos aquí probados, en situación de invernadero, sugiere que bajo una condición más cercana a lo natural, en suelo para anclaje de la raíz, los consorcios de bacterias cumplen con su función mucho mejor, de mantener a raya a los patógenos y promover el avance del crecimiento casi saludable y estable de la planta. El suelo natural con sus partículas físicas como los son la arcilla, el limo y la arena, en presencia de un buen contenido de materia orgánica como sucede en el sustrato Peat-Moss, favorece la formación de agregados dando al suelo una estructura granular, lo que propicia la aireación y a la vez la retención de humedad, condiciones adecuadas para la microbiota del suelo, en donde muy posiblemente se desempeñan en mejores condiciones las cepas de bacterias en consorcios aquí estudiadas. El medio de cultivo MS que se utilizó en los estudios *in vitro*, aunque tiene el coctel de nutrientes para las plantas, difícilmente abarca el coctel nutricional completo y las condiciones óptimas de porosidad, aireación y humedad del sustrato que demandan las bacterias del suelo y de la rizósfera para su adecuado crecimiento y desempeño hacia la inhibición de microorganismos patógenos de las raíces de las plantas.

5. Conclusiones

Para la confección de consorcios de cepas bacterianas para fines de biocontrol de patógenos de la raíz en Chile, aunque en la cepa 2A-10A se observó un impacto negativo por metabolitos en extractos acuosos de crecimiento de otras bacterias, también en la misma cepa bacteriana se documentó efecto positivo por presencia de metabolitos de otras bacterias, de tal forma que se consideró un posible efecto supresor del efecto positivo sobre el efecto negativo, lo cual sirvió de base para validar los tres consorcios con las siguientes combinaciones:

Consorcio 1, cepas 2A-2B, 2A-10A, 3A-25B y 3A-6BI

Consorcio 2, cepas: MS50-10, MS50-18S y 2A-10A

Consorcio 3, cepas: 1-10A, 2A-10A y MR50-11A

En las ocho cepas de bacterias se observó velocidad de crecimiento variable, las cepas 2A-10A, 1-10A, 2A-2B y MS50-10 llegan a su fase exponencial entre las 5 y 15 hs de iniciado el cultivo líquido, mientras que las cepas 3A-6BI y 3A-25B inicia hasta las 15 hs; estos datos sirvieron para determinar los tiempos apropiados para la preparación de las suspensiones bacterianas para la inoculación de las raíces de las plantas.

En los estudios *in vitro*, el consorcio 1 que incluye las bacterias 2A-2B, 2A-10A, 3A-25B y 3A-6BI demostró ejercer un daño intermedio de necrosis en los tejidos de la raíz de las

plantas, comprometiendo la interacción avirulenta antes documentada en estudios previos con inoculaciones de cepas de forma separada, independiente.

En las pruebas *in vitro*, el consorcio 3 muestra mejor efecto protector en las raíces de la planta ante los patógenos, mas sin embargo en la comparación de medias no hay diferencias estadísticas significativas.

En los estudios en invernadero, los tres consorcios bacterianos muestran efecto protector en la raíz contra daño por los patógenos.

En invernadero, el consorcio 3 que incluye las cepas 1-10A, 2A-10A y MR50-11A demostró mayor efecto protector en planta ante los patógenos que dañan la raíz, tomando en cuenta que el índice de enfermedad fue muy cercano al tratamiento control donde no se inoculó microorganismo, con el cual no mostró diferencias estadísticas significativas.

El consorcio 3 tuvo mejor desempeño tanto en condiciones *in vitro* como en invernadero superando en ambas condiciones a los consorcios 1 y 2.

Los resultados de los experimentos en invernadero fueron mas sobresalientes que los de experimentos *in vitro*, lo que sugiere que el sustrato mezcla de suelo con material orgánico a base de musgo aportado por material Peat-Moss, significa un nicho ecológico mas cercano al medio natural donde se encuentran estas bacterias, lo que les permite desempeñar de manera mas completa sus funciones benéficas hacia las plantas.

6. Reconocimientos

Este trabajo se pudo realizar gracias a las cepas bacterianas previamente aisladas y tamizadas por Victor Emmanuel Balderas Hernández e Inés Martínez Raudales en el Laboratorio de Biología Integrativa de Plantas y Microorganismos de la Unidad Académica de Ciencias Biológicas de la UAZ.

Referencias

- [1] Lamichhane, J. R., Dachbrodt-Saaydeh, S., Kudsk, P., Messean, A. Toward a Reduced Reliance on Conventional Pesticides in European Agriculture. *Plant Dis*, 2016, No. 1, Vol 100, pp.10-24.
- [2] FAO. FAOSTAT. Crops. Chillies and peppers, green-dry. 2014-2018 average production. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> [consultado en diciembre 2020].
- [3] López, R.G. Chili, la especie del nuevo mundo. Facultad de ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. *Ciencia*, 2003, Vol 69, pp. 66-75.
- [4] SIAP, Acciones y Programas. Cierre de producción agrícola. 2020. Disponible en <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>. Consultado en febrero del 2020.
- [5] Pal, K. K., & Gardener, M. B. Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*, 2006, DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
- [6]. Hernández Annia, Rives Narovis, Caballero Alberto, Hernández Ana N, Heydrich Mayra. Caracterización de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz en la producción de metabolitos del tipoa AIA, sideróforos y ácido salicílico. *Rev. Colombiana de Biotecnología*. 2004, No.1, Vol 6 (1), pp. 6-13.
- [7] Wenjian Luo^a, Lidong Liu^a, Gaofu Qia, Fan Yangb, Xuanjie Shib, Xiuyun Zhao. Embedding *Bacillus velezensis* NH-1 in microcapsules for biocontrol of cucumber Fusarium wilt. *Appl. Environ. Microbiol.* 85:e03128-18 2019, doi:10.1128/AEM.03128-18.
- [8] Maciag, T., Krzyzanowska, D. M., Jafra, S., Siwinska, J., & Czajkowski, R. The Great Five—an artificial bacterial consortium with antagonistic activity towards *Pectobacterium* spp. and *Dickeya* spp.: formulation, shelf life, and the ability to prevent soft rot of potato in storage. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020. No. 4, Vol 104, pp. 4547-4561.
- [9] Kushwaha, P., Kashyap, P. L., Srivastava, A. K., & Tiwari, R. K. Plant growth promoting and antifungal activity in endophytic *Bacillus* strains from pearl millet (*Pennisetum glaucum*). *Brazilian Journal of Microbiology*, 2020, No. 1, Vol 51, pp. 229-241.
- [10] Olanrewaju, O. S., & Babalola, O. O. Bacterial Consortium for Improved Maize (*Zea mays* L.) Production. *Microorganisms*, 2019, No. 11, Vol 7, pp. 1-19.
- [11] Martínez-Raudales, I., De La Cruz-Rodríguez, Y., Vega-Arreguín, J., Alvarado-Gutiérrez, A., Fraire-Mayorga, A., Alvarado-Rodríguez, M., Balderas-Hernández, V., Gómez-Soto, J.M., Fraire-Velázquez, S. Draft Genome Sequence of *Bacillus velezensis* 3A-25B, a Strain with Biocontrol Activity against Fungal and Oomycete Root Plant Phytopathogens, Isolated from Grassland Soil. *Genome announce*, 2017, No. 39, Vol. 5, e01021-17; DOI: 10.1128/genomeA.01021-17.
- [12] Martínez-Raudales, I., De La Cruz-Rodríguez, Y., Alvarado-Gutiérrez, A. *et al.* Draft genome sequence of *Bacillus velezensis* 2A-2B strain: a rhizospheric inhabitant of *Sporobolus airoides* (Torr.) Torr., with antifungal activity against root rot causing phytopathogens. *Stand in Genomic Sci*, 2017, No. 73, Vol 12, pp. 1-10. <https://doi.org/10.1186/s40793-017-0289-4>.
- [13] Sagredo-Beltrán, J., De La Cruz-Rodríguez, Y., Alvarado-Rodríguez, M., Vega-Arreguín, J., Rodríguez-Guerra, R., Alvarado-Gutiérrez, A., Fraire-Velázquez, S. **Genome Sequence of *Bacillus halotolerans* Strain MS50-18A with Antifungal Activity against Phytopathogens, Isolated from Saline Soil in San Luis Potosí, Mexico.** *Genome announce*, 2018, no.10, Vol 6. e00135-18; DOI: 10.1128/genomeA.00135-18.
- [14] AnalystSoft Inc., StatPlus:mac - programa de análisis estadístico. Versión v6. Disponible en <http://www.analystsoft.com/es/products/statplusmacle/> Consultado en febrero del 2020.
- [15] Brock, T., & Madigan, M. *Microbiología*/ por Thomas D. Brock ; Michael T. Madigan y trad. Maria del Consuelo Hidalgo y Mondragon. Ed Prentice Hall Hispanoamericana SA. 6 ta ed. México, 1993, pp. 327-335.
- [16] Pande, S., & Kost, C. Bacterial unculturability and the formation of intercellular metabolic networks. *Trends in microbiology*, 2017, No. 5, Vol 25, pp.349-361.
- [17] Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R., & Peterson, S. B. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature reviews microbiology*, 2010, No. 1, Vol. 8, pp.15-25.
- [18] Berendsen, R. L., Vismans, G., Yu, K., Song, Y., de Jonge, R., Burgman, W. P., ... & Pieterse, C. M. Disease-induced assemblage of a plant-beneficial bacterial consortium. *The ISME journal*, 2018, No. 6, Vol 12, pp. 1496-1507.
- [19] Haney, C. H., Samuel, B. S., Bush, J., & Ausubel, F. M. Associations with rhizosphere bacteria can confer an adaptive

- advantage to plants. *Nature Plants*. 2015, No. 6, Vol 1: pp. 1-9.
- [20] Pérez-Jaramillo, J. E., Carrión, V. J., Bosse, M., Ferrão, L. F., de Hollander, M., García, A. A., Raaijmakers, J. M. Linking rhizosphere microbiome composition of wild and domesticated *Phaseolus vulgaris* to genotypic and root phenotypic traits. *The ISME journal*, 2017, No. 10, Vol 11, pp. 2244-2257.
- [21] Carvalhais, L. C., Dennis, P. G., Badri, D. V., Kidd, B. N., Vivanco, J. M., & Schenk, P. M. Linking jasmonic acid signaling, root exudates, and rhizosphere microbiomes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2015, No. 9, Vol 28, pp.1049-1058.