

**Evaluación de la Capacidad Biocontroladora de Bacterias Funcionales, *Trichoderma asperellum* y Aceites Esenciales de Tomillo y Orégano Sobre Fitopatógenos de Quinoa.**

**Jeimy Lorena Valbuena Rodríguez**

**Universidad de Boyacá  
Facultad de Ciencias e Ingeniería  
Maestría en Ingeniería Ambiental  
Tunja  
2021**

**Evaluación de la Capacidad Biocontroladora de Bacterias Funcionales, *Trichoderma asperellum* y Aceites Esenciales de Tomillo y Orégano Sobre Fitopatógenos de Quinua.**

**Jeimy Lorena Valbuena Rodríguez**

**Trabajo de Grado para Optar al Título de:  
Magister en Ingeniería Ambiental**

**Directora**

**Ingrid Rocío Fonseca**

**Bióloga PhD.**

**Codirectora**

**Martha Elizabeth Benavides Rozo**

**Bióloga MSc., PhD.**

**Universidad de Boyacá**

**Facultad de Ciencias e Ingeniería**

**Maestría en Ingeniería Ambiental**

**Tunja**

**2021**

**Nota de aceptación:**

---

---

---

---

---

---

**Firma Presidente del Jurado**

---

**Firma del Jurado**

---

**Firma del Jurado**

Tunja, 12 de noviembre del 2021

**BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA**

“Únicamente el graduando es responsable de las ideas expuestas en el presente trabajo”.  
(Universidad de Boyacá. Programas de Postgrado. Reglamento Estudiantil. Acuerdo 646, 5  
de diciembre de 2013, Art. 86).

**BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA**

Este trabajo es dedicado a:

A mis hijos Estebitan y Tatis porque ustedes han sido mi motor de vida, este logro es de ustedes y espero los inspire a luchar de la mano de Dios para cumplir sus metas y seguir siendo excelentes seres humanos en todos los sentidos de la vida.

A mi amado esposo Felipe Fagua por darme su amor y apoyo incondicional en todo momento.

A mis padres Carlos Valbuena y Luz Yarmet Rodríguez por haberme guiado y orientado por el buen camino y por motivarme a seguir adelante para cumplir todos los propósitos de mi vida.

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

### Agradecimientos

Doy gracias a Dios por ser el principal guía de mi vida, por darme la sabiduría y oportunidad para culminar este proceso académico, por permitirme afrontar las dificultades y disfrutar de las pequeñas y grandes cosas que me brinda a diario.

A mi familia por ser parte de los pequeños y grandes logros, por alentarme a seguir adelante en los malos y buenos momentos, porque gracias a ellos puedo crecer como persona todos los días de mi vida. A mi esposo Felipe, a mis hijos Esteban y Tatiana por su, amor, compañía, oraciones y apoyo incondicional, por las alegrías y fuerzas que me dan para seguir adelante.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis directoras Ingrid Fonseca y Martha Benavidez, por guiarme y aportarme desde su experiencia y en especial por alentarme y motivarme a seguir adelante. Por las veces que sacrificaron de su tiempo personal y familiar para ayudarme a avanzar y culminar en este proceso.

A mi compañero José Castellanos por compartir sus conocimientos; por sus valiosos aportes y múltiples enseñanzas. Al igual que por su sencillez y humildad como persona.

A la profesora Claudia Liliana Buitrago Yomayusa y a la PhD. Claudia Liliana Parra Giraldo por su valiosa ayuda en la identificación de las bacterias.

Agradecer a la Universidad de Boyacá por la oportunidad de hacer posible el cumplimiento de este propósito académico, por facilitarme las herramientas, recursos y tiempo para su desarrollo.

A los quinuocultores del departamento de Boyacá.

Este estudio fue financiado con recursos de la Universidad de Boyacá y de “El Fondo Nacional para el financiamiento de la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, Fondo Francisco José de Caldas”, de Minciencias.

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

## Contenido

	Pág.
<b>Introducción</b> .....	15
<b>Marco Teórico</b> .....	19
<b>1. Quinoa (<i>Chenopodium quinoa</i>)</b> .....	19
<b>1.1. Antecedentes históricos</b> .....	19
<b>1.2. Clasificación científica de la quinoa</b> .....	20
<b>2. Microbiota del Suelo</b> .....	21
<b>2.1. Hongos fitopatógenos del cultivo de quinoa</b> .....	22
<b>3. Métodos para el Biocontrol de Fitopatógenos</b> .....	23
<b>3.1. <i>Trichoderma</i> hongo con potencial biocontrolador</b> .....	23
<b>3.2. Aceites esenciales</b> .....	27
<b>4. Microorganismos Benéficos en los Suelos</b> .....	30
<b>4.1. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs)</b> .....	30
<b>4.2. Solubilización del fosfatos y fijación de nitrógeno</b> .....	31
<b>Objetivos</b> .....	34
<b>Objetivo General</b> .....	34
<b>Objetivos específicos</b> .....	34
<b>Aislamiento e Identificación de Bacterias Funcionales del Cultivo de Quinoa</b> .....	35
<b>1. Muestras de Suelo</b> .....	35
<b>2. Aislamiento de Bacterias Funcionales del Suelo (Solubilizadoras de Fosfato y Fijadoras de Nitrógeno)</b> .....	35
<b>3. Método de Identificación Bioquímica de Bacterias Mediante BBL Crystal ID</b> .....	39
<b>4. Técnica de Espectrometría de Masas MALDI-TOF para la Identificación de Bacterias</b> ..	40
<b>Evaluación del Efecto Biocontrolador de Bacterias Contra Hongos Fitopatógenos del Cultivo de Quinoa</b> .....	47
<b>Actividad Biocontroladora de <i>Trichoderma</i> spp</b> .....	62
<b>1. Aislamiento e Identificación de <i>Trichoderma asperellum</i></b> .....	62
<b>2. Pruebas de Enfrentamiento Hongo - Hongo para la Evaluación del Efecto Biocontrolador de <i>Trichoderma asperellum</i></b> .....	64
<b>Capacidad Bactericida de Aceites Esenciales de Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>) y Orégano (<i>Origanum vulgare</i>)</b> .....	71
<b>1. Análisis de Aceites</b> .....	71
<b>2. Actividad Microbica de Aceites Esenciales de Tomillo y Orégano</b> .....	73

**BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA**

<b>3. Pruebas con Método de Micro Dilución en Placa para Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del Crecimiento Microbiano.....</b>	<b>75</b>
<b>3.1. Cepas bacterianas.....</b>	<b>75</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>81</b>
<b>Sugerencias y Recomendaciones .....</b>	<b>83</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>84</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>98</b>



## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

### Lista de Tablas

	Pág.
<b>Tabla 1</b> Antecedentes del efecto antagónico de <i>Trichoderma</i> spp. ....	24
<b>Tabla 2</b> Antecedentes de los efectos antimicrobianos de aceites esenciales de tomillo y orégano .....	29
<b>Tabla 3</b> Factores climáticos de los puntos de muestreo en el cultivo de quinua. ....	35
<b>Tabla 4</b> Comparación de resultados de identificación de bacterias por el método espectrometría de masas MALDI-TOF y BBL Crystal ID.....	43
<b>Tabla 5</b> Porcentaje de cepas de cada género identificación por el método MALDI TOF.....	45
<b>Tabla 6</b> Resultados pruebas de enfrentamiento entre cepas bacterianas vs hongos. ....	52
<b>Tabla 7</b> Escala para evaluación de la capacidad antagónica. ....	69
<b>Tabla 8</b> Componentes químicos principales de aceites esenciales de Tomillo ( <i>Thymus vulgaris</i> ) y Orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ). Tiempos de retención (tR) y cantidad relativa (%). ....	72
<b>Tabla 9</b> Porcentaje de inhibición para las cepas usadas en este ensayo empleando la técnica de difusión en pozo. ....	75
<b>Tabla 10</b> Identificación presuntiva, tiempos de retención (tR) y cantidad relativa (%) de los componentes presentes en el aceite esencial de Orégano, analizado por GC/MS (full scan). ....	121
<b>Tabla 11</b> Identificación presuntiva, tiempos de retención (tR) y cantidad relativa (%) de los componentes presentes en el aceite esencial de Tomillo, analizado por GC/MS (full scan). ....	122

### Lista de Figuras

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Principios del procedimiento para el análisis en el sistema BD BBL Crystal .....	40
<b>Figura 2.</b> Técnica MALDI-TOF para análisis de bacterias aisladas en un medio de cultivo.....	41
<b>Figura 3.</b> Niveles de confianza de la lectura prueba MALDI – TOF.....	42
<b>Figura 4.</b> Esquema de la inoculación del hongo y las diferentes cepas bacterianas para ensayo antagónico .....	48
<b>Figura 5.</b> Resultados de las primeras pruebas de antagonismo in vitro, con 33 cepas bacterianas a evaluar inicialmente .....	50
<b>Figura 6.</b> Esquema de prueba de enfrentamiento, inoculación del hongo por duplicado (D1 y D2) para evaluar el efecto antagonismo y porcentaje de inhibición de la cepa bacteriana .....	51
<b>Figura 7.</b> Las imágenes muestran las placas con las diferentes pruebas de enfrentamiento entre bacterias antagonistas y los hongos fitopatógenos. ....	57
<b>Figura 8.</b> Identificación Morfológica <i>Trichoderma asperellum</i> .....	62
<b>Figura 9.</b> Esquema de prueba de enfrentamiento, inoculación del hongo antagonismo y hongo patógeno. ....	65
<b>Figura 10.</b> Resultados de pruebas de enfrentamiento.....	68
<b>Figura 11.</b> Estructura química del p-cimeno, timol y carvacrol. ....	73
<b>Figura 12.</b> Método de difusión en pozo.....	74
<b>Figura 13.</b> Placa de microtitulación de 96 pocillos (microdilución), y orden para rellenar los pocillos. ....	76

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

### Lista de Gráficas

	Pág.
<b>Gráfica 1.</b> Recuento de bacterias solubilizadores de fosfato, se obtuvieron colonias blancas y amarillas mucoides, presentes en los 4 puntos de muestreo. ....	37
<b>Gráfica 2.</b> Recuento de bacterias asimbióticas fijadoras de nitrógeno con apariencia translúcida y mucoide, presentes en los 4 puntos de muestreo. ....	38
<b>Gráfica 3.</b> Porcentaje de inhibición y análisis estadístico, bacterias biocontroladoras frente a hongos fitopatógenos. ....	58
<b>Gráfica 4.</b> Porcentaje de inhibición y análisis estadístico de pruebas de enfrentamiento <i>Trichoderma</i> contra Hongos. ....	66
<b>Gráfica 5.</b> CMI de aceites esenciales de tomillo ( <i>T. vulgaris</i> ) y orégano ( <i>O. vulgare</i> ). ....	78

### Lista de Anexos

	Pág.
<b>Anexo A.</b> Anteproyecto .....	99
<b>Anexo B.</b> Protocolo para preparación de medio NBRIP (National Botanical Research Institute Phosphate Growth Medium) .....	119
<b>Anexo C.</b> Protocolo para preparación de agar libre de nitrógeno .....	120
<b>Anexo D.</b> Identificación componentes presentes en los aceites esenciales de Tomillo y Orégano .....	121

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

### Glosario

**Antibiosis:** interacción biológica entre organismos en el cual uno o más metabolitos son excretados (enzimas hidrolíticas, metabolitos secundarios y pequeñas moléculas tóxicas) por un organismo y son capaces de afectar el crecimiento de las células de los microorganismos fitopatógenos.

**Bacterias diazótropas:** bacterias que fijan el nitrógeno atmosférico en formas disponible para las plantas.

**Biocontrol:** es un método de control de plagas, enfermedades y malezas con la utilización de organismos vivos con objeto de controlar las poblaciones de otro organismo.

**Endófito:** dentro de la planta' (*endon:* dentro, *phyton:* planta). microorganismos capaces de colonizar el interior de una planta.

**Epifito:** se denominan así a los organismos que viven sobre plantas.

**Fitopatógenos:** organismo, que genera enfermedades en las plantas, al secretar enzimas, toxinas, fitoreguladores y otras sustancias, además, absorbiendo nutrientes de la célula para su propio crecimiento.

**MALDI-TOF:** por sus siglas en inglés Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (desorción/ionización láser asistida por matriz) y TOF por el detector de iones que se acopla al MALDI, es una técnica que consiste en una ionización suave del analito que provoca la vaporización de intactas moléculas termolábiles, no volátiles tales como proteínas y lípidos en un rango de peso molecular entre 2 a 20 kDa, y resultado inmediato.

**Microelementos:** aquellos elementos nutritivos absorbidos por la planta en cantidades menores, incluyéndose en este grupo el hierro (Fe), cobre (Cu), zinc (Zn), manganeso (Mn), molibdeno (Mo) y boro (B).

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

**Microdilución:** es un método de dilución en agar o en caldo como test de susceptibilidad microbiana es utilizado para determinar la concentración mínima bactericida (MBC) y la concentración mínima inhibitoria (MIC después de incubar por 24 horas, estas variables son una herramienta para investigar nuevos antimicrobianos.

**Pseudocereal:** son plantas que reciben este nombre por presentar características nutricionales parecidas a los cereales, pero no pertenecen a la familia de las gramíneas. Son plantas de hoja ancha que se utilizan de la misma manera que los cereales (los verdaderos cereales son pastos), pero no contienen gluten.

**PGPRs:** bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

**Rizósfera:** es un complejo y dinámico microambiente, donde las bacterias y hongos, en asociación con las raíces, forman comunidades únicas que tienen considerable potencial para la detoxificación de compuestos orgánicos nocivos.

**UFC:** unidad formadora de colonias, es una unidad de medida que se emplea para la cuantificación de microorganismos como bacterias o células fúngicas (levaduras) viables en una muestra líquida o sólida.

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

### Resumen

Valbuena Rodríguez, Jeimy Lorena

Evaluación de la capacidad biocontroladora de bacterias funcionales, *Trichoderma asperellum* y aceites esenciales de tomillo y orégano sobre fitopatógenos de quinua / Jeimy Lorena Valbuena-Rodríguez. - - Tunja : Universidad de Boyacá, Facultad de Ciencias e Ingeniería, 2021.

123p. : il. + 1 CD ROM. - - (Trabajo de grado UB, Magister en Ingeniería Ambiental ; n°. )

Trabajo de Grado (Magister en Ingeniería Ambiental). - - Universidad de Boyacá, 2021

La quinua, es considerada como uno de los granos del siglo XXI y ha sido reconocida en los mercados internacionales por su valor nutricional siendo considerada como un alimento clave en la erradicación de la hambruna, la desnutrición y la pobreza. Pese a su amplia adaptabilidad, este cultivo es afectado por hongos fitopatógenos principalmente *Fusarium* y *Alternaria*, los cuales limitan el rendimiento y producción. Para combatir estos patógenos los agricultores se han basado en la aplicación de pesticidas de origen químico, los cuales genera toxicidad e impactos negativos al ecosistema. Este trabajo busca proponer alternativas más efectivas que reduzcan el impacto negativo de los productos químicos y controlar microorganismos fitopatógenos que afectan este cultivo. Por lo cual, el objetivo fue evaluar el efecto biocontrolador de bacterias solubilizadoras de fosfato y fijadoras de nitrógeno, *Trichoderma asperellum* y aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*) y orégano (*Origanum vulgare*) sobre especies microbianas fitopatógenas, caracterizadas y rescatadas de cultivos de quinua del departamento de Boyacá. Inicialmente se aislaron de un cultivo de quinua ubicado en Oicatá Boyacá, bacterias solubilizadoras de fosfato y fijadoras de nitrógeno en medios específicos; se realizó recuento de colonias características determinando la UFC según la norma ICONTEC 4092 para cada punto de muestreo; posteriormente fueron identificadas 29 cepas bacterianas por los métodos BBL Crystal ID y por espectrometría de masas MALDI-TOF, que permitieron identificar los bacterias de los géneros: *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Lelliottia*, *Pseudomonas* y *Erwinia*. Dichas cepas fueron enfrentadas contra 13 aislados fúngicos previamente aislados e identificados por el grupo de gestión ambiental de la Universidad de Boyacá y una cepa ATCC correspondientes a *Penicillium sp.* (morfortipo I), *Penicillium sp.* (morfortipo II), *Mucor sp.*, *Rhizopus sp.*, *Trichoderma asperellum*, *Aspergillus flavus*, *Alternaria alternata*, *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. incarnatum*, *F. cerealis*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *Trichoderma virens* (ATCC 9645), de esta forma se determinó que 8 cepas bacterianas de los géneros *Pantoea* y *Acinetobacter* presentaron actividad antagónica obteniendo el mayor porcentaje de inhibición los aislados del género *Pantoea* con porcentajes entre 4,7% y 73,4%.

Además, se evaluó el potencial biocontrolador in vitro de una cepa de *T. asperellum* aislado de suelos cultivados con quinua en el municipio de Siachoque, Boyacá, como cepa control se utilizó una cepa *T. virens* (ATCC 9645) y se realizaron pruebas de enfrentamiento contra 11 aislados fúngicos mencionados anteriormente. Las pruebas de enfrentamiento se realizaron en Agar PDA suplementado con cloranfenicol y posterior al crecimiento se evaluó la actividad antagónica midiendo el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR). Los resultados permitieron determinar que la cepa nativa de *T. asperellum* presenta una inhibición promedia del 100% frente a los hongos evaluados; mientras que la cepa *T. virens* (ATCC – 9645) el porcentaje de inhibición es de 87.5%.

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

Finalmente, con el fin de evaluar el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de tomillo y orégano se determinó la CMI contra las bacterias aisladas en el presente estudio y así analizar otras alternativas de biocontrol; para la determinación de la CMI se utilizó el método de micro dilución en placa y se probaron 10 concentraciones para cada aceite (4%, 2%, 1%, 0.5%, 1,25%, 0,125%, 0,062%, 0,031% y 0,015%), la inoculación se realizó con las diluciones bacterianas ajustadas en escala de McFarland 0,5 y una vez incubadas las placas se leyeron en el equipo SPECTROstar Nano - BMG LABTECH, a una absorbancia de 600 nm. Los resultados permitieron determinar que la mayoría de las cepas evaluadas son más susceptible al aceite de orégano, debido a que este presenta un contenido alto de carvacrol que proporcionando una mayor efectividad bacteriostática. En este estudio se demostró que los suelos nativos son fuente importante de microorganismos biocontroladores y que los aceites esenciales pueden ser eficaces en el control de fitopatógenos constituyéndose en potenciales alternativas para reducir el impacto negativo de la aplicación de productos sintéticos en el ecosistema.

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

### Introducción

La quinua (*Chenopodium quinoa Willd*), es un grano que se cultiva en la región andina; en la actualidad se ha valorizado y ampliado su distribución en los mercados nacional e internacional debido a su gran valor nutricional principalmente por su alto contenido de proteínas e importantes micronutrientes como magnesio, cobre y zinc, útiles para el buen funcionamiento del organismo (Abugoch James, 2009; Rojas *et al.*, 2011); razón por la cual es considerada como un alimento clave en la erradicación de la hambruna, la desnutrición y la pobreza. Esto ha conllevado al incremento extraordinario de áreas sembradas en los principales países de producción.

Este grano es rentable por su gran adaptación a diferentes pisos agroecológicos y climas, respondiendo a las nuevas exigencias de los mercados de origen orgánico debido a que el uso de fertilizantes y pesticidas generalmente es escaso, lo que constituye un producto de fácil elección para los requerimientos de los consumidores de productos naturales, sanos y nutritivos (Cruces *et al.*, 2016); es por esto que en Colombia, las entidades públicas y privadas han incentivado el cultivo propiciando acciones encaminadas a reimplantar la quinua y conformar su cadena productiva. Sin embargo, su cultivo y producción se hace de manera experimental o artesanal, por lo cual es necesario proponer herramientas que permitan el desarrollo y mejoramiento de los cultivos y productos, de manera que se cumpla con las normas y expectativas del mercado nacional e internacional (Restrepo *et al.*, 2005).

Pese a la adaptación del cultivo de quinua y la alta resistencia a factores bióticos y abióticos, este puede verse afectado por fitopatógenos siendo los hongos los microorganismos de mayor predominancia, entre los que se encuentran los géneros: *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Ascochyta*, *Sclerotium*, *Pythium*, *Colletotrichum Phoma* y *Alternaria* (Danielsen *et al.*, 2003) los cuales pueden limitar la producción y generar pérdidas de los sembradíos ya que disminuyen el crecimiento de las plantas y el rendimiento y la rentabilidad del cultivo.

Los hongos fitopatógenos son organismos heterótrofos sexuales o asexuales formados por un cuerpo micelial con paredes celulares de quitina, cuentan con mecanismos y estrategias biológicas como la producción de metabolitos que les ha permitido subsistir, infectar y producir daños en raíces, hojas, tallos y frutos, ocasionando pudrición de raíz, marchitez vascular, clorosis, y defoliación, además de susceptibilidad al ataque de otros patógenos. Adicionalmente,

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

aunque los reportes de bacterias patógenas en el cultivo de quinua son muy limitados se han reportado bacterias del género *Pseudomonas* (Colque-Little *et al.*, 2021; Cruces *et al.*, 2016) las cuales pueden generar pudrición por obstrucción de los haces vasculares en variedades susceptibles (Fonseca-Guerra *et al.*, 2021).

Para combatir estos patógenos los agricultores se han basado en la aplicación de pesticidas de origen sintético, los cuales tienen un corto periodo de efectividad, por lo que su aplicación se vuelve recurrente y genera toxicidad, además de su poca especificidad siendo incapaces de discriminar entre las especies patógenas y funcionales, trayendo consecuencias e impactos negativos al suelo, al aire, la contaminación de aguas subterráneas y alteraciones en el ecosistema, causando un desbalance en las interacciones bióticas del ecosistema, induciendo patógenos resistentes, generando peligros tóxicos para el hombre, las plantas, los animales domésticos y la vida silvestre, al igual que a cosechar un producto con alta probabilidad de contener residuos, que pone en riesgo la salud de los consumidores, imposibilita su exportación y causa perjuicios en el medio ambiente (Cruces *et al.*, 2016; Foyosal & Lisa, 2018; Salinas, 2018).

Las consecuencias por el uso indiscriminado de plaguicidas muchas veces son de carácter irreversible. El uso generalizado de agroquímicos para controlar las plagas y proteger los cultivos ha sido asociado ampliamente con la contaminación de agua, suelo y alimentos. Cuando un plaguicida es aplicado a un cultivo, aproximadamente el 1% del compuesto químico alcanza al organismo blanco, mientras que el 99% restante es retenido en el follaje o se dispersa en el ambiente por volatilización, escorrentía y lixiviación. De esta manera, los residuos quedan en el suelo y en el agua e ingresan en las cadenas tróficas (Salinas, 2018). Algunos estudios han informado sobre la ingesta alimentaria de contaminantes químicos como el cadmio (Cd), arsénico (As), mercurio (Hg) y plomo (Pb) por encima de los valores diarios tolerables, debido al uso de pesticidas organoclorados y organofosforados en los cultivos. En diferentes países se han identificado alimentos vegetales y animales como principales contribuyentes en la ingesta dietética de dichos contaminantes; pescados y mariscos contienen una alta concentraciones de estos cuatro elementos y las raíces, tubérculos, y cereales contribuyen en la ingesta de valores altos de cadmio y alimentos como, cereales, verduras, hortalizas y frutas en la ingesta de valores altos de plomo (Galal-Gorchev, 1991; Llobet *et al.*, 2003). Adicionalmente, no solo la aplicación de plaguicidas trae consecuencias, sino el manejo y la intensidad de exposición de



## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

los agricultores, los cuales han reportado intoxicaciones agudas con plaguicidas (IAP). Se calculan entre quinientos mil y un millón de IAP anuales, y entre cinco mil y veinte mil defunciones por esa causa en diferentes lugares del mundo (Martínez-Valenzuela & Gómez-Arroyo, 2007).

Sumando a esto y teniendo en cuenta que el control fitosanitario de los cultivos en el país está basado principalmente en el uso de agroquímicos se ha disminuido significativamente su valor comercial, en especial si es para exportación. Por lo cual, es un reto para la sociedad actual, transformar los sistemas convencionales de explotación agraria a agroecológicos. En este sentido, en los últimos años se vienen realizando investigaciones que permitan proponer alternativas eficaces en reducir el impacto negativo de los productos sintéticos y controlar microorganismos fitopatógenos sin afectar el medio ambiente; en este sentido, la utilización de métodos con capacidad biocontroladora y bioplaguicida como es el uso microorganismos y de aceites esenciales, constituyen una alternativa viable para lograr cultivos sanos y que cumplan con las normativas fitosanitarias, de esta manera reducir el impacto negativo de los agroquímicos en el medio ambiente (Companioni González *et al.*, 2019) y mejorar notablemente los sistemas productivos disminuyendo gradualmente la aplicación de productos químicos y costos para los agricultores.

Una fuente importante de microorganismos benéficos es el suelo, los cuales son responsables de procesos físico-químicos importantes para la producción agrícola, ya que intervienen tanto en el aprovechamiento de nutrientes como en la solubilización y absorción de iones. El uso de microorganismos promotores de crecimiento vegetal (PGPR) adquiere cada vez más importancia para el control de fitopatógenos en diferentes cultivos, por su capacidad de producir diversos e interesantes compuestos bioactivos con actividad antibacteriana, antifúngica y plaguicida y dado que pueden encontrarse asociados a las plantas son considerados una alternativa ambientalmente saludable para el reemplazo de fungicidas de síntesis química (Horna *et al.*, 2014), además de los beneficios que de por sí aportan en el crecimiento y desarrollo de las plantas.

En este sentido, bacterias del género *Pantoea* y hongos del género *Trichoderma*, son considerados como agentes biocontroladores, debido a la presencia de genes que codifican la producción de metabolitos secundarios entre los que se incluyen: lipopéptidos como surfactina, fengicina, iturina, bacilomicinas y zwitermicina; que tienen un papel primordial en el

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

antagonismo ya que inhiben el crecimiento micelial y la germinación de esporas (Dutkiewicz *et al.*, 2016).

Como otra alternativa amigable con el ambiente se han propuesto los aceites esenciales de origen vegetal, extractos naturales concentrados derivados de plantas, que han demostrado ser una buena fuente de compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Estos compuestos son líquidos aromáticos que se obtienen por diferentes métodos de extracción, a partir de material orgánico como flores, tallos, raíces, hojas, frutos y semillas; se ha demostrado que aparte de tener compuestos con actividad antibacteriana y antifúngica, son inocuos para el medio ambiente, para los consumidores y pueden ser una alternativa para reducir el uso de agroquímicos sintéticos en el control de fitopatógenos (Barrera Necha & García Barrera, 2008).

El presente trabajo busca evaluar la capacidad biocontroladora de bacterias solubilizadoras de fosfato y fijadoras de nitrógeno, *Trichoderma asperellum* y aceites esenciales de Tomillo (*Thymus vulgaris*) y Orégano (*Origanum vulgare*) sobre microorganismos fitopatógenos del cultivo de quinua, métodos que pueden ser más efectivos, biodegradables y con menor toxicidad para los organismos que no son blanco de eliminación, con el fin de proponer nuevas alternativas para minimizar la aplicación de pesticidas sintéticos y garantizar prácticas agrícolas sustentables apoyadas en la conservación de los recursos naturales tales como el suelo, agua y biodiversidad, minimizando los efectos en la salud humana y animal.

## Marco Teórico

### 1. Quinoa (*Chenopodium quinoa*)

La quinoa es un cultivo domesticado hace miles de años por las antiguas culturas de la Región Andina de Suramérica, destinado a la producción de granos; pertenece a la familia *Chenopodiaceae*, por lo que es considerada un pseudocereal, ya que sus granos se utilizan de manera semejante a los cereales.

Este grano es uno de los pocos alimentos de origen vegetal nutricionalmente completo, debido a que presenta un adecuado balance de proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas y minerales. Su característica más sobresaliente es el aporte de proteínas con alto valor biológico, pues contienen la totalidad de los aminoácidos esenciales estando muy cerca de los estándares de nutrición humana establecidos por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (Pando & Castellanos, 2016; Rojas *et al.*, 2011).

#### 1.1. Antecedentes históricos.

Se han hallado registros arqueológicos de cultivos de quinoa que datan de aproximadamente 5000 años a.C., y en cuya domesticación y conservación han participado grandes culturas precolombinas. Esta especie tuvo una amplia difusión en Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Chile, previo a la “Conquista”, fue cultivada y asociado a con otros cultivos como porotos, maíz y papas (Bazile *et al.*, 2014).

Con la llegada de los españoles los cultivos y hábitos alimenticios de los pueblos originarios fueron remplazados y se introdujeron cereales como la cebada y el trigo. Sin embargo, el cultivo de quinoa se mantuvo en pequeñas plantaciones ubicadas en zonas periféricas a las grandes urbes, donde se producía preponderantemente para el autoconsumo. La conservación de las quinuas ancestrales, por parte de los pueblos originarios de América, constituye una fuente de diversidad invaluable. Estos materiales son utilizados en la actualidad como base para el mejoramiento genético de la especie y la obtención de variedades modernas (Rojas *et al.*, 2011).

Sus granos han sido utilizados en la dieta de los pobladores tanto de valles interandinos, zonas más altas (superiores a 3500 msnm), frías (temperaturas promedio de 12 °C) y áridas (350

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

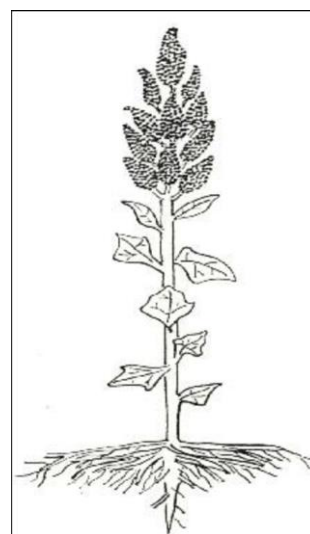
mm de precipitación promedio) (Rojas *et al.*, 2011). Tal es la importancia que se le ha dado a esta especie que en 1996 fue catalogada por la FAO como uno de los cultivos promisorios de la humanidad, en reconocimiento a los pueblos andinos que la preservaron como alimento para futuras generaciones y a la contribución que podría realizar a la seguridad alimentaria global. Asimismo, el año 2013 fue declarado por la FAO como “Año Internacional de la Quínoa” en virtud de las cualidades nutritivas de sus granos, la posibilidad de cultivar esta especie en una amplia gama de situaciones agroecológicas y la creciente demanda de los mercados internacionales por este producto.

En los últimos años, se evidencia un progresivo aumento de su producción mundial, especialmente en los tres países andinos que han sido tradicionalmente los principales productores (Bolivia, Perú y Ecuador) que en conjunto generan más del 80% de la producción mundial. Los otros exportadores importantes son Estados Unidos (9,8%) y la Unión Europea (7,5%). En la actualidad en Colombia se cultiva principalmente en los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Cauca y Nariño, se conoce ampliamente en el país y se encuentra ubicado en diferentes en comunidades locales (FAO & ALADI, 2014).

### 1.2. Clasificación científica de la quinua.

A continuación se presenta la clasificación taxonómica de la quinua (Rojas *et al.*, 2011; Tapia & Fries, 2007)

<b>Reino:</b>	Plantae
<b>División:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Magnoliopsida
<b>Orden:</b>	Caryophyllales
<b>Familia:</b>	Amaranthaceae
<b>Subfamilia:</b>	Chenopodioideae
<b>Género:</b>	<i>Chenopodium</i>
<b>Especie:</b>	<i>Chenopodium quinoa Willd</i>



## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

**Imagen 1.** Esquema de planta de quinua, tomada de (Maximiliano & Diego, 2016).

Esta planta dicotiledónea, alcanza alturas de 0,2 a 3,0 m, sus tallos son ramificados, sus hojas anchas y tienen un período vegetativo largo, los granos son planos de grandes a pequeños, ovalados, generalmente de color amarillo pálido, pero el color puede variar de rosa a negro (El Hazzam *et al.*, 2020). Sus arbustos pueden presentar diversos colores que van desde verde, morado a rojo y colores intermedios entre otros. Se ha reportado que el crecimiento y desarrollo de esta especie está determinado por la genética de la planta, por las condiciones ambientales a las que está expuesta y por factores bióticos (incluidas plagas y enfermedades) (Rojas *et al.*, 2011; Tapia & Fries, 2007). Su cultivo a diferencia de la mayoría, y dependiendo de la variedad, se desarrolla sin muchos inconvenientes en condiciones extremas, tiene una extraordinaria adaptabilidad a diferentes pisos agroecológicos; adaptándose a diferentes climas desde el desértico hasta climas calurosos y secos, el cultivo puede crecer con humedades relativas desde 40% hasta 88% de humedad, y la temperatura adecuada para el cultivo es de 15 a 20°C, pero puede soportar temperaturas desde 4°C hasta 38°C. Es una planta eficiente al uso de agua, es tolerante y resistente a la falta de humedad del suelo, obteniéndose producciones aceptables con precipitaciones de 100 a 200 mm; asimismo tolera suelos de diferente textura y pH, e incluso creciendo en suelos muy ácidos y fuertemente alcalinos. Su gran adaptación a las variaciones climáticas y su eficiente uso de agua convierten a la quinua en una excelente alternativa de cultivo frente al cambio climático (Rojas *et al.*, 2011).

## 2. Microbiota del Suelo

Los microorganismos habitan en diversos entornos de la biosfera, desempeñan funciones integrales en los ecosistemas y participan en ciclos biogeoquímicos esenciales, como carbono, oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo y varios metales (Zhou *et al.*, 2015). El microbioma del suelo es un hábitat altamente complejo, su actividad es, en gran medida, responsable del funcionamiento y de la fertilidad de los suelos agrícolas. Entre los microorganismos benéficos del suelo, tanto los hongos formadores de micorrizas arbusculares (MA) como las bacterias

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

rizosféricas promotoras del crecimiento (BRPC), contribuyen a mejorar el desarrollo y la nutrición de la planta, así como a incrementar la tolerancia de los cultivos frente a determinadas situaciones de estrés de tipo biótico o abiótico (Rodríguez-Romero, 2008).

Se ha estimado que un gramo de suelo prístino presenta  $10^9$  células bacterianas por gramo de suelo y cerca de  $10^4$  especies microbianas diferentes/gramo (Zhou *et al.*, 2015). Las interacciones de estos microorganismos garantizan la sostenibilidad, contribuyendo a optimizar la calidad y la salud del suelo, limitar el aporte de nutrientes e incrementar los rendimientos, al igual que la resistencia a plagas y la capacidad de recuperación (Balestrini *et al.*, 2015).

En el suelo se diferencian microorganismos benéficos y fitopatógenos de acuerdo a sus funciones y al efecto sobre el crecimiento, productividad, sanidad y la calidad del suelo y de las plantas. Entre los microorganismos benéficos están aquellos que fijan nitrógeno atmosférico, descomponen desechos y residuos orgánicos, desintoxican el suelo de pesticidas, combaten patógenos y enfermedades de las plantas, incrementan ciclaje de nutrientes y producen componentes bioactivos como vitaminas, hormonas y enzimas que estimulan el crecimiento vegetal. Los microorganismos fitopatógenos, son aquellos que pueden inducir enfermedades en las plantas, estimulando el aumento de los mismos inmovilizando nutrientes y produciendo toxinas que afectan el crecimiento y salud de la planta (Higa & Parr, 2013).

### 2.1. Hongos fitopatógenos del cultivo de quinua.

Las enfermedades infecciosas de las plantas reducen en gran medida la cantidad y calidad de los cultivos, lo que implica pérdidas económicas para los productores ya que reduce su valor en el mercado. El complejo de enfermedades de la quinua está conformado principalmente por hongos y en menor proporción por bacterias, virus y nematodos. Entre los hongos más comunes en el cultivo de quinua, se encuentran los géneros: *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Pythium* sp., *Alternaria* sp., *Botrytis* sp. y *Cladosporium* sp. (Carrillo Gualancañay, 2019; Cruces *et al.*, 2016). La incidencia y severidad de estos patógenos está en función de la variedad, susceptibilidad del estado fenológico y condiciones ambientales del cultivo. La alta incidencia de dichas plagas y enfermedades en los cultivos ha impulsado en los agricultores el uso de pesticidas y fungicidas de origen químico, los cuales afectan en gran medida al ambiente y deterioran los suelos (Gleń-Karolczyk *et al.*, 2016).

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

Los hongos invaden la planta como organismos hospederos o parásitos, otros son saprófitos, el mismo hongo puede atacar diferentes tipos de plantas, ya que se pueden encontrar sobre la superficie de los tejidos de la planta y las esporas pueden dispersarse y afectar a otros cultivos (Carrillo Gualancañay, 2019).

### 3. Métodos para el Biocontrol de Fitopatógenos

La necesidad de proteger los cultivos del ataque de los fitopatógenos y reducir el uso de los plaguicidas sintéticos y químicos, ha hecho que se desarrollen investigaciones dirigidas a introducir y aplicar métodos de biocontrol haciendo uso de microorganismos y sustancias naturales como alternativas sustentables y amigables con el ambiente.

#### 3.1. *Trichoderma* hongo con potencial biocontrolador.

Una de las características más interesantes de algunas cepas fúngicas es su acción antagonista que impide el crecimiento de otros microorganismos, la cual es particularmente importante en el control de patógenos. Los hongos son uno de los fitopatógenos más difíciles de controlar, y la infección con éstos causa enormes pérdidas en los cultivos. Se ha estudiado la capacidad biocontroladora de varias cepas fúngicas, siendo las más sobresalientes las del género *Trichoderma* (Chávez *et al.*, 2014).

*Trichoderma* spp. es un hongo que encuentra en casi todo tipo de suelos y hábitats; fue identificado en 1871 y reconocido como un agente de control biológico desde 1920. Es un hongo saprofito, anaerobio facultativo que promueve el crecimiento y desarrollo de las plantas (Misra & Ansari, 2021). Se ha reportado que *Trichoderma* presentaba una interesante actividad biocontroladora por la inhibición de crecimiento de fitopatógenos como son los géneros *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Phoma* en diversos cultivos de interés económico como la papa, el maíz, el tomate, el maracuyá, la quinua, entre otros. Las especies de *Trichoderma* son conocidas por su capacidad de inhibir diferentes patógenos de plantas mediante la producción de metabolitos secundarios como antibióticos y enzimas degradadoras de la pared como quitinasas, glucanasas, celulasas, proteasas y otras hidrolasas (Chávez *et al.*, 2014).

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

*Trichoderma* se encuentra en diferentes suelos agrícolas y forestales, este hongo se establece fácilmente en cualquier tipo de suelo rizosférico y puede sobrevivir allí durante varios meses, esto se da por su habilidad ecológica para ser un excelente competidor por espacio y recursos nutricionales, además de su alta producción de metabolitos con efectos inhibidores significativos, por lo que existen diferentes reportes del uso de este hongo para el biocontrol de fitopatógenos fúngicos en diferentes cultivos de interés económico como se indican tabla 1.

**Tabla 1.** Antecedentes del efecto antagónico de *Trichoderma* spp.

Especie antagónica de <i>Trichoderma</i>	Efecto antagonista sobre	Principales hallazgos del estudio	Referencia
<i>T. asperellum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Se evaluaron 12 cepas de <i>Trichoderma</i> spp. que se aislaron de suelos de diferentes tipos de cultivos. Los resultados mostraron que <i>T. asperellum</i> tiene una capacidad de crecimiento rápido; los efectos de inhibición sobre <i>F. oxysporum</i> fueron del 73% y 74% respectivamente. Se detectaron seis metabolitos volátiles idénticos.	(Tao <i>et al.</i> , 2020)
<i>T. virens</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Los metabolitos volátiles y no volátiles de <i>T. virens</i> presentaron efectos inhibidores significativos sobre el crecimiento de <i>R. solani</i> . Los metabolitos no volátiles de esta especie afectaron significativamente las proteínas del micelio de <i>R. solani</i> , incluyendo catalasa, superóxido dismutasa, peroxidasa, glutación peroxidasa dependiente de selenio (GSH-Px), proteínas solubles y malondialdehído. Se encontró que veinte genes asociados con el hiperparasitismo, incluidas proteasas extracelulares, transportadores de oligopéptidos, receptores acoplados a proteína G (GPCR), quitinasas, glucanasas y proteasas, estaban regulados positivamente durante el proceso antagonista entre <i>T. virens</i> y <i>R. solani</i> . Treinta genes relacionados con la función de la antibiosis,	(Halifu <i>et al.</i> , 2020)



## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

incluidas las proteínas de resistencia a la tetraciclina, las reductasas, la respuesta al choque térmico, la respuesta al estrés oxidativo, los transportadores de eflujo del casete de unión a ATP (ABC) y los transportadores de resistencia a múltiples fármacos.

Una aplicación de metabolitos de *Trichoderma.sp.* + Brassinolide (BR) redujo el moho gris una de las principales enfermedades del tomate causado por *B. cinerea* en aproximadamente un 70.0%. Además, las actividades de la enzima relacionada con la respuesta de defensa inducida, como peroxidasa, superóxido dismutasa, catalasa y fenilalanina amoniaco-liasa, aumentaron en plantas de tomate tratadas con el compuesto mencionado.

*T. atroviride*

*Botrytis cinérea*

(Li *et al.*,  
2020)

Se evaluó la actividad antifúngica a diferentes concentraciones (10, 20, 30, 40 y 50 ppm) frente a este patógeno. La fracción de acetato de etilo del extracto de *T. koningii* mostró la actividad más prometedora, lo que resultó en una supresión de la biomasa del 10 al 90%. En el caso de *T. viride*, la fracción de butanol resultó ser la más eficaz para retardar el crecimiento del patógeno del 20 al 80%. Mientras que el extracto de *T. harzianum* reveló un 55-85% de detención en la biomasa fúngica debido a la fracción de n-hexano. Las 3 especies de *Trichoderma* demostraron una fuerte actividad fungicida contra *A. alternata*.

*T. koningii*, *T. viride* y *T. harzianum*

*Alternaria alternata*

(Shafique *et al.*, 2019)

La cepa de *T. asperellum* evaluada presentó potencial como biocontrolador por la inhibición y antagonismo sobre *Fusarium sp.* in vitro y sobre *C. kikuchii* y *P. pachyrhizi* en condiciones de campo. Además estimula el crecimiento vegetal de la soya al incrementar el número de vainas por planta.

*T. asperellum*  
Samuels

*Fusarium sp.*,  
*Cercospora kikuchii*,  
*Phakopsora*  
*Pachyrhizi*

(Cruz-Triana  
*et al.*, 2017)

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

<i>T. harzianum</i>	<i>F. oxysporum</i>	Se determinó la capacidad antagonica de 6 aislamientos de <i>T. harzianum</i> sobre <i>F. oxysporum</i> . Todos los aislamientos superaron en crecimiento al patógeno con radios de 7,42 cm en cultivo dual; mientras que el patógeno mostró un radio de 1,99 cm, lo que indica que esta especie es promisoria en el biocontrol de dicho patógeno que causa la marchitez del maracuyá.	(R. J. Fernández & Suárez, 2009)
<i>T. harzianum</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>Mucor</i> spp., <i>Penicillium digitatum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Aspergillus niger</i> y <i>Pythium</i> spp	<i>T. harzianum</i> demostró la capacidad para reducir el crecimiento de <i>R. stolonifer</i> , <i>Mucor</i> spp., <i>P. digitatum</i> , <i>R. solani</i> , <i>A. niger</i> y <i>Pythium</i> spp. demostrando ser un excelente biocontrolador de hongos postcosecha en fresa, a través del parasitismo como mecanismo de acción.	(Guédez <i>et al.</i> , 2009)

---

Fuente: Autor.

La capacidad como antagonista de *Trichoderma* es altamente variable y depende de la especificidad de la cepa y de sus modos de acción que implican el despliegue varios mecanismos tales como antibiosis, competencia (por espacio y nutrientes) y micoparasitismo (desactivación de enzimas de los patógenos) y otros mecanismos como son la aceleración del desarrollo del sistema radicular que posibilita la tolerancia al estrés por parte de la planta huésped, induciendo la resistencia y estimulando el crecimiento vegetal con la absorción de nutrientes inorgánicos (Martínez *et al.*, 2013).

El desarrollo de mecanismos de acción antagonica que ha sido ampliamente estudiado en este hongo es el micoparasitismo que le permite crecer quimiotrópicamente hacia el hospedante, se adhieren a las hifas del mismo, se enrollan en ellas frecuentemente y las penetran en ocasiones. El proceso se lleva a cabo a través de la producción de varias enzimas que degradan la pared celular del patógeno que contiene celulasas, quitinasas. La degradación de las paredes celulares del hospedante se observa en los estados tardíos del proceso parasítico, que conlleva al debilitamiento casi total del fitopatógeno (Infante *et al.*, 2009).

Adicionalmente, una de las capacidades antagonicas más importantes es la producción de metabolitos con actividad antifúngica. *Trichoderma* produce antibióticos volátiles y no volátiles, diversos en cuanto a estructura y función. Algunos de los que se han identificado son

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

del tipo de las alquil-pironas (6- $\alpha$ -pentil-pirona), isonitrilos (isonitrina), poliquétidos (harzianolida), peptabioles (trichodermina, atroviridina, alameticina, suzucacilina y trichozianina), dicetopiperacinas (gliovirina y gliotoxina), sesquiterpenos (ácido heptelídico) y esteroides (viridina). Recientemente, se caracterizaron un grupo de metabolitos secundarios (azapilona, butenolide, 6-pentil- $\alpha$ -pirona, 1-hidroxi-3-metil-antraquinona, 1,8-dihidroxi-3-metil-antraquinona, koninginina, ácido heptelídico, trichoviridina, ácido harziánico, gliotoxina, gliovirina, viridina, viridiol) (Adnan *et al.*, 2019; Martínez *et al.*, 2013). Estos mecanismos hacen que las cepas de esta especie sean muy eficientes como agentes de control biológico

### 3.2. Aceites esenciales.

Otra alternativa natural de control de fitopatógenos son los aceites esenciales, líquidos oleosos aromáticos obtenidos de diversas partes de la planta flores, frutos, hojas, raíces, semillas y corteza. A menudo son responsables de la característica distintiva de una planta como el olor o sabor (Badawy & Abdelgaleil, 2014). Son sustancias muy volátiles, en su mayoría son insolubles en agua y solubles en alcohol, éter, grasas, ceras y aceites vegetales (Jiménez, 2020).

Se conocen aproximadamente 3000 tipos de aceites esenciales, alrededor de 300 son de gran importancia comercial, se destacan como agentes aromatizantes en la industria alimentaria y como fragancias en la industria cosmética (Badawy & Abdelgaleil, 2014; Cowan, 1999). Son mezclas complejas de compuestos, principalmente terpenos, sesquiterpenos y sus derivados oxigenados (alcoholes, aldehídos, ésteres, éteres, cetonas, fenoles y óxidos). Algunos compuestos volátiles incluyen fenilpropenos y sustancias específicas que contienen azufre o nitrógeno (Cowan, 1999).

Estos no tienen una función exacta en las plantas pueden tener diversos fines, entre estos, protección contra plagas, enfermedades y plantas invasoras, así mismo para atraer insectos y aves (polinizadores), gracias a ello se viene explorando la posibilidad de encontrar diversas actividades biológicas de estos (Cabrera, 2019).

Las enfermedades infecciosas en plantas son causadas por bacterias, hongos, virus e insectos los cuales han incrementado debido al uso intensivo de agroquímicos, esto ha resultado en una continua búsqueda de compuestos antioxidantes y antimicrobianos naturales efectivos que preserven la calidad de los alimentos y seguridad sin detrimento de sus atributos sensoriales,

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

por lo cual los aceites esenciales y sus propiedades bactericidas, fungicidas y antioxidantes, han despertado gran interés (Badawy & Abdelgaleil, 2014; Rodriguez-Garcia *et al.*, 2016), debido a su destacada variabilidad en la composición química y a su capacidad de interactuar con receptores específicos de múltiples dianas biológicas (Usano-Alemanly *et al.*, 2014).

### 3.2.1 Tomillo (*Thymus vulgaris*).

El género *Thymus* pertenece a la familia de las *Lamiaceae*, es de clima templado y originario de los países de la cuenca mediterránea occidental. Crece sobre suelos secos y soleados y resiste bien las heladas y sequías. Su nombre genérico proviene del verbo griego Thym, en alusión a su intenso y agradable aroma y vulgaris que se refiere a la frecuencia de este vegetal, es una planta leñosa que puede llegar a medir entre 10-40 cm de altura y muy ramificadas; sus hojas son abundantes, oscilan de 3-8 mm, son lineares, oblongas, sentadas o brevemente pediculadas (Luengo, 2006). *T. vulgaris* es una planta aromática y rica en aceites esenciales, con propiedades medicinales, antimicrobianas y actividad antioxidante debido a sus componentes principales como el timol y el carvacrol, además de otros componentes presentes en menor cantidad como algunos flavonoides y polifenoles (Jiménez, 2020).

### 3.2.2 Orégano (*Origanum vulgare*).

El género *Origanum* pertenece a la familia de las *Lamiaceae*, es una herbácea perenne aromática, nativas de la zona mediterránea y muy utilizada como especia en la cocina. Es una planta pequeña arbusto achaparrado de unos 45 cm de alto, los tallos, que a menudo adquieren una tonalidad rojiza. Las hojas surgen opuestas, ovales y anchas de entre 2-5 cm, con bordes enteros o ligeramente dentados y con vellosidad en el envés. Las diminutas flores, de color blanco o rosa, que nacen en apretadas inflorescencias terminales muy ramificadas están protegidas por diminutas hojillas de color rojizo (Solís, 2012).

*O. vulgare* posee unas pequeñas glándulas donde está contenida la esencia aromática, de color amarillo limón, compuesto por un esteropteno y dos tipos de fenoles, como mayoritario el carvacrol y en menor proporción el timol. Las raíces contienen estaquiosa y los tallos sustancias tánicas (Carhuallanqui *et al.*, 2020). Los cuales son responsables del sabor del orégano y de sus diferentes propiedades biológicas que incluyen capacidades antioxidantes, antimicrobianas, acaricidas, antiparasitarias y antifúngicas (Cid-Pérez *et al.*, 2019).

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

En los últimos años, se ha investigado una gran cantidad de aceites esenciales y sus constituyentes por sus propiedades antimicrobianas contra algunas bacterias y hongos reportándose la actividad antimicrobiana en más de 500 informes (Kalemba & Kunicka, 2003). En la tabla 2 se resumen algunos de estos reportes.

**Tabla 2.** *Antecedentes de los efectos antimicrobianos de aceites esenciales de tomillo y orégano*

Especie inhibida	Principales hallazgos del estudio y aceites utilizados	Concentraciones inhibitorias reportadas	Referencia
<i>Fusarium spp.</i>	Se analizó el efecto fungicida que tienen los aceites esenciales de orégano y tomillo sobre cepas del hongo fitopatógeno <i>Fusarium spp.</i> encontrados en el cultivo del arroz. La variable de control fue el crecimiento radial de la colonia. Los AE evaluados mostraron una inhibición del crecimiento micelial por encima del 90%.	500 y 1000ppm, obtenidos por hidrodestilación.	(Carrera & Salazar, 2018)
<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. niger</i> y <i>A. ochraceus</i>	Se evaluó la CMI de aceite de orégano para inhibir el crecimiento micelial de los hongos fue de 2,0 µl/L, mientras que las esporas se erradicaron tras la exposición a 2,0 a 2,5 µl/L. El tomillo fue menos eficaz para controlar los micelios y se observó crecimiento incluso después de la exposición a 4,0 µl/L. Sin embargo, fue fungitóxico para las esporas (CMI = 3,0 µl / L).		(Paster <i>et al.</i> , 1995)
<i>Leuconostoc citreum</i>	Este estudio se realizó para identificar combinaciones de aceites esenciales (AE) que provocan efectos antimicrobianos sinérgicos contra <i>L. citreum</i> , una bacteria que deteriora los jugos de frutas y verduras. Se realizaron ensayos de difusión en pozos de agar.	Los AE de corteza de canela, orégano y tomillo timol mostraron la actividad más fuerte (concentración inhibitoria mínima = 1.25 µL / mL).	(Lee <i>et al.</i> , 2020)

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

---

<i>Ralstonia solanacearum</i>	<p><i>R. solanacearum</i>, es una bacteria fitopatógena de gran importancia a nivel mundial conocida por provocar la enfermedad de la marchitez bacteriana. Esta es una enfermedad que devasta numerosos cultivos, entre ellos se encuentra la papa. La técnica utilizada para el análisis fue la difusión en agar, donde se evaluaron 3 diferentes diluciones (1:1, 1:5 y 1:10) y se colocaron 7.5, 10 y 15 µl de cada una de las concentraciones.</p>	<p>La cantidad más efectiva fue de 15 µl de aceite esencial de orégano y tomillo (Rueda-Puente <i>et al.</i>, 2018)</p>
-------------------------------	---	---

---

Fuente: Autor.

### 4. Microorganismos Benéficos en los Suelos

Los microorganismos (bacterias, actinomicetos, hongos) en suelos cultivados, pueden ser de vida libre o encontrarse asociados a diversos tejidos de las plantas; estos generan diferentes mecanismos que influyen positivamente en el desarrollo y crecimiento de las plantas, produciendo sustancias promotoras del crecimiento vegetal, al igual que antibióticos y sideróforos que evitan infecciones ocasionadas por fitopatógenos, activando varias respuestas a nivel bioquímico, fisiológico y morfológico de la planta (Amado Rodríguez, 2021; Camelo *et al.*, 2011).

Estos microorganismos aumentan la biodisponibilidad de nutrientes mediante la fijación de nitrógeno y la movilización de nutrientes clave (fósforo, potasio, hierro) para las plantas del cultivo, al tiempo que remedian la estructura del suelo mejorando su agregación y estabilidad para los procesos de restauración de suelos degradados (Rashid *et al.*, 2016).

#### 4.1. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs).

Las bacterias capaces de colonizar las raíces de las plantas son atraídas por sustancias excretadas por la raíz, que ocasionan el movimiento de la bacteria hacia el rizoplasma de la planta, de esta forma se da inicio a una relación de beneficio mutuo. Estas bacterias son denominadas "rizobacterias", son ampliamente conocidas como PGPR destacadas por mejorar, no sólo el rendimiento de diversos cultivos, sino también la calidad en cuanto a nutrientes y compuestos

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

provenientes del metabolismo secundario, siendo capaces de establecer relaciones benéficas contribuyendo al control biológico de fitopatógenos y mejorar el crecimiento de las plantas (Camelo *et al.*, 2011). Sin embargo, estas interacciones están influenciadas por muchos parámetros bióticos y abióticos como son el uso de agroquímicos que generan contaminación y acumulación de sustancias tóxicas en la cadena trófica.

Se han descrito principalmente a los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* como grupos predominantes de bacterias en los suelos agrícolas que tienen la capacidad de colonizar las raíces de las plantas, estimular el crecimiento vegetal con la producción de fitohormonas y sideróforos, solubilizando y movilizándolo el fósforo, además pueden utilizarse como bioplaguicidas debido a la producción de antibióticos que inducen la resistencia sistémica vegetal a patógenos; estas bacterias pueden desempeñar ambas funciones a la vez (Kumar *et al.*, 2011). Igualmente se ha informado actividad PGPR en cepas pertenecientes a varios otros géneros, como como *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Hydrogenophaga*, *Enterobacter*, *Serratia* (Benizri *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2011).

Como fuente natural, se han comprobado que los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* están presentes en diversos cultivos como trigo, papa, arroz, soya, café entre otros (Restrepo-Franco *et al.*, 2018; Tejera-Hernández *et al.*, 2011). Hoy en día se viene estudiando el efecto de dichos microorganismos en otros cultivos de importancia económica entre ellos la quinua, no solo por ser PGPR sino por su capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos fitopatógenos estimulando la producción de diversas sustancias con actividad microbicida (Benizri *et al.*, 2001; Camelo *et al.*, 2011).

### **4.2. Solubilización del fósforo y fijación de nitrógeno.**

La productividad y dinámica de los suelos está limitada a la disponibilidad de nutrientes, por lo tanto los microorganismos son importantes para la absorción eficiente de una gama amplia de macro y micronutrientes especialmente el nitrógeno (N) y el fósforo (P), ya que para las plantas la disponibilidad de estas dos fuentes es clave por que determinan el crecimiento vegetal y limitan la producción agrícola sostenible en diversos cultivos (Richardson *et al.*, 2009).

Los mecanismos básicos a través de los cuales las bacterias y los hongos promueven la biodisponibilidad de nutrientes incluyen la fijación de nitrógeno y la movilización de fósforo a

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

través de la producción de ácidos orgánicos, sideróforos, organopolisacáridos y proteínas (mucílagos e hidrofobinas) que ayudan a promover la estabilidad de los agregados del suelo (Rashid *et al.*, 2016).

### 4.2.1 Solubilización de fósforo en los suelos.

En el suelo se puede encontrar dos formas de fosfatos, orgánico e inorgánico. De estos, una gran proporción se encuentra presente en formas insolubles que las plantas no pueden aprovechar (Richardson *et al.*, 2009). Las bacterias dinamizan el fósforo del suelo convirtiéndolo de fosfato insoluble (tanto orgánico como inorgánico) a formas accesibles para las plantas, tal como el ortofosfato predominantemente como ión  $\text{HPO}_4^{-2}$  (monoácido) o  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (diácido), siendo este último la forma más predominante en suelos ácidos (Richardson *et al.*, 2009; Richardson & Simpson, 2011).

El fosfato inorgánico que se encuentra en el suelo en su mayoría es insoluble y se encuentra formando complejos minerales que aparecen luego de la fertilización química (Rodríguez *et al.*, 2006). El fósforo orgánico requiere de un proceso de mineralización de sustratos por acción de enzimas fosfatasas reguladas por la demanda de este nutriente y pueden ser producidas por las plantas o microorganismos (Richardson & Simpson, 2011). La disponibilidad del fósforo en la rizósfera está influenciada por los cambios en el pH y los exudados de las raíces que pueden afectar la disponibilidad de los nutrientes (Hinsinger, 2001).

En los suelos, las bacterias solubilizadoras de fosfato constituyen de 1% a 50% y los hongos de 0,1% a 0,5 % del total, de esta forma, las bacterias solubilizadoras superan en número a los hongos de 2 a 150 veces. Algunos microorganismos reportados con capacidad solubilizadoras de fosfato en los suelos son bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Pantoea*, *Achromobacter* y *Enterobacter* y hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (Beltrán Pineda, 2015). Los requerimientos de fósforo para un crecimiento óptimo en planta, fluctúa entre 0.3 a 0.5% de su masa seca, la baja disponibilidad de este a menudo limita el crecimiento de las plantas (de Mello Prado, 2021; M. T. Fernández, 2007). La cantidad de fósforo solubilizado en un cultivo depende de la composición del medio y la forma de precipitado inorgánico utilizado (incluidos los fosfatos de calcio, hierro y aluminio y diversas fuentes de fosfato de roca), junto con los procedimientos del cultivo (M. T. Fernández, 2007).



## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

### 4.2.2 Fijación del Nitrógeno en los suelos.

La dinámica del nitrógeno en la biosfera comprende principalmente la fijación de nitrógeno ( $N_2$ ), la mineralización, la nitrificación, la desnitrificación y la oxidación anaeróbica del amonio, estos procesos son mediados principalmente por bacterias presentes en el suelo (Cerón R. & Aristizábal G., 2012).

Los procesos de fijación del nitrógeno (N) los llevan a cabo gran variedad de bacterias, ya que los hongos no fijan nitrógeno, pero proporcionan nutrientes a las bacterias para la fijación. Además, en el micelio, los hongos brindan refugio al sistema enzimático bacteriano del  $O_2$  para fijar nitrógeno (Rashid *et al.*, 2016). Las bacterias poseen enzimas nitrogenasas, que rompen el triple enlace del  $N_2$  atmosférico y producen el ion asimilable amonio ( $NH_4^+$ ), el cual influye en el comportamiento de las raíces y la dinámica de la rizosfera (Mayz-Figueroa, 2004).

Las bacterias diazótroficas puede ser simbióticas obligadas como los géneros *Rhizobium* y *Frankia*, y asociativas o endófitas representadas por *Cyanobacteria*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Azoarcus*; y de vida libre como *Achromobacter*, *Acetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Azomonas*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Derxia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas* y *Xanthobacter* (Cerón R. & Aristizábal G., 2012; Rashid *et al.*, 2016). Dichas bacterias mejoran el crecimiento de las plantas al proporcionar nitrógeno a la planta, además de que producen fitohormonas (auxinas, citoquininas y giberelinas) y otras moléculas antimicrobianas para proteger los cultivos de enfermedades (Velasco-Jiménez *et al.*, 2020).

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

### Objetivos

#### Objetivo General

Evaluar la capacidad biocontroladora de bacterias solubilizadoras de fosfato y fijadoras de nitrógeno, *Trichoderma asperellum* y de aceites esenciales de tomillo y orégano sobre microorganismos fitopatógenos aislados a partir de cultivos de quinua del departamento de Boyacá.

#### Objetivos específicos.

1. Aislar e identificar bacterias solubilizadoras de fosfato y fijadoras de nitrógeno presentes en suelos cultivados con quinua del municipio de Oicatá, Boyacá.
2. Evaluar la capacidad biocontroladora de bacterias solubilizadoras de fosfato y fijadoras de nitrógeno contra hongos fitopatógenos asociados a cultivos de quinua del departamento de Boyacá.
3. Evaluar la capacidad biocontroladora de *Trichoderma asperellum* para el control de hongos fitopatógenos asociados a cultivos de quinua del departamento de Boyacá.
4. Evaluar la capacidad bactericida de aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) para el control de bacterias fitopatógenas asociadas a cultivos de quinua del departamento de Boyacá.

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

### Aislamiento e Identificación de Bacterias Funcionales del Cultivo de Quinua.

#### 1. Muestras de Suelo

Las muestras de suelo fueron tomadas de un lote cultivado con quinua, ubicado en el municipio de Oicatá de coordenadas 5°35'58.1"N y 73°18'17.4"W, se recolectaron mínimo 10g de suelo rizosférico a 10 cm de profundidad en cuatro puntos seleccionados utilizando un patrón de recorrido en zig-zag. La tabla 3 muestra factores climáticos, temperatura promedio, humedad relativa (%) y temperatura del suelo, tomados en los cuatro puntos de muestreo seleccionados del cultivo; estos fueron obtenidos mediante un equipo GPS y un termohigrómetro.

**Tabla 3.** Factores climáticos de los puntos de muestreo en el cultivo de quinua.

Factores Climáticos	Punto 1	Punto 2	Punto 3	Punto 4
Humedad relativa %	54%	52%	28%	48%
Temperatura Suelo (°C)	22°C	22°C	19°C	18°C
Temperatura Ambiente promedio:	29.7°C			

Fuente: Autor.

#### 2. Aislamiento de Bacterias Funcionales del Suelo (Solubilizadoras de Fosfato y Fijadoras de Nitrógeno)

Para el aislamiento e identificación de bacterias solubilizadoras de fosfato se suspendieron 10 g de suelo en 90 ml de solución salina (S/S) al 1% para ajustar concentración de  $10^{-1}$ , las muestras de suelo se diluyeron en serie hasta  $10^{-5}$ , se sembraron 0,1mL por duplicado las diluciones  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ , en medio NBRIP (Protocolo de preparación Anexo B), se incubaron a  $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , realizando revisiones diarias por 7 días hasta que se observaron halos de solubilización. Se realizó recuento de colonias de microorganismos solubilizadores de fosfato (Beltrán Pineda & Castellanos Roza, 2016).

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

Para la identificación de bacterias asimbióticas fijadoras de nitrógeno, se suspendieron 10 g de suelo en 90 ml de S/S al 1% para ajustar concentración de  $10^{-1}$ , las muestras de suelo se diluyeron en serie hasta  $10^{-4}$  y se sembraron por duplicado 0,1mL de todas las diluciones, en medio agar alcalino libre de nitrógeno (Protocolo de preparación Anexo C). Se incubaron a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 8 a 15 días. Se realizó revisión de colonias con apariencia translúcida y mucoide de acuerdo a la norma ICONTEC 4092 (Norma Técnica Colombiana NTC 4092, 2009). Se aplicó la fórmula:

$$N = \frac{\sum c}{V*1,1*d}$$

Donde:

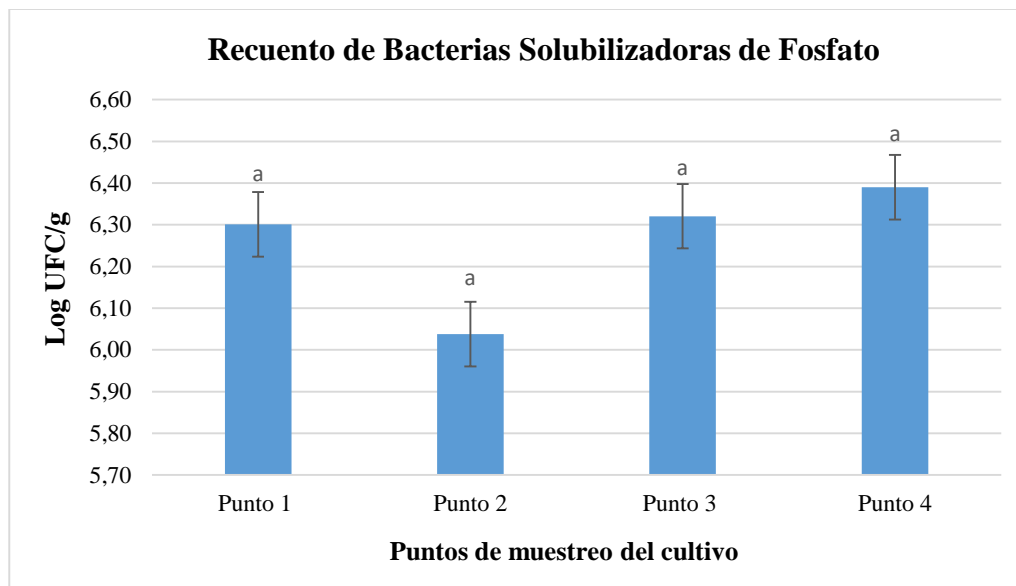
$\sum$  = es la suma del número de colonias de las cajas conservadas provenientes de dos disoluciones sucesivas, que estén dentro del rango 10 – 300 UFC.

V = es el volumen de inóculo, puesto en la caja en mL.

d = es la dilución correspondiente a la primera dilución retenida o seleccionada para hacer el recuento.

Para el análisis estadístico se realizó un T – Student, donde se determinó que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las densidades poblacionales (UFC/g) de bacterias solubilizadoras de fosfato en cada punto muestreado. Se normalizaron los datos, se trabajó con un nivel de significación de  $p < 0,05$  (nivel de confianza del 95%). El análisis muestra un valor ( $p > 0,05$ ) lo que indica que, no existen diferencias estadísticamente significativas entre densidad poblacional entre los 4 puntos de muestreo como se observa en la gráfica 1.

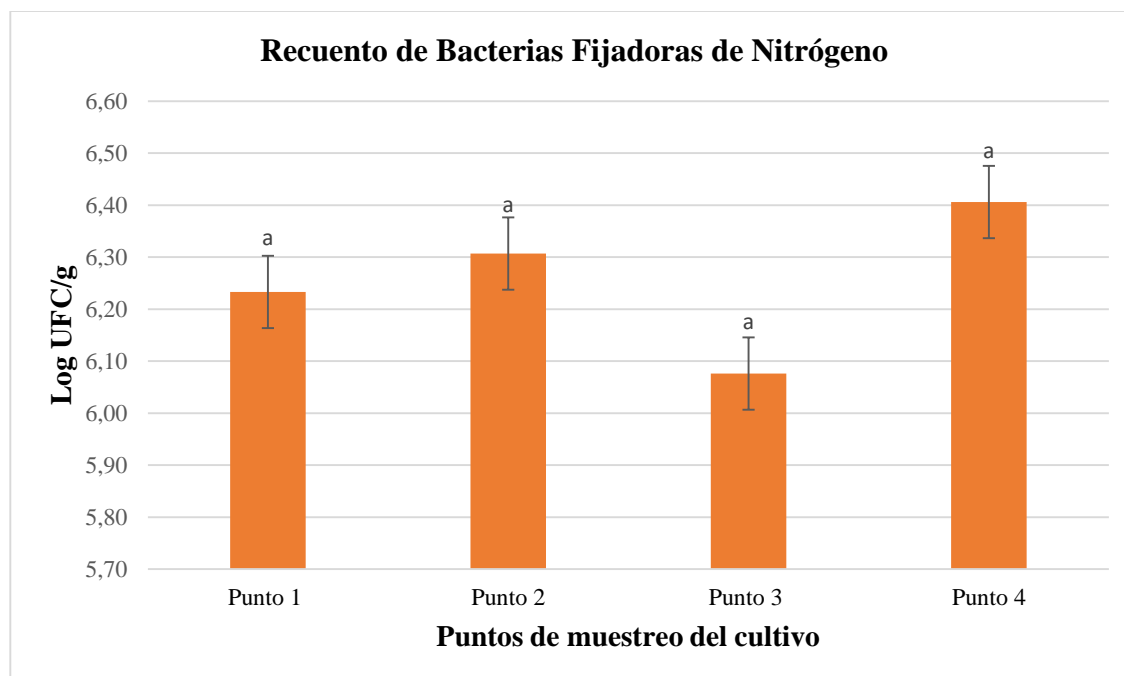
## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA



**Gráfica 1.** Recuento de bacterias solubilizadores de fosfato, se obtuvieron colonias blancas y amarillas mucoides, presentes en los 4 puntos de muestreo, Fuente autor.

Para el análisis estadístico se realizó un T – Student, donde se determinó que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las densidades poblacionales (UFC/g) de bacterias asimbióticas fijadoras de nitrógeno en cada punto muestreado. Se normalizaron los datos, se trabajó con un nivel de significación de  $p < 0,05$  (nivel de confianza del 95%). El análisis muestra un valor ( $p > 0,05$ ) lo que indica que, no existen diferencias estadísticamente significativas entre densidad poblacional entre los 4 puntos de muestreo como se observa en la gráfica 2.

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA



**Gráfica 2.** Recuento de bacterias asimbióticas fijadoras de nitrógeno con apariencia translúcida y mucoide, presentes en los 4 puntos de muestreo, Fuente autor.

Se logró el aislamiento de bacterias funcionales a partir de los puntos muestreados encontrándose una mayor cantidad de UFC fijadoras de nitrógeno. En el trabajo publicado por Chumpitaz-Segovia y colaboradores (2020), buscando la bioprospección las bacterias psicotolerantes nativas de la rizosfera de quinua en Perú, buscando microorganismos promotores de crecimiento vegetal (PGPRS). Se lograron aislar identificaron beta y gammaproteobacterias, de 51 cepas tres (*Pseudomonas silesiensis* y *P. plecoglossicida*), resultaron ser no patógenas con actividad PGPRS, cepas que presentaron producción de IAA (ácido indol acético), solubilización de fosfato, crecimiento en un medio libre de nitrógeno y producción de desaminasa, se demostró que las cepas presentaron efectos significativamente positivos en los índices de desarrollo vegetal tanto en órganos vegetales como radiculares (Chumpitaz-Segovia *et al.*, 2020). Los autores reportan el potencial de cepas psicotolerantes asiladas del cultivo para ser utilizadas como potenciales biofertilizantes orgánicos para la quinua, este mismo reporte fue hecho por Yañez-Yazlle y colaboradores (2021), quienes caracterizaron bacterias halotolerantes para evaluar su potencial como PGPRS en plántulas de chíá y quinua sometidas a estrés salino. Los microorganismos aislados se evaluaron para la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfato y la producción de sideróforos y IAA, se

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

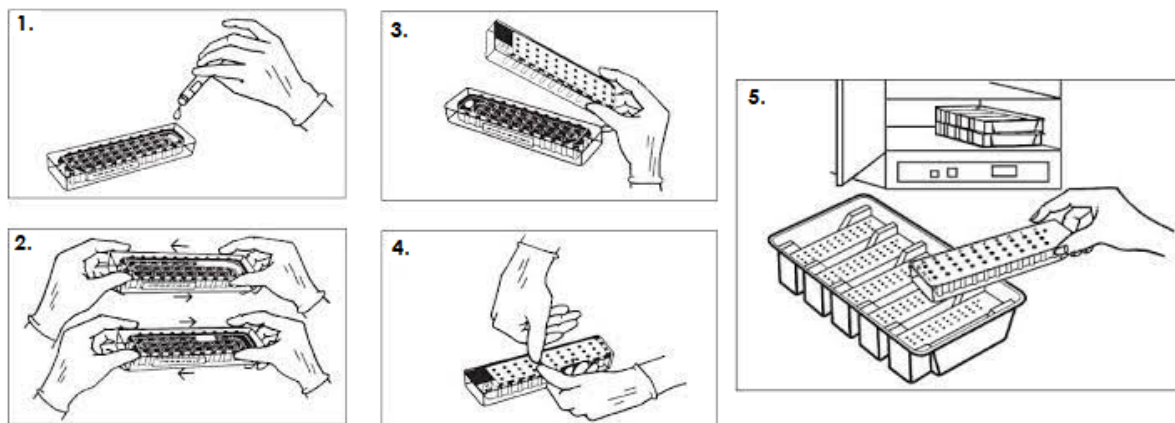
reportó una cepa de *Bacillus* sp. HX11, con múltiples rasgos de promoción del crecimiento de las plantas y tolerancia al estrés salino, tiene un gran potencial como bioinoculante en condiciones salinas por lo que también podría usarse como biofertilizante para la producción de cultivos (Yañez-Yazlle *et al.*, 2021).

### 3. Método de Identificación Bioquímica de Bacterias Mediante BBL Crystal ID

La identificación de las cepas previamente aisladas se realizó de acuerdo con las instrucciones de la casa fabricante, para esto se sembraron en agar nutritivo por 24 horas a 37°C. Se tomó el inóculo y se suspendió una colonia en un tubo de fluido de inóculo BD BBL Crystal, el tubo se agitó en vórtex y se vertió todo el contenido del inóculo en el área objetivo de la base, se movió el inóculo suavemente de un lado para otro a lo largo de la bandeja hasta que llenaron todos los pocillos. Se colocó la base en la parte superior de la bandeja, los paneles inoculados se incubaron a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 horas (figura 1). Después del período de incubación, se leyeron los paneles utilizando una lámpara de luz teniendo en cuenta la tabla de colores de la reacción y/o el apartado de “Reactivos” para interpretar las reacciones; se le asignaron valores de 4, 2, o 1, correspondiendo a la fila donde está ubicado el análisis. Se asignó un valor de 0 (cero) a cualquier resultado negativo. Después se sumaron los números (valores) resultantes de cada reacción positiva en cada columna. Se generó un número de 10 dígitos; éste es el número de perfil. El número de perfil resultante se introdujo en el programa del sistema BD BBL Crystal ID que contienen el libro de códigos electrónico para obtener la identificación de las bacterias (Becton Dickinson and Company, 2015).

El valor de confianza emitido por la base de datos BBL Crystal es una medida de comparación entre la probabilidad de una determinada especie que contiene un patrón de reacción específica con otras especies. Este valor de confianza es tomado para la selección del microorganismo siempre y cuando los valores sean elevados cercanos a uno, un valor de confianza bajo para identificación es  $<0.80$ , produciendo una identificación inaceptable. Por lo tanto, se debe tener en cuenta la estadística del valor de biotipo y confirmar la pureza del cultivo, así como realizar pruebas confirmativas adicionales para establecer una identificación aceptable (Becton Dickinson and Company, 2015).

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA



**Figura 1.** Principios del procedimiento para el análisis en el sistema BD BBL Crystal, Fuente: Becton Dickinson and Company. (2015). *BBLTM CrystalTM Identification Systems, Enteric/Nonfermenter ID Kit* (pp. 1–39). [https://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/8809241JAA\(02\).pdf](https://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/8809241JAA(02).pdf)

Después del análisis, el software MALDI Biotyper 2.0 (Bruker Daltonics, Leipzig, Alemania) proporciona no solo el resultado de identificación sino también el grado de confianza de dicha identificación

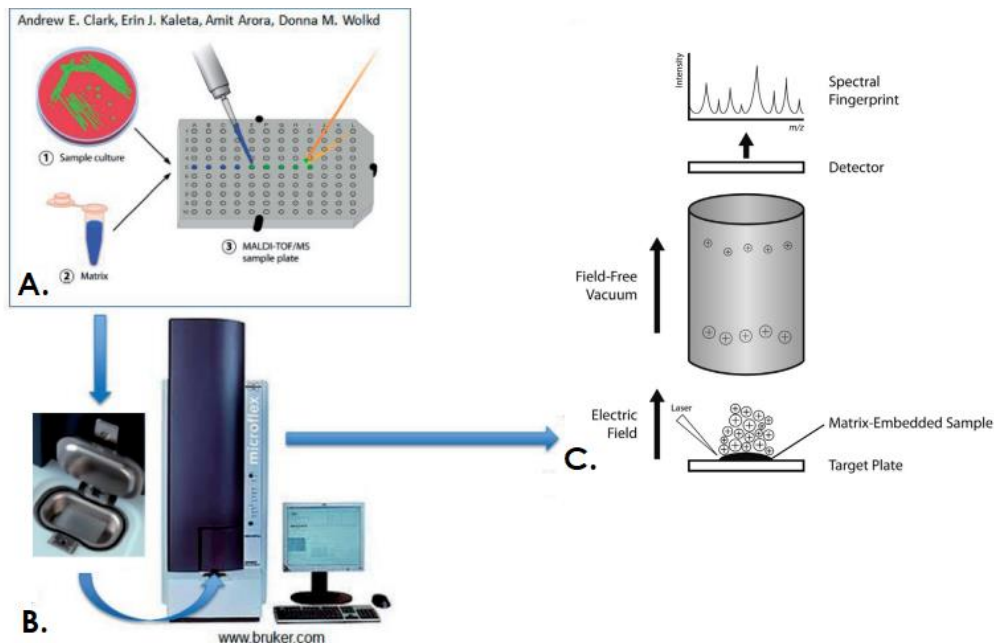
### 4. Técnica de Espectrometría de Masas MALDI-TOF para la Identificación de Bacterias.

Con el objeto de conseguir una mejor identificación de las cepas, las mismas fueron identificadas mediante análisis proteómico por la técnica MALDI-TOF de acuerdo con el protocolo previamente estandarizado en el Laboratorio de Investigación en Proteómica y Miosis Humanas de la Pontificia Universidad Javeriana y reportado por Fonseca-Guerra *et al.* (2021) (Fonseca-Guerra *et al.*, 2021). La extracción de proteínas se realizó de manera directa, las bacterias fueron previamente aisladas en agar nutritivo con un crecimiento menor a las 48 horas, por duplicado se tomó una colonia única la cual fue colocada en la placa metálica conductora, se adicionó 1  $\mu$ L de ácido fórmico y una vez secos los pocillos se le adiciono una solución de matriz (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA); ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ácido sinapínico, SA) y ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB)). Posteriormente fueron enviadas al laboratorio mencionado de la PUJ e identificadas en el equipo Bruker Daltonik MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Billerica, MA) para su identificación.



## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

El espectrómetro de masas tiene 3 elementos principales: la fuente de ionización, el analizador y el detector. En el caso de MALDI-TOF, la fuente de ionización es un láser ultravioleta con longitud de onda de 337nm, que produce la desorción e ionización de la muestra con la ayuda de una matriz orgánica. Para ello, la muestra analizada se mezcla con la matriz orgánica fotosensible, se deposita sobre una placa metálica y se deja secar al aire libre unos minutos. La placa tiene 96 pocillos, por lo tanto, permite estudiar 96 muestras distintas en un solo análisis. A continuación, la placa se introduce en el equipo (Figura 2). El papel fundamental de la matriz es absorber y después, transmitir la energía del láser a la muestra, facilitando su ionización. La matriz compuesta de un ácido orgánico más utilizada en laboratorios es el ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-trans-cinámico (CHCA) (Zboromyrska, 2014).



**Figura 2.** Técnica MALDI-TOF para análisis de bacterias aisladas en un medio de cultivo. A. La muestra se deposita en uno de los pocillos de la placa metálica y se cubre con 1  $\mu$ L de la matriz. B. La placa se introduce en el equipo MALDI-TOF. C. Principio de MALDI-TOF para la identificación microbiana, Fuente: Dingle, T. C., & Butler-Wu, S. M. (2013). MALDI-TOF Mass Spectrometry for Microorganism Identification. *Clinics in Laboratory Medicine*, 33(3), 589–609. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2013.03.001>.

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

El método de identificación mediante MALDI-TOF se basa en análisis del espectro proteico específico de un organismo, la huella dactilar se genera y se compara con miles de perfiles espectrales en una base de datos para obtener una identificación del organismo. Después del análisis, el software MALDI Biotyper 2.0 (Bruker Daltonics, Leipzig, Alemania) proporciona no solo el resultado de identificación sino también el grado de confianza de dicha identificación (Figura 3) (Dingle & Butler-Wu, 2013; Zboromyrska, 2014).

Range	Description	Symbols	Color	
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+++)	green	→
2.000 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(++)	Green	A
1.700 ... 1.999	probable genus identification	(+)	yellow	→ B
0.000 ... 1.699	not reliable identification	(-)	red	→ C

**Figura 3.** Niveles de confianza de la lectura prueba MALDI – TOF. A, identificación fiable a nivel tanto de género como de especie (“score value”  $\geq 2$ ); B, identificación fiable a nivel de género (“score value” 1,7-2); C, identificación poco fiable (“score value”  $<1,7$ ). Elaborado por: autor, estos datos son proporcionados por el software Bruker Daltonics en el proceso de identificación.

Los resultados obtenidos permitieron la identificación de un total de 29 cepas bacterianas recuperadas y aisladas de cultivos ubicados en el Departamento de Boyacá, 15 cepas identificadas como funcionales (solubilizadoras de fosfato y fijadoras de nitrógeno) obtenidas del cultivo de quinua de Oicatá y 14 cepas recuperadas de otros cultivos previamente aisladas en el laboratorio de investigaciones de la Universidad de Boyacá a partir de tejido foliar y radicular. La tabla 4 muestra los resultados de identificación utilizando los dos métodos y su comparación.

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

**Tabla 4.** Comparación de resultados de identificación de bacterias por el método espectrometría de masas MALDI-TOF y BBL Crystal ID.

CEPA	ID MALDI TOF	Score	ID BBL CRYSTAL	Confianza
1	<i>Pantoea agglomerans</i>	1.995	<i>Pantoea agglomerans</i>	0.80
2	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1.754	Sin ID	
3	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1.745	<i>Micrococcus sedentarius</i>	0.65
4	<i>Pantoea ananatis</i>	1.905	<i>Panthoea agglomerans</i>	0.76
5	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1.832	Sin ID	
6	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	2.112	Sin ID	
7	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1.71	Sin ID	
8	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1.814	Sin ID	
9	<i>Pantoea ananatis</i>	2.114	<i>Enterobacter zakazakii</i>	0.58
10	<i>Pantoea agglomerans</i>	1.746	Sin ID	
11	<i>Serratia liquefaciens</i>	2.009	Sin ID	
12	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	2.017	Sin ID	
13	<i>Lelliottia amnigena</i>	2.174	<i>Enterobacter zakazakii</i>	0.51
14	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1.897	Sin ID	
15	<i>Serratia liquefaciens</i>	1.954	Sin ID	
16	<i>Lelliottia amnigena</i>	2.16	Sin ID	
17	<i>Serratia grimesii</i>	2.03	Sin ID	
18	<i>Pseudomonas poae</i>	1.962	Sin ID	
19	<i>Serratia liquefaciens</i>	1.815	<i>Serratia plymuthica</i>	0.76
20	<i>Pantoea agglomerans</i>	2.144	<i>Pantoea agglomerans</i>	0.81
21	<i>Pseudomona fluorescens</i>	1.985	Sin ID	
22	<i>Erwinia persicina</i>	1.839	Sin ID	
23	<i>Pseudomona fluorescens</i>	1.916	<i>Pseudomona fluorescens</i>	0.84
24	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	2.017	Sin ID	
25	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1.775	<i>Pseudomona fluorescens</i>	0.82
26	<i>Serratia liquefaciens</i>	2.15	<i>Pseudomona fluorescens</i>	0.68
27	<i>Pantoea agglomerans</i>	1.9	<i>Hafnia alvei</i>	0.62
28	<i>Pantoea agglomerans</i>	2.206	Sin ID	
29	<i>Pantoea agglomerans</i>	1.992	<i>Pantoea agglomerans</i>	0.86

Fuente: Autor.

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

Comparando los métodos para identificación de bacterias utilizados se evidencia que por el método MALDI TOF, 11 cepas (37,9%) identificadas presenta un score  $\geq 2$  lo que indica confiabilidad tanto a nivel de género como de especie y 18 cepas (62%) se identificaron con un score de 1,7 - 2 que indica confiabilidad a nivel de género. Por el método bioquímico BBL Crystal solo se lograron identificar 12 cepas que corresponden a 41,4% del total de las identificaciones (29 cepas), los niveles de confianza son bajos  $<0.80$  lo que indica una identificación inaceptable para confirmación de la identificación. Los dos métodos coincidieron en 5 cepas a nivel de género y especie que corresponde a 17,4 % y 7 de las cepas coinciden en cuanto a nivel de género lo que corresponde a un 24,13%. Es necesario tener en cuenta que los métodos de identificación por paneles automatizados no cuentan con una amplia biblioteca de microorganismos ambientales.

La identificación de bacterias se realiza habitualmente a través de estudios morfológicos, cultivo en medios cromogénicos, métodos comerciales basados en la asimilación de hidratos de carbono o mediante métodos automatizados; los análisis utilizados en el sistema BD BBL Crystal, están basados en la utilización y degradación de sustratos específicos por parte de los microorganismos detectados por distintos sistemas indicadores, estas metodologías presentan como inconvenientes su lentitud, la existencia de bases de datos limitadas y algunas identificaciones incorrectas (Relloso *et al.*, 2015).

En los últimos años se viene accediendo más fácilmente a diversas tecnología y plataformas comerciales como la espectrometría de masas, conocida como matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), que es una técnica utilizada en la identificación de microorganismos mediante la creación de un espectro basado en el perfil de proteínas, que es único para una especie dada. Este método es confiable, específico y rápido para la identificación de bacterias, micobacterias y hongos basado en el perfil de proteínas (Relloso *et al.*, 2015), como se evidencia en los resultados.

El análisis con los diferentes métodos permitió identificar los géneros bacterianos: *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Lelliottia*, *Pseudomonas* y *Erwinia*. En la tabla 5 se muestran los porcentajes del total de las 29 cepas identificadas por el método MALDI TOF, el 27,6% corresponden a los géneros: *Pantoea* y *Acinetobacter*; el 17,2% a los géneros: *Serratia* y *Pseudomonas*; el 6,9% al género *Lelliottia* y el 3,4% al género *Erwinia*. Estos resultados indicarían la capacidad que poseen estos géneros que habitan en la rizósfera para solubilizar

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

fosfato y fijar nitrógeno, lo cual les permite ser consideradas como bacterias promotoras del crecimiento vegetal, además de su utilidad como organismos biocontroladores, posterior a su discriminación entre patógenas y no patógenas ya que de los géneros hallados diversas especies pueden ser tanto perjudiciales como PGPRS.

**Tabla 5.** *Porcentaje de cepas de cada género identificación por el método MALDI TOF.*

<b>Genero Bacteriano</b>	<b>Porcentaje (%) de ID</b>
<i>Pantoea</i>	27.6
<i>Acinetobacter</i>	27.6
<i>Serratia</i>	17.2
<i>Pseudomonas</i>	17.2
<i>Lelliottia</i>	6.9
<i>Erwinia</i>	3.4

Fuente: Autor.

En el presente trabajo, se destaca que el grupo dominante es el filo Proteobacterias, Clase Gammaproteobacteria, y los géneros *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y *Serratia*, fueron encontrados, asociados al suelo cultivado con quinua. Sin embargo, existen pocos reportes de *Pantoea*, como endófito residente del cultivo de quinua (Fraile *et al.*, 2021), se han reportado aislados de bacterias del suelo rizosférico fértil, suelo no rizosférico fértil, suelo rizosférico degradado y suelo no rizosférico degradado de cultivos de quinua con *P. agglomerans* (Bowles *et al.*, 2014; van Diepeningen *et al.*, 2006). Así mismo para este género se reportado que el cultivo a largo plazo en suelos contaminados con metales pesados cambia la composición de endófitos en las semillas de la hierba perenne *Agrostis capillaris*, cepas aisladas de semillas resistentes al Cd seleccionadas aumentan la absorción de este metal cuando se vuelven a inocular en huéspedes expuestos al Cd por lo que han sido postuladas en fitorremediación (Truyens *et al.*, 2014). En cuanto a los reportes de bacterias benéficas asociadas al cultivo, pese a que son escasos, se han identificado molecularmente algunas especies del género *Bacillus*, ampliamente reportado, sin embargo no fue aislado en la presente investigación (Ortuño *et al.*, 2014). Y como fitopatógenas las del género *Pseudomonas* (Ortuño *et al.*, 2014). De acuerdo con Mahdi y Colaboradores (2021) la introducción de la quinua fuera de sus áreas tradicionales de cultivo, la expuso a la extinción de las plántulas, los autores aislaros once bacterias

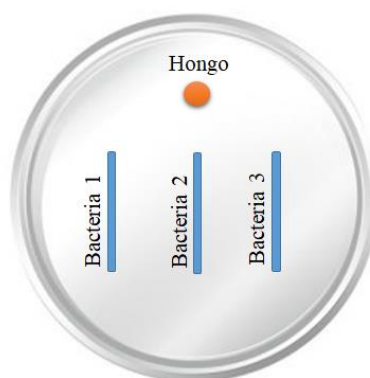
**BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA**

solubilizadoras de fosfato de la rizosfera de quinua y evaluaron su efecto sobre la germinación y el crecimiento de las plántulas (Mahdi *et al.*, 2021). Se reportó que todos los aislados correspondientes a *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Enterobacter*, solubilizaron fosfato, produjeron ácido indol-3-acético, ácido cianhídrico, sideróforos y amoníaco, la evaluación de índices de germinación, entre otros las postulan para ser usadas potencialmente como inoculantes para suelos contaminados con metales pesados y salados o zinc.

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

### Evaluación del Efecto Biocontrolador de Bacterias Contra Hongos Fitopatógenos del Cultivo de Quinua

Con el objeto de identificar cepas con potencial biocontrolador se enfrentaron las bacterias previamente identificadas con hongos asociados al cultivo de quinua en el departamento de Boyacá. Para la selección de las cepas, inicialmente se realizaron pruebas de antagonismo con 29 cepas bacterianas de los géneros *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Lelliottia*, *Erwinia* y *Pseudomonas*, contra 14 aislados fúngicos previamente aislados e identificados por el grupo de gestión ambiental de la Universidad de Boyacá, *Penicillium* sp. (morfortipo I), *Penicillium* sp. (morfortipo II), *Mucor* sp., *Rhizopus* sp., *Trichoderma asperellum*, *Aspergillus flavus*, *Alternaria alternata*, *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. incarnatum*, *F. cerealis*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *Trichoderma virens* (ATCC 9645). La metodología utilizada para este ensayo fue la empleada por Benítez y colaboradores (2007) y Méndez-Úbeda y colaboradores (2018), con algunas modificaciones. Se inocularon tres aislados bacterianos distintos en placas Petri con PDA haciendo tres líneas paralelas, cada una a 1cm de distancia del borde de la placa Petri y entre ellas. Posteriormente, se colocó un disco del micelio del hongo en la parte superior de la placa y se incubó a temperatura  $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , hasta observar algún efecto sobre el crecimiento del hongo (Figura 4). Cada prueba de antagonismo se repitió por duplicado, se realizaron controles de crecimiento bacteriano y fúngico de las diferentes especies evaluadas para el ensayo. La actividad inhibitoria se consideró positiva cuando se evidenció el crecimiento limitado o inexistente del hongo ensayado en dirección a la bacteria (Méndez-Úbeda *et al.*, 2018). Esto permitió identificar de las 29 cepas bacterianas cuales presentaron potencial antagónico contra los hongos de interés.



**BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA**

**Figura 4.** Esquema de la inoculación del hongo y las diferentes cepas bacterianas para ensayo antagónico, Fuente autor.

En los diferentes ensayos los géneros bacterianos *Serratia*, *Lelliottia*, *Erwinia* y *Pseudomonas* no mostraron actividad antagónica frente a los hongos evaluados, por lo cual se determinó realizar las pruebas de enfrentamiento con los géneros *Pantoea* y *Acinetobacter* que, si mostraron actividad antagónica y biocontroladora (Figura 5).



*Penicillium* sp. (Morfo tipo I)



*Penicillium* sp. (Morfo tipo II)



*Mucor* sp.



*Rhizopus* sp.



## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA



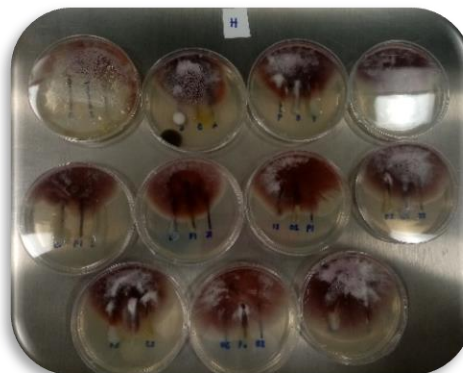
*Trichoderma asperellum*



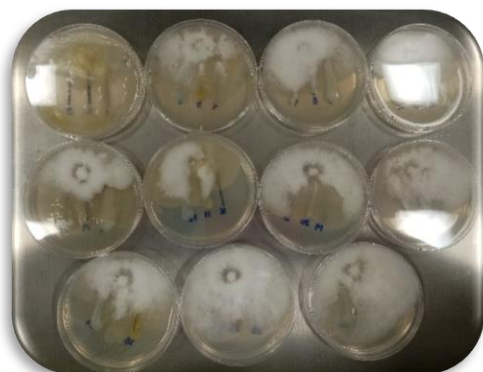
*Aspergillus flavus*



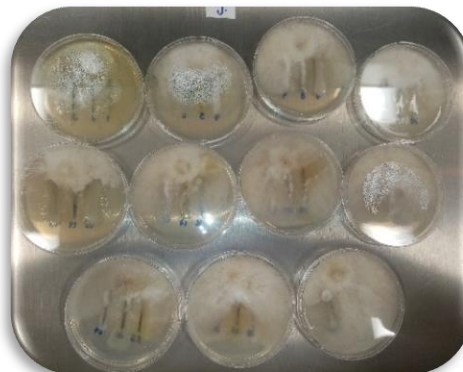
*A. alternata*



*F. oxysporum*

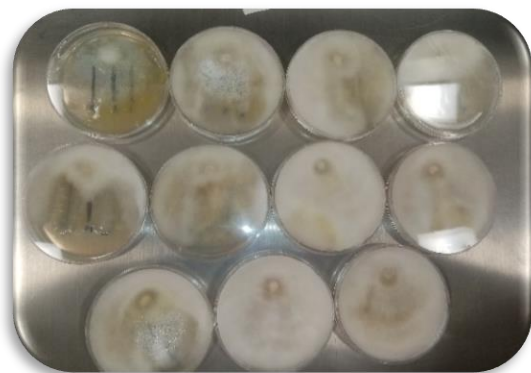
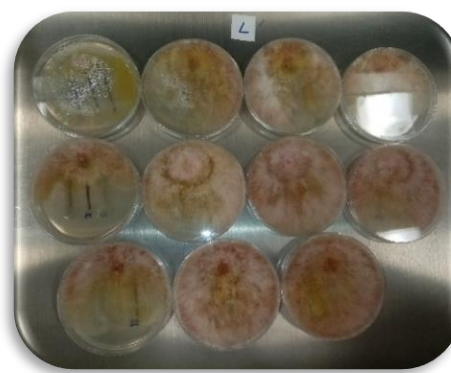
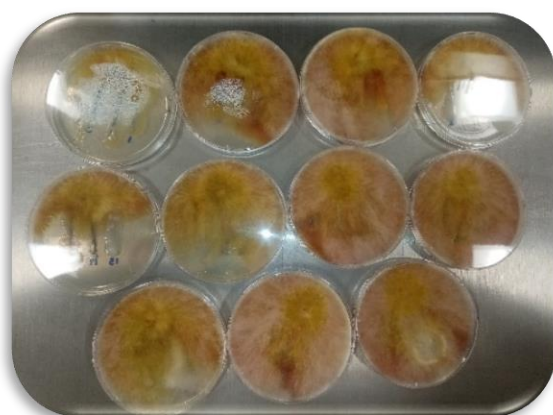


*F. equiseti*



*F. incarnatum*

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

*F. cerealis**F. graminearum**F. culmorum*

**Figura 5.** Resultados de las primeras pruebas de antagonismo in vitro, con 33 cepas bacterianas a evaluar inicialmente, Fuente autor.

Una vez seleccionadas se realizaron pruebas de enfrentamiento con 8 cepas bacterianas de los géneros *Pantoea* y *Acinetobacter* las cuales presentaron actividad antagónica contra los 14 aislados fúngicos funcionales y patógenos ya descritos. Para esta prueba los hongos se sembraron previamente en agar PDA suplementado con cloranfenicol 0.1g/L. Los aislados bacterianos se sembraron en caldo Mueller Hinton durante 24 horas, en condiciones de agitación en una incubadora orbital a 150 rpm y temperatura de  $27\pm^{\circ}\text{C}$ . La concentración bacteriana se ajustó tomando como referencia el tubo 0,5 de la escala Mc Farland que corresponde a  $1.5 \cdot 10^8$  UFC/mL (Bashan *et al.*, 1996; Rojas Badía *et al.*, 2017).

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

Las pruebas de enfrentamiento se realizaron en Agar Sabouraud Dextrosa, modificando el protocolo descrito por Bashan y colaboradores (1996) y Rojas y colaboradores (2017). Se colocó en extremos opuestos de la caja de Petri un disco de agar de 4 mm de diámetro con micelio de cada uno de los hongos, a una distancia de 6 cm aproximadamente entre ellos, posteriormente con un asa redonda se sembró una línea céntrica del inóculo bacteriano. Como control se enfrentaron discos de un mismo hongo por cada placa trazando la línea central con caldo de cultivo estéril. La incubación fue realizada a 27°C durante 7 días o hasta el crecimiento absoluto de los controles; el experimento se realizó por duplicado (Figura 6). Para la evaluación se midió el diámetro de crecimiento del hongo creciendo en presencia de la bacteria y del hongo sin la bacteria (control). Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento mediante la siguiente fórmula:

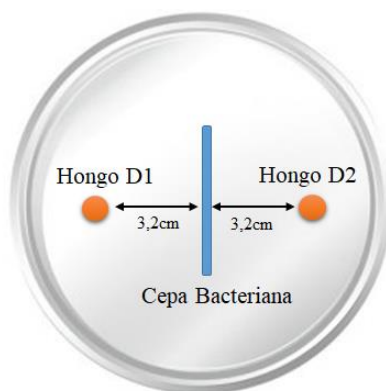
$$P.I = \left( \frac{D.C.C - D.C.P}{D.C.C} \right) * 100$$

donde:

**P.I** - Porcentaje de inhibición.

**D.C.C** - diámetro de la colonia control.

**D.C.P** - diámetro de la colonia problema (con bacteria).






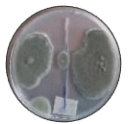





























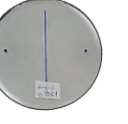





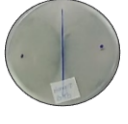
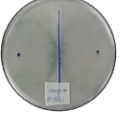




**Figura 6.** Esquema de prueba de enfrentamiento, inoculación del hongo por duplicado (D1 y D2) para evaluar el efecto antagonismo y porcentaje de inhibición de la cepa bacteriana, Fuente autor.

De las pruebas de enfrentamiento bacteria contra hongo se obtuvieron los resultados que se muestran a continuación en la tabla 6.

BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA





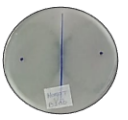
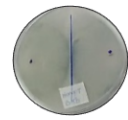



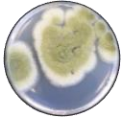
































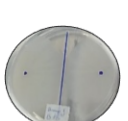

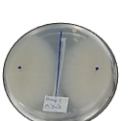









Tabla 6. Resultados pruebas de enfrentamiento entre cepas bacterianas vs hongos.

Hongo	Cepas bacterianas								
	Hongo Control	<i>P. ananatis</i>			<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>				
		<i>P. agglomerans</i>	Cepa 1	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4
<i>Penicillium sp. (I)</i>									
<i>Penicillium sp. (II)</i>									
<i>Mucor sp.</i>									
<i>Rhizopus sp.</i>									
<i>T. asperellum</i>									



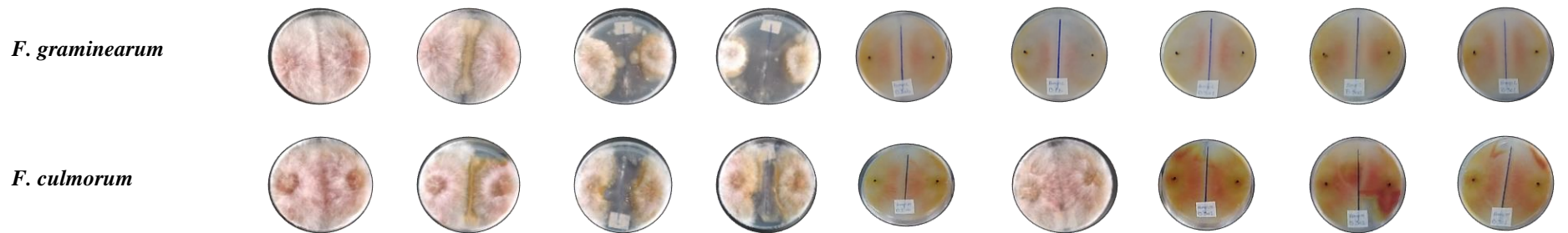
BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

---

<i>T. virens</i> ATCC 9645									
<i>A. flavus</i>									
<i>A. alternata</i>									
<i>F. oxysporum</i>									
<i>F. equiseti</i>									
<i>F. incarnatum</i>									
<i>F. cereales</i>									

---

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA



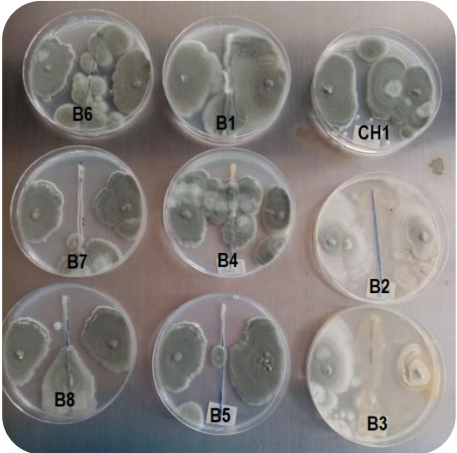
Fuente: Autor

Los resultados de la interacción antagónica de las cepas bacterianas que mostraron mayor actividad de inhibición, frente a hongos del complejo *Fusarium* y del género *Alternaria* considerados fitopatógenos, por la producción de micotoxinas, su oportunismo y su rol endofítico (Ramírez R. *et al.*, 2006), son las bacterias del género *Pantoea*. Se observaron y midieron los radios de inhibición, con los que se calculó que el porcentaje de inhibición (P.I). La cepa bacteriana *P. agglomerans* mostro porcentajes de inhibición entre 4,7% a 26,6%, mientras que, para *P. ananatis* el porcentaje de inhibición es mayor ente 17,2 % a 73,4 %, como se evidencia en la gráfica 3 y Figura 7.

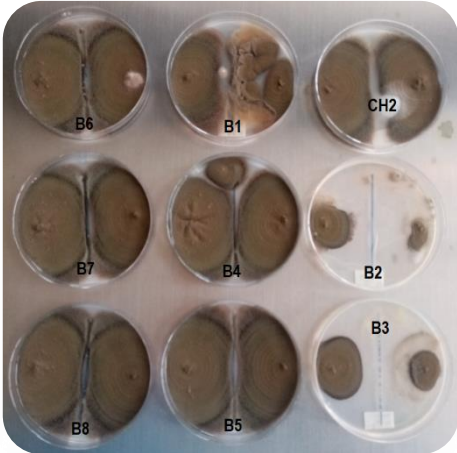
Las 8 cepas bacterianas analizadas, mostraron propiedades antagónicas contra los aislados fúngicos *A. aternata* y *F. oxysporum*, en comparación con los demás aislados analizados. Esto sugiere la presencia de metabolitos fungistáticos secretados por las bacterias, que suprimen el crecimiento de *A. aternata* en un 9.4% y 39.1% y *F. oxysporum*. en 6.3% y 37.5% respectivamente (Figura 7). La producción de metabolitos antifúngicos, la competencia por los nutrientes y el espacio pueden explicar la inhibición in vitro de dichos aislados (Yazici *et al.*, 2011).

BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

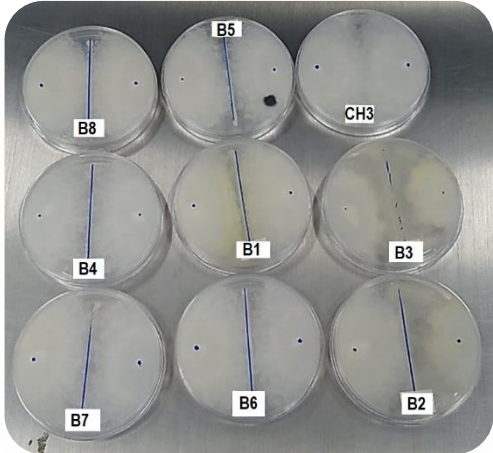
*Penicillium sp. (I)*



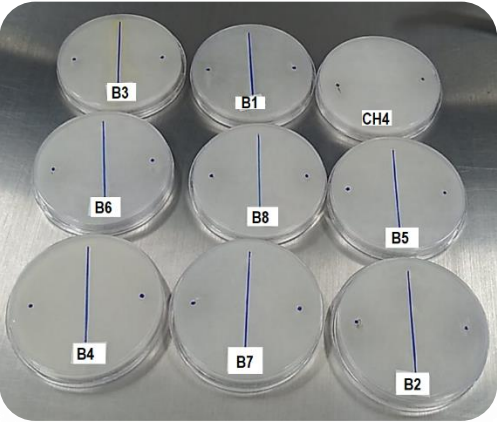
*Penicillium sp. (II)*



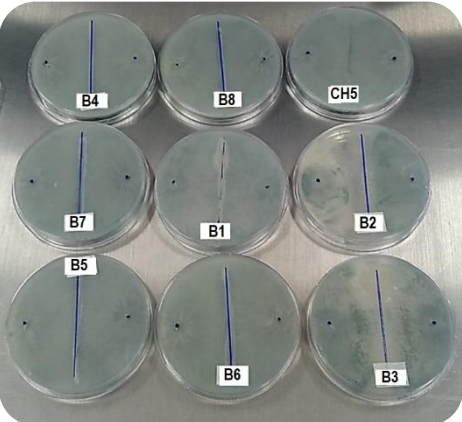
*Mucor sp.*



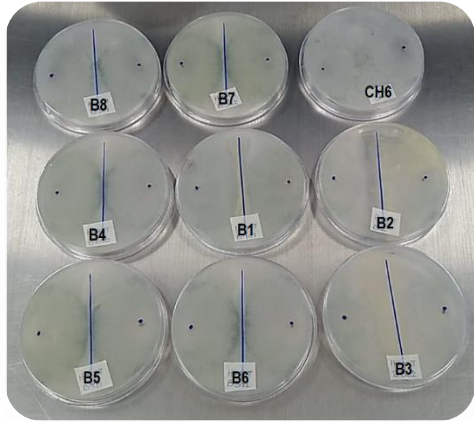
*Rizopus sp.*



*Trichoderma asperellum*



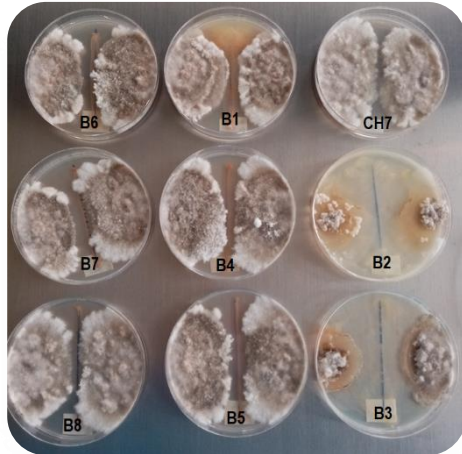
*Trichiderma virens (ATCC)*



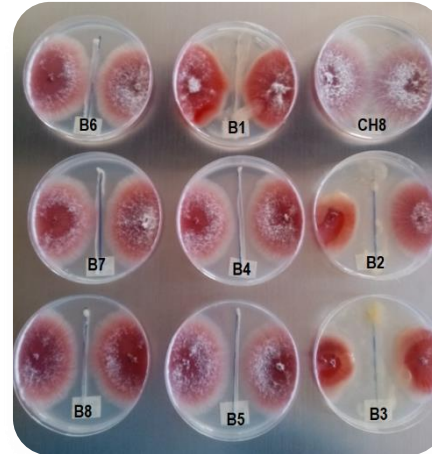


BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

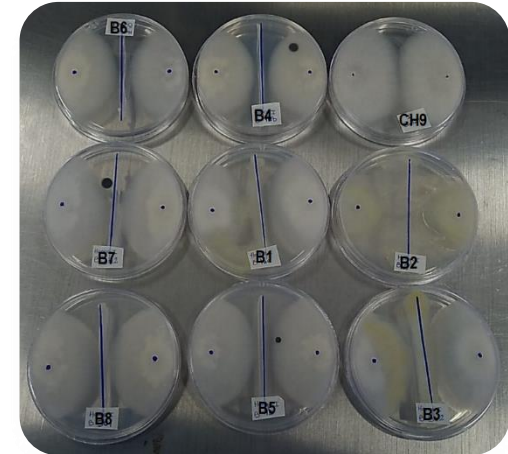
*Alternaria alternata*



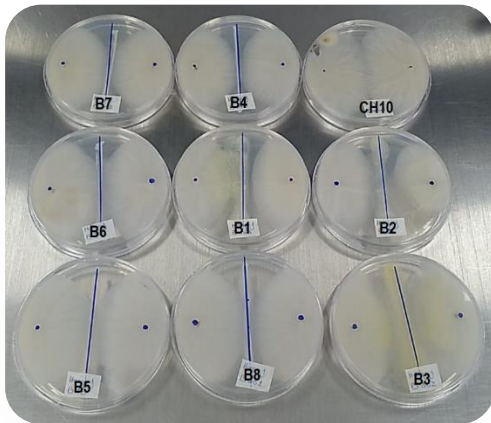
*F. oxysporum*



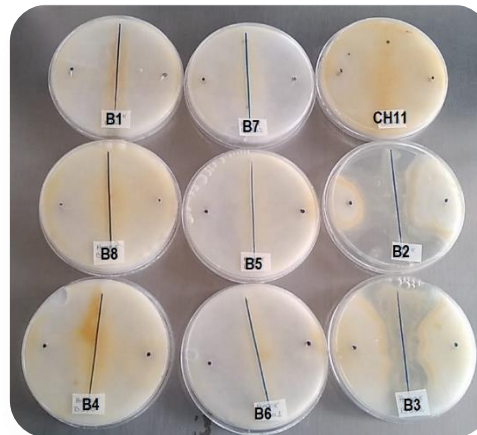
*F. equiseti*



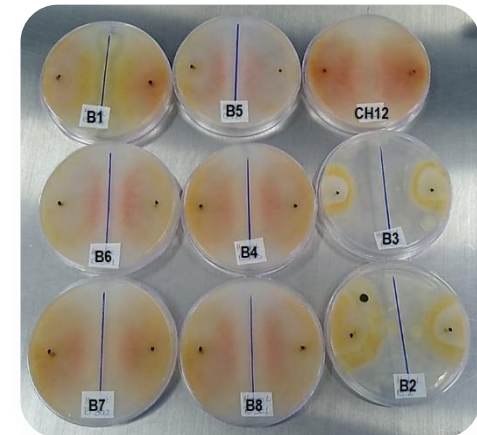
*F. incarnatum*



*F. cerealis*



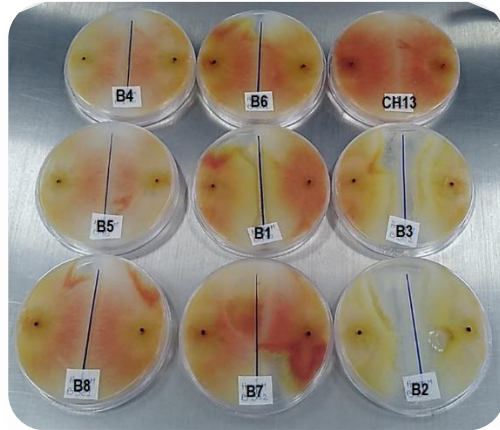
*F. graminearum*



*F. culmorum*



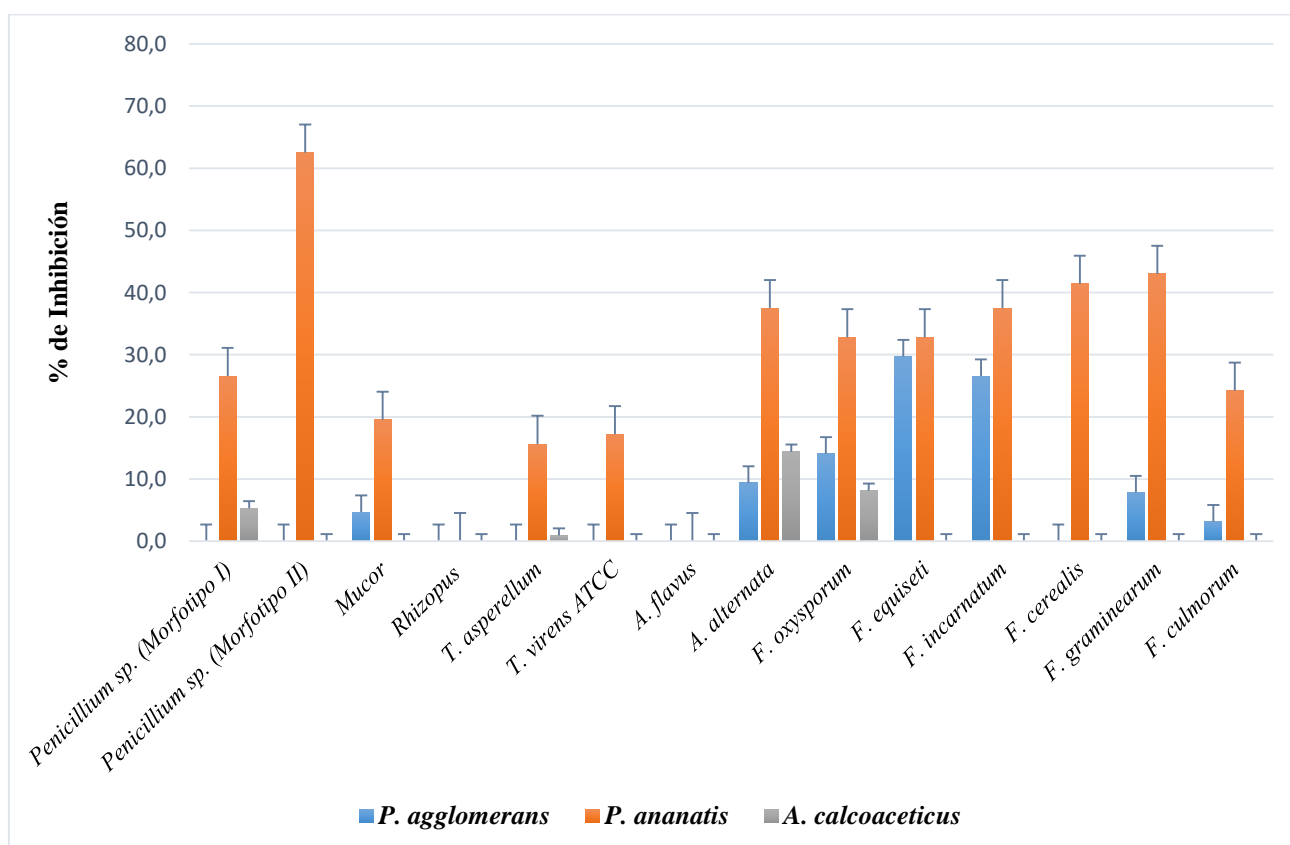
## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA



**Figura 7.** Las imágenes muestran las placas con las diferentes pruebas de enfrentamiento entre bacterias antagonistas y los hongos fitopatógenos. **Control (C) Hongos** - H1: *Penicillium* sp. (I), H2: *Penicillium* sp. (II), H3: *Mucor* sp., H4: *Rizophus* sp., H5: *T. asperellum*, H6: *T. virens* (ATCC), H7: *Alternaría alternata*, H8: *F. oxysporym*, H9: *F. equisety*, H10: *F. incarnatum*, H11: *F. cerealis*, H12: *F. graminearum*, H13: *F. culmorum*. **Bacterias** - B1: *P. agglomerans*, B2: *P. anannatis* (cepa 1), B3: *P. ananatis* (cepa 2), B4: *Acinetobacter calcoaceticus* (cepa1), B5: *A. calcoaceticus* (cepa2), B6: *A. calcoaceticus* (cepa3), B7: *A. calcoaceticus* (cepa4), B8: *A. calcoaceticus* (cepa5), Fuente autor.

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

Para el análisis estadístico se realizó un T – Student, donde se determinó si hay una diferencia significativa en la inhibición del crecimiento de hongos por tres grupos de bacterias *P. agglomeran*, *P. ananatis* y *A. calcoaceticus*. Se normalizaron los datos, se trabajó con un nivel de significación de  $p < 0,05$  (nivel de confianza del 95%). Al hacer la comparación de entre la inhibición provocada por las cepas bacterianas se muestra que entre *P. agglomeran* y *P. ananatis*, el valor ( $p < 0,05$ ), lo que indica que, existen diferencias estadísticamente significativas en su efecto inhibitorio, entre *P. agglomeran* y *A. calcoaceticus* el análisis muestra un valor ( $p < 0,05$ ) lo que indica que, si existen diferencias estadísticamente significativas en su efecto inhibitorio y entre *P. ananatis* y, *A. calcoaceticus* el análisis muestra un valor ( $p < 0,05$ ), que indica que, si existen diferencias estadísticamente significativas entre las dos especies respecto a su efecto de inhibición. Este análisis permite determinar que el mejor efecto de inhibición contra los hongos lo tienen las cepas de *P. ananatis* (Grafica 3).



**Gráfica 3.** Porcentaje de inhibición y análisis estadístico, bacterias biocontroladoras frente a hongos fitopatógenos, Fuente autor.

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

El género bacteriano *Pantoea* es un grupo diverso de bacterias Gram negativas en forma de bacilo, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*; se han identificado aproximadamente 20 especies, que se han aislado de una multitud de ambientes acuáticos y terrestres, comprende muchas especies versátiles con diversidad de características. Algunas especies del género han sido reconocidas como patógenos de plantas (Walterson & Stavrinides, 2015). Sin embargo, diferentes aislamientos se han utilizado con fines industriales, incluida la biorremediación y la biodegradación de herbicidas, contaminantes químicos del suelo y el agua, incluidos los hidrocarburos del petróleo y otros productos tóxicos como los metales (Dutkiewicz *et al.*, 2016).

Este género bacteriano promueve el crecimiento a través de la producción de fitohormonas, enzimas, degradación de fitatos, mineralización de nutrientes, solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno y mayor absorción en las raíces; asimismo forma asociaciones con las plantas, en consecuencia, estas especies se consideran ideales como bioinoculantes ecológicos para el reemplazo de fertilizantes químicos y promotores del crecimiento de las plantas (Dutkiewicz *et al.*, 2016). Algunos aislados son productores de antibióticos y se han desarrollado como agentes de control biológico para el manejo de enfermedades de las plantas (Walterson & Stavrinides, 2015).

*Pantoea agglomerans*, una bacteria gram negativa que pertenece a la familia *Erwiniaceae*, se considera una proteobacteria de origen vegetal (Coutinho & Venter, 2009), se asocia con la rizosfera y otros tejidos vegetales (como endófitos) promoviendo eficazmente el crecimiento de muchas plantas, debido a la producción de auxinas (Luziatelli *et al.*, 2020). Se ha comprobado su papel patológico como causante de enfermedades humanas de origen alérgico y/o inmunotóxico e infecciones accidentales. Sin embargo, los rasgos beneficiosos de esta especie son de gran valor por su uso potencial en muchas áreas de biotecnología (Dutkiewicz *et al.*, 2016). Se ha encontrado que *P. agglomerans* produce una serie de antibióticos (herbicolina, pantocinas, microcina, agglomerinas, andrimidas, fenazina, entre otros), que podrían usarse para la prevención y la lucha contra fitopatógenos (Dutkiewicz *et al.*, 2016).

*Pantoea ananatis* es una bacteria epífita y endófito común en plantas, se ha informado que se encuentra en numerosas especies de plantas económicamente importantes, incluyendo arroz, maíz, cebada, trigo, café, entre otras. En muchos de estos casos, la presencia de *P. ananatis* en la superficie de la planta no se ha relacionado con una enfermedad específica en el hospedador de donde se aisló como epífita y su papel como endófito es principalmente beneficioso para la

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

planta. Igualmente se considera que un patógeno vegetal emergente que ha mostrado un aumento en la incidencia, según el hospedador y el rango geográfico, causando una amplia gama de síntomas tanto en plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas. Su aparición en estos hospedadores da lugar a brotes esporádicos de enfermedades que provocan graves pérdidas económicas. Sin embargo, también se ha reportado que *P. ananatis* es una bacteria promotora de crecimiento de manera significativa en plantas, que induce la resistencia sistémica, debido a que tiene actividad antibacteriana y antifúngica *in vitro e in vivo*, protegiendo así a las plantas hospedadoras contra la infección por otros hongos y bacterias patógenos. Diferentes aislamientos de *P. ananatis* han demostrado tener una fuerte actividad antifúngica contra especies de los géneros *Rhizopus*, *Penicillium*, *Botrytis* al producir compuestos antifúngicos (Coutinho & Venter, 2009) y como se evidencia en este estudio contra especies de los géneros *Fusarium* y *Alternaria*.

Bacterias del género *Pantoea*, pueden ser usadas no solo como biocontroladores sino en la prevención de la penetración de contaminantes industriales dañinos en partes más profundas del suelo mediante la formación de biopelículas ya que tiene la capacidad de producir hidrógeno a partir de desechos. Así, esta bacteria aparece como un valioso biorremediador que, en algunos casos, puede adquirirse como una forma barata de energía (Dutkiewicz *et al.*, 2016).

Asociaciones de diferentes tipos de microorganismos benéficos probablemente provean distintos mecanismos o combinación de mecanismos que conducen al control de diferentes plagas y enfermedades, con la inhibición de patógenos vía antibiosis, producción de metabolitos tipo sideróforos, competencia por nutrientes y/o espacio, inducción de resistencia, degradación o inhibición de la germinación del patógeno, reducción de factores de patogenicidad y promoción de crecimiento de las plantas por medio de la producción de fitohormonas (Esquivel-Cote *et al.*, 2013).

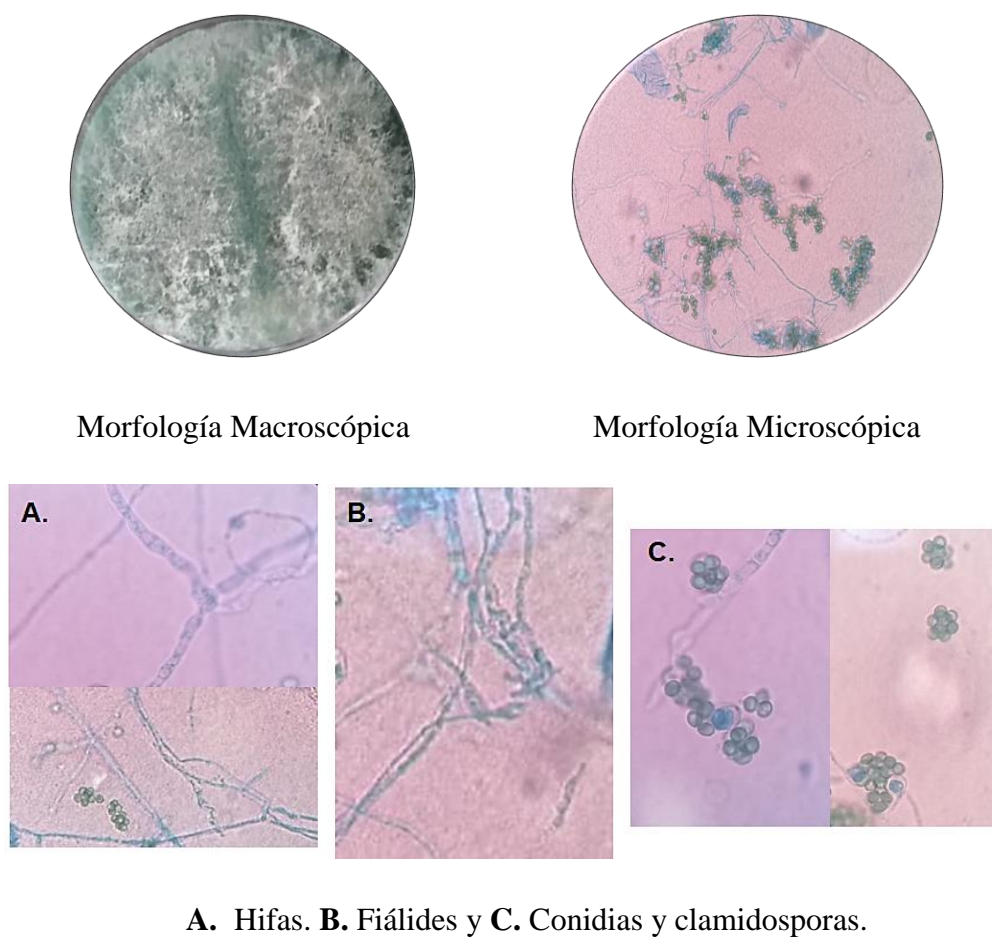
Entre las principales bacterias consideradas como PGPRs se encuentran diferentes especies de *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Enterobacter*, entre otras. Se ha estudiado que indirectamente cuando la planta está siendo infectada por un patógeno actúan como agentes de control biológico a través de la producción de ácido cianhídrico, sideróforos, enzimas líticas, bacteriocinas y antibióticos o una combinación de éstos, produciendo la hidrólisis de moléculas como el ácido fusárico con la cual se inhibe el desarrollo de la pared fúngica de hongos (Esquivel-Cote *et al.*,

**BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA**

2013). Compitiendo por el espacio y nutrientes, induciendo la resistencia sistémica y las defensas naturales para la protección de la planta (Moreno Reséndez *et al.*, 2018).

**BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA****Actividad Biocontroladora de *Trichoderma* spp****1. Aislamiento e Identificación de *Trichoderma asperellum***

Teniendo en cuenta el potencial de los suelos de quinua para el hallazgo de biocontroladores, se empleó una cepa identificada a nivel de género de *Trichoderma*. El hongo *T. asperellum* previamente se aisló de muestras de suelos cultivados con quinua, ubicados en el municipio de Siachoque departamento de Boyacá, se almacenó e identificó por el grupo de investigación Gestión Ambiental de la Universidad de Boyacá. Una vez reactivada la cepa almacenada y criopreservada en glicerol al 40% a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Se realizaron las observaciones microscópicas (Figura 8), se garantizó la pureza del aislamiento para la identificación a nivel de especie.



**Figura 8.** Identificación Morfológica *Trichoderma asperellum*, Fuente autor.

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

Los resultados de las observaciones microscópicas de *Trichoderma asperellum* mostraron que la cepa presenta conidias ligeramente ovoides, dispuestas en roseta en grupos de 4 a 6, clamidosporas abundantes y globosas, fiálides apicales arregladas en verticilos cruzados en grupos de 2, ornamentación finamente espinosa y conidióforos ramificados cual coincide con lo reportado para el género (García-Núñez *et al.*, 2017).

### Extracción de ADN

Para la extracción de material genético fúngico se implementó el protocolo Wizard® de Promega para la extracción de ADN de plantas modificado se tomaron 500 mg de micelio previamente liofilizado y se agregaron 600 µL de solución para lisis nuclear y se incubó a 65°C durante 15 minutos. Pasado el tiempo de incubación se agregó 3 µL de solución con ARNasa y se incubó a 37°C durante 15 minutos y posteriormente 5 minutos a temperatura ambiente. Para la precipitación de proteínas se agregaron 200 µL de solución precipitante y se dió vortex a la mezcla la cual se centrifugó a 13.000 rpm por 3 minutos, el sobrenadante obtenido fue transferido a un nuevo tubo conteniendo 600 µL de isopropanol a temperatura ambiente, se mezcló por inversión y se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto. Una vez realizado esto se descartó el sobrenadante y se agregaron 600 µL de etanol al 70% y se volvió a centrifugar.

De lo obtenido se aspiró el etanol y el sedimento restante se dejó secar al aire libre, posteriormente se agregó 100 µL de solución rehidratante para ADN dejándola a 65°C por 1 hora y almacenadas para su posterior procesamiento.

### Amplificación de fragmentos por PCR a partir de la región no variante ITS (espaciadores intergénicos).

La identificación inicial de los aislados fúngicos se realizó empleando los cebadores ITS4n-R 5´TCCTCCGCTTATTGATATGC3´ y ITS1-F 5´ TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3´. Para esto se modificaron las condiciones de PCR propuestas por Kumar y Shukla (2005) (Manish & K., 2005). La mezcla de reacción de 25 µl contenía 100 µM dNTPs, 0,1 µM de cada cebador, 1X de tampón de PCR conteniendo 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µl de muestra de ADN molde y 1 U de Taq polimerasa. La reacción implicó la desnaturalización inicial a 96°C durante 10 min, seguida de 30 ciclos en serie de desnaturalización a 95 ° C durante 1 min, hibridación a 60°C durante 1 min y extensión a 72°C durante 1 min, con una extensión final de un ciclo a 72°C durante 10

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

min. Una vez obtenidos los amplicones fueron enviados para secuenciación y purificación al centro de secuenciación GenCore de la Universidad de los Andes, las secuencias fueron analizadas por BLASTn para la identificación de especie. De acuerdo con las secuencias analizadas se determinó la que la especie para esta cepa es *T. asperellum*, con un porcentaje de identificación fue del 99%, lo cual coincide con la identificación morfológica de la cepa, además los parámetros de calidad y cobertura fueron idóneos para considerar como confiable dicha identificación.

### 2. Pruebas de Enfrentamiento Hongo - Hongo para la Evaluación del Efecto Biocontrolador de *Trichoderma asperellum*

Una vez identificada la cepa se realizaron pruebas de enfrentamiento tanto con esta como con una cepa de *T. virens* (ATCC 9645), contra 11 aislados fúngicos: *Penicillium* sp. (morfortipo I), *Penicillium* sp. (morfortipo II), *Mucor* sp., *Rhizopus* sp., *Alternaria alternata*, *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. incarnatum*, *F. cerealis*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, con el fin de evaluar su potencial biocontrolador. Se siguió la metodología propuesta por Suárez y colaboradores (2008), con modificaciones. Las pruebas de enfrentamiento se realizaron en Agar PDA suplementado con cloranfenicol 0,1g/L, colocándose en un extremo de la caja de Petri un disco de agar de 4 mm de diámetro con micelio de cada cepa a enfrentar previamente crecidas durante 7 días en medio PDA, en el extremo opuesto otro disco de 4 mm con micelio de *T. asperellum* o una cepa *T. virens* ATCC 9645, a una distancia de 6 cm aproximadamente entre ellos; como control se inoculó en cada extremo las cepas de *Trichoderma* por duplicado sin enfrentamiento con otra especie (Figura 9). La incubación se realizó a 27°C durante 7 a 10 días o hasta el crecimiento total del control. Se realizaron mediciones cada 24 h del crecimiento radial del micelio de la colonia de los hongos. Todas las pruebas fueron realizadas por duplicado (Suárez Meza *et al.*, 2008).

El antagonismo o capacidad antagónica de aislamientos nativos o comerciales de *Trichoderma* se comprobó por el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR), con la fórmula utilizada por (Ezziyyani *et al.*, 2004):

$$P.I.C.R = \left( \frac{R1 - R2}{R1} \right) * 100$$



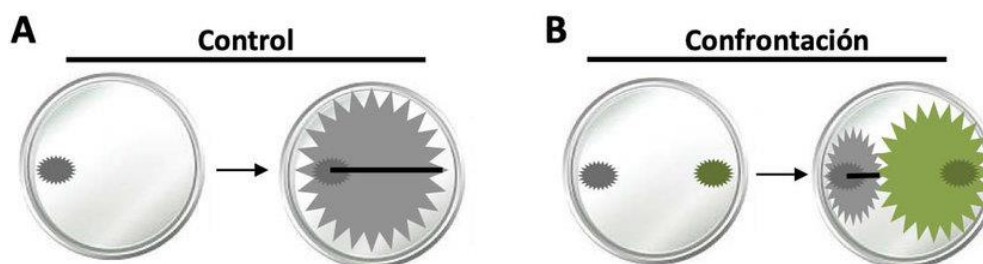
## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

Donde,

P.I.C.R es porcentaje de inhibición de crecimiento radial

R1 es el radio mayor (radio patógeno testigo)

R2 es el radio menor (radio del patógeno en enfrentamiento con el antagonista).

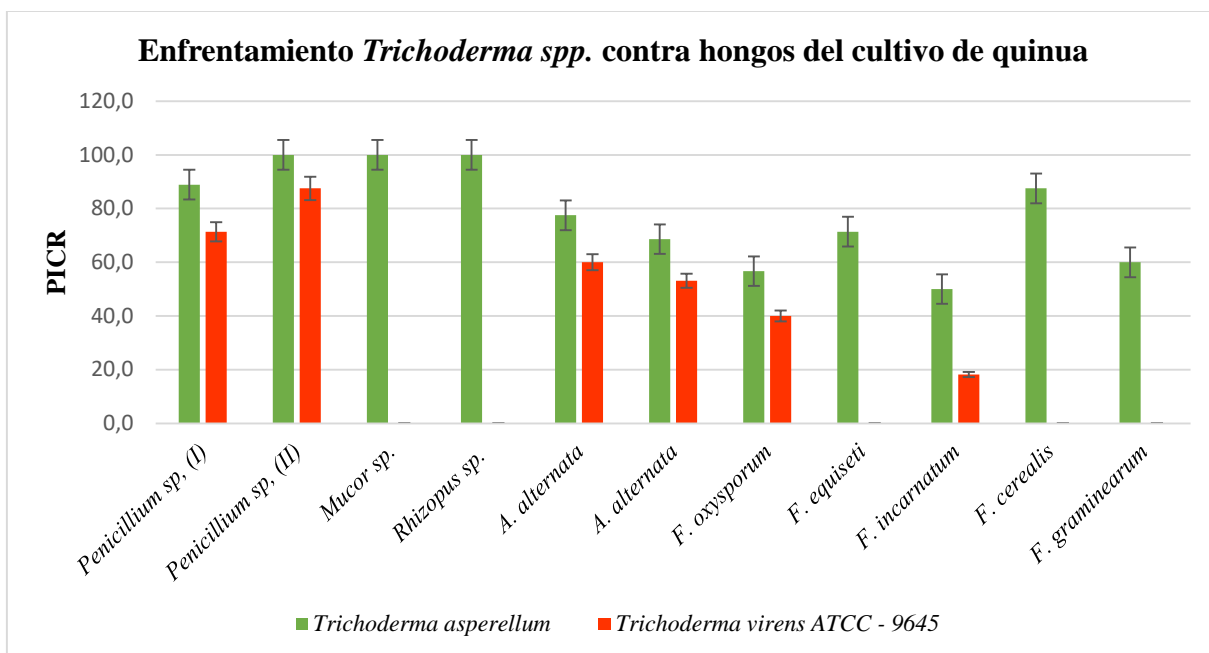


**Figura 9.** Esquema de prueba de enfrentamiento, inoculación del hongo antagonismo y hongo patógeno, Fuente: Cubilla-Ríos, A., Ruíz-Díaz-Mendoza, D., Romero-Rodríguez, M., Flores-Giubi, M., & Barúa-Chamorro, J. (2019). Antibiosis of proteins and metabolites of three species of *Trichoderma* against paraguayan isolates of *Macrophomina phaseolina*. *Agronomía Mesoamericana*, 30(1 SE-Articles). <https://doi.org/10.15517/am.v30i1.34423> (Cubilla-Ríos *et al.*, 2019).

Al analizar el crecimiento de las dos cepas antagonista sobre el medio mínimo y comparándolas, se observó que la cepa nativa de *T. asperellum* es la cepa que mayor porcentaje de crecimiento e inhibición presenta (100%) frente a los patógenos evaluados; mientras que la cepa *T. virens* (ATCC – 9645) el porcentaje de crecimiento e inhibición es menor (87.5%), frente a los patógenos evaluados.

Se realizó un análisis estadístico con T – student para comparar el porcentaje de inhibición de las cepas de *T. asperellum* y *T. virens* (ATCC – 9645) contra *Penicillium* sp. (morfo tipo I), *Penicillium* sp. (morfo tipo II), *Mucor* sp., *Rhizopus* sp. y contra los hongos fitopatógenos *A. alternata* y el complejo *Fusarium* spp., que mostró que sí existen diferencias estadísticamente significativas a un valor  $p < 0,05$ , entre el antagonismo de cada una de las cepas evaluadas; y que *T. virens* (ATCC – 9645) fue la que obtuvo el menor porcentaje de inhibición, comparada con la cepa nativa de *T. asperellum* (Gráfica 4).

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA



**Gráfica 4.** Porcentaje de inhibición y análisis estadístico de pruebas de enfrentamiento *Trichoderma* contra Hongos.

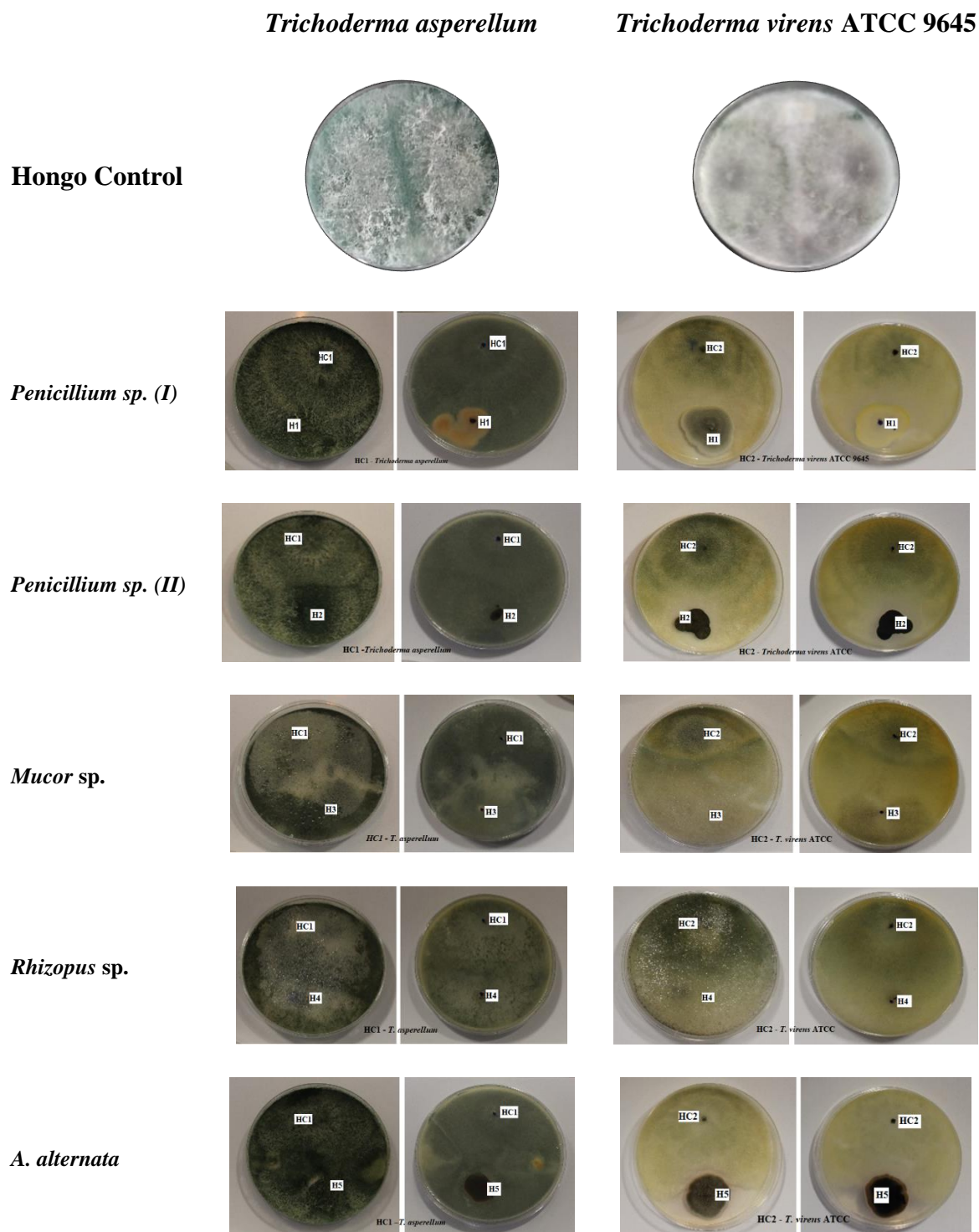
*Trichoderma asperellum* y *T. virens* (ATCC – 9645) contra *Penicillium sp.* (morfofoto I), *Penicillium sp.* (morfofoto II), *Mucor sp.*, *Rhizopus sp.*, *Alternaria alternata*, *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. incarnatum*, *F. cerealis*, *F. graminearum* y *F. culmorum*, Fuente autor.

Al hacer la comparación del radio de crecimiento antagonista (R1) *T. asperellum*, cepa nativa, con el radio de crecimiento patógeno (R2), se determinó la competencia por nutrientes y espacio (R. J. Fernández & Suárez, 2009); Se encontró, que los aislamientos de *T. asperellum*, se desarrollaron aislamientos del antagonista tuvieron un crecimiento promedio de 4,6cm, mientras que el patógeno mostró un crecimiento limitado, desarrollándose con un promedio de 0,7cm al décimo día, diferente a los controles que crecieron hasta 7,5cm de diámetro.

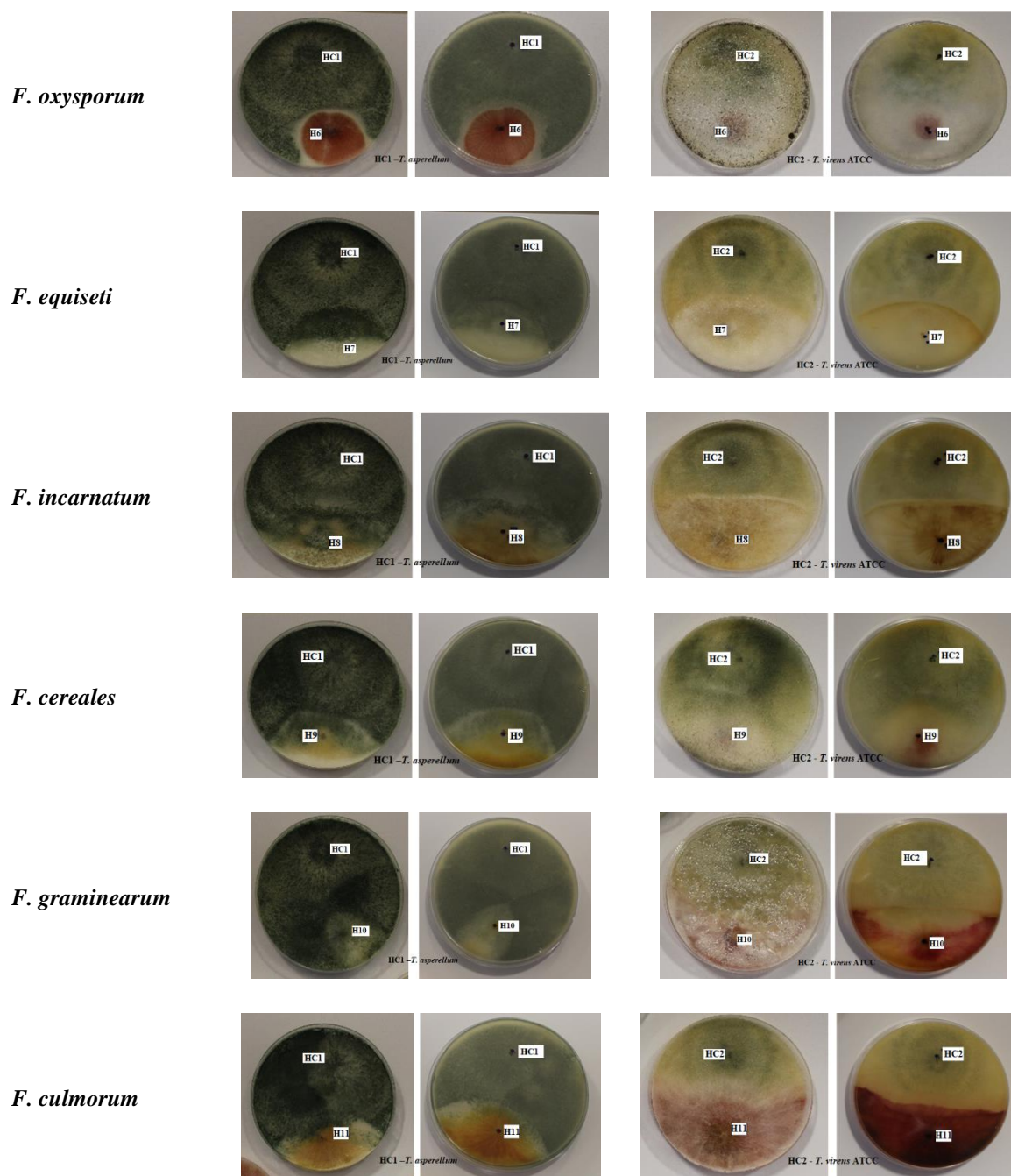
Al hacer la comparación del radio del crecimiento antagonista *T. asperellum* con el de *T. virens* (ATCC – 9645), se aprecia que el antagonista *T. virens*, crece en menor proporción y el patógeno se desarrolla en mayor distancia, significativamente diferente al tratamiento con *T. asperellum* sin embargo, existe una diferencia en el crecimiento de algunos patógenos lo que sugiere que existe represión del crecimiento por parte de *T. virens* (ATCC – 9645) sobre algunas cepas.

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

En la figura 10 se evidencian las observaciones macroscópicas que muestran la interacción antagonista-fitopatógeno.



## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA



**Figura 10.** Resultados de pruebas de enfrentamiento.

Hongo control 1 (HC1) *T. asperellum* y Hongo control 2 (HC2) *T. vires* ATCC 964, contra H1: *Penicillium* sp. (I), H2: *Penicillium* sp. (II), H3: *Mucor* sp., H4: *Rhizopus* sp., H5: *A. alternata*, H6: *F. oxysporum*, H7: *F. equiseti*, H8: *F. incarnatum*, H9: *F. cereales*, H10: *F. graminearum*, H11: *F. culmorum* en agar PDA con cloranfenicol, Fuente autor.

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

Después de una semana de incubación, cuando el antagonista y el fitopatógeno se encuentran, primero se observa una zona de inhibición, luego una intermezcla y finalmente un sobre crecimiento de *T. asperellum*, sobre todos los hongos, cubriéndolos totalmente a los 10 días, mostrando una invasión total sobre la superficie de la colonia del fitopatógeno, lo cual califica a *T. asperellum* en un grado antagónico tres y cuatro dependiendo el hongo a enfrentar (para grado cuatro obsérvese esporulación sobre la cepa problema en la figura 10), según la escala propuesta por Ezziyyani y colaboradores (2004) y citado por Suárez Meza y colaboradores (2008) (Tabla 7).

**Tabla 7.** Escala para evaluación de la capacidad antagónica.

Grado	Capacidad antagónica
0	Ninguna invasión de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
1	Invasión de ¼ de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
2	Invasión de ½ de la superficie de la colonia hongo patógeno.
3	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
4	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno esporulación sobre ella.

Fuente: Ezziyyani, M., Sánchez, C. P., Requena, M. E., Rubio, L., & Castillo, M. E. C. (2004). Biocontrol por *Streptomyces rochei*-Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología*, 26, 61-68.

El reconocimiento de *Trichoderma* como un excelente biocontrolador ha sido ampliamente reportado. Este es un hongo anaerobio facultativo que se encuentra de manera natural en suelos agrícolas, de este género existen más de 30 especies, al parecer, todas con efectos benéficos para la agricultura. Se ha reportado que *Trichoderma* probablemente sea el hongo más versátil, benéfico y polifacético que abunda en los suelos, capaces de aportar una inmensa gama de beneficios que demuestran su incalculable valor desde el punto de vista agrícola (Ríos, 2014).

Tiene diversas ventajas como agente de control biológico de enfermedades causadas por patógenos fúngicos del suelo y las plantas (Ezziyyani *et al.*, 2004). Produce una gran cantidad de enzimas quitinolíticas y celulolíticas (Negrete, 2012), inducibles con la presencia de hongos fitopatógenos, que ayudan en la descomposición y toma de nutrientes de los hongos a los cuales degrada incorporándolos como materia orgánica (Ríos, 2014).

Las especies del género *Trichoderma* son los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades de plantas producidas por hongos, su velocidad de crecimiento es alta por lo que



## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

colonizan y se establecen rápidamente el suelo (Ríos, 2014). Las cepas de *Trichoderma* son naturalmente resistentes a muchos compuestos químicos tóxicos, incluyendo herbicidas, fungicidas, plaguicidas y compuestos fenólicos, por lo cual pueden controlar enfermedades ya que no atacan a plantas superiores (Cruz-Triana *et al.*, 2017) y producen xilanasas y celulasas relacionadas en muchos casos con la síntesis de etileno en las plantas y otra hormonas implicadas en la respuesta sistémica de defensa vegetal, permitiendo la acción de estas enzimas sobre la pared celular de los hongos fitopatógenos circundantes (Ríos, 2014).

En quinua previamente ha sido reportado su uso para el control de fitopatógenos Ttaca y colaboradores (2018) en Perú inocularon semillas con diferentes cepas con capacidad endofítica sobre el control del mildiu (*Peronospora variabilis* Gäum.) consiguiendo una mejora del rendimiento de la planta, logrando la mayor colonización endofítica de cepas de *Trichoderma* en quinua con el método de infestación del sustrato (Leon Ttacca *et al.*, 2018). Sin embargo, los reportes del uso de este en el cultivo son muy escasos. Para el control de *Fusarium* ha sido empleado en cultivos de tomate como biocontrolador de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL), el patógeno causal de la enfermedad del marchitamiento de este cultivo (Sallam *et al.*, 2019). Se ha reportado para tratar el síndrome de muerte súbita (SDS) causado por *Fusarium virguliforme* es una de las enfermedades más importantes que afectan a la soja en los Estados Unidos, los autores destacan el potencial de aislamientos nativos (Pimentel *et al.*, 2020). Hasan y colaboradores (2020) han reportado a *Trichoderma asperellum* cepa B1092 con un gran potencial de campo para mejorar la productividad y la calidad de los tomates y para controlar el marchitamiento por *Fusarium* del tomate cherry (Hasan *et al.*, 2020). Teniendo en cuenta la amplia distribución e incidencia de *Alternaria* y *Fusarium* en los cultivos de quinua del departamento, esta especie puede ser promisoría en el control de estos patógenos, en el mejoramiento del cultivo y en la producción de orgánicos con miras a exportación.

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

### Capacidad Bactericida de Aceites Esenciales de Tomillo (*Thymus vulgaris*) y Orégano (*Origanum vulgare*)

Con el fin de evaluar el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de tomillo y orégano se determinó su acción inhibitoria contra las bacterias aisladas en el presente estudio, teniendo en cuenta que en estudios previos realizados por el grupo de investigación Gestión Ambiental de la Universidad de Boyacá, algunas son patógenas para la variedad Amarilla de Marangani de quinua, de esta forma se pretende evaluar el potencial de los aceites como bioplaguicidas.

#### 1. Análisis de Aceites

Para el análisis de utilizaron dos aceites comerciales obtenidos por la técnica de arrastre de vapor, con el fin de establecer su composición y los porcentajes de los compuestos que presentan actividad biológica se realizó un análisis cromatográfico. Para esto, se enviaron 2ml de muestras de cada uno de los aceites esenciales de Tomillo y Orégano para análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS); según el método acreditado por el ONAC, al Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas, CROM-MASS, de la Universidad Industrial de Santander. Empleando como estándar de referencia la mezcla certificada de hidrocarburos C6 – C25. La preparación de las muestras se llevó a cabo por dilución e inyección directa de los aceites esenciales al cromatógrafo. El análisis cromatográfico se realizó en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890 acoplado a un detector selectivo de masas (MSD, AT 5973N), operado en el modo de barrido completo de radiofrecuencia (full scan). La columna empleada en el análisis fue DB-5MS (J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.), de 5%-Ph-PDMS, 60 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ . La inyección se realizó en modo split (30:1),  $V_{\text{iny}} = 2 \mu\text{L}$ .

La identificación presuntiva de los compuestos registrados en las muestras de aceite(s) esencial(es) se basó en sus espectros de masas (EI, 70 eV), se usaron las bases de datos de Adams, Wiley y NIST. En las tablas 10 y 11 del anexo D aparecen la identificación presuntiva, los tiempos de retención (tR) y la cantidad relativa (%) de los componentes presentes en las muestras de aceites esenciales de Tomillo y Orégano, analizado(s) por GC/MS, operado en el modo de barrido completo de radiofrecuencias (full scan).

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

En la tabla 8 se muestran los principales compuestos químicos de los aceites *T. vulgaris*) *O. vulgare* respectivamente, dentro de los cuales los componentes mayoritarios de estos corresponden a Carvacrol, Timol, Linalol, p-Cimeno y  $\gamma$ -Terpineno.

**Tabla 8.** Componentes químicos principales de aceites esenciales de Tomillo (*Thymus vulgaris*) y Orégano (*Origanum vulgare*). Tiempos de retención (tR) y cantidad relativa (%).

Componentes Principales	tR, min	Cantidad relativa, %	
		Tomillo ( <i>T. vulgaris</i> )	Orégano ( <i>O. vulgare</i> )
Carvacrol	31,0	6,5	66,7
Timol	30,4	37,9	3,7
Linalol	23,2	6,4	5,4
p-Cimeno	20,2	29,9	6,5
$\gamma$ -Terpineno	21,6	3,5	4,1

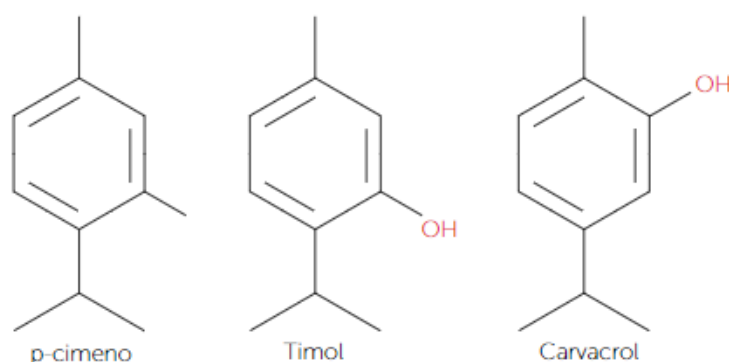
Fuente: Datos técnicos proporcionados por el Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas Universidad Industrial de Santander.

Para el caso del aceite esencial de *T. vulgaris*, se encontró que los componentes mayoritarios son el Timol (37,9 %) y el p-cimeno (29,9%) y para la muestra *O. vulgare* el componente mayoritario corresponde a Carvacrol (66,7%).

Los componentes más abundantes en estos dos aceites son el timol y el carvacrol respectivamente. El carvacrol es un isómero del timol, cambiando únicamente la posición del grupo hidroxilo, por lo cual su mecanismo de acción es semejante. Estos componentes poseen fuertes propiedades antimicrobianas, provocando desorden y desestabilización de la membrana celular, disolviéndose en la bicapa fosfolipídica, lo que causa un aumento de su fluidez y la permeabilidad (García & Palou, 2008). La fuerte acción antimicrobiana de estos componentes se atribuye a la presencia del radical hidroxilo que les permite actuar como intercambiador de protones, hasta causar el agotamiento de ATP, deterioro de procesos vitales y finalmente la muerte de la célula bacteriana; el p-cimeno, es precursor biológico de timol y carvacrol, este componente carece de este hidroxilo y presenta menor actividad (López-Ambrocio *et al.*, 2016).



## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA



**Figura 11.** Estructura química del p-cimeno, timol y carvacrol, Fuente: López-Ambrocio, R. M., Ruiz-Posadas, L. M., & Delgadillo-Martínez, J. (2016). Actividad antimicrobiana del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris* L.). *AGRO*. <https://mail.revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/849>.

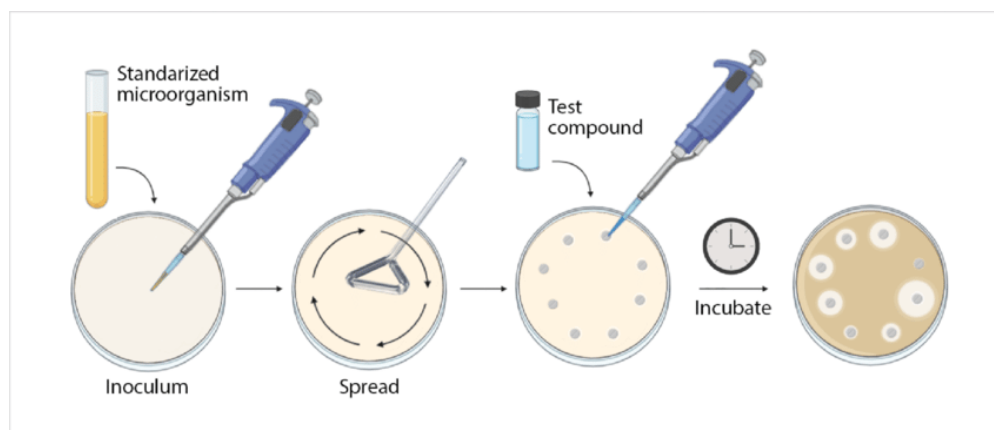
No solo por la especie de la cual se realice la extracción, sino que en una misma variedad vegetal, la variabilidad en la composición química composición de los aceites esenciales y las propiedades antimicrobiana, puede cambiar de acuerdo a diferentes situaciones tales como: ambientales (clima, estaciones y posición geográfica), variaciones genéticas, el estado nutricional de la planta, el tiempo de la cosecha y el método de extracción (Argote Vega *et al.*, 2017). Por lo que siempre es necesario analizar el tipo de componentes y sus proporciones, además porque tipo de extracción afecta directamente la obtención de compuestos bioactivos estables.

## 2. Actividad Microbicida de Aceites Esenciales de Tomillo y Orégano

Con el fin de determinar la actividad microbicida o no de los aceites y así poder establecer las concentraciones a emplear. Inicialmente se realizó una evaluación bactericida de los aceites esenciales con 12 cepas bacterianas aisladas de cultivos de quinua de los géneros *Pantoea*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas* y *Pseudomonas*, usando el método de difusión en pozo descrita por (Álvarez *et al.*, 2005); a partir de caldos inoculados de 24 horas de crecimiento en caldo Müller-Hinton, se realizaron soluciones bacterianas de cada uno de los aislados y se ajustaron a escala Mc Farland de 0,5 que equivale a  $1.5 \times 10^8$  UFC /mL

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

(inicialmente se verificó dicha concentración por absorbancia a 0.074nm con el objeto de verificar su concentración), luego fueron sembrados 100  $\mu$ L masivamente en placas de Müeller Hinton, se adicionaron 80  $\mu$ L de una solución al 1% de los aceites de tomillo y órgano, solubilizados en DMSO, como control positivo se usó estreptomycin (30 mg/ml) y un control negativo con DMSO, las placas se incubaron a 27°C, por 24 horas (Carrillo *et al.*, 2018). Finalizado el tiempo de incubación se midieron los halos de inhibición y se calculó el porcentaje de actividad inhibitoria (Bermúdez-Vásquez *et al.*, 2019).



**Figura 12.** Método de difusión en pozo, Fuente Correa, M., Martínez, F., Patiño Vidal, C., Streitt, C., Escrig, J., & Lopez de Dicastillo, C. (2020). Antimicrobial metal-based nanoparticles: a review on their synthesis, types and antimicrobial action Open Access. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 11, 1450–1469. <https://doi.org/10.3762/bjnano.11.129> (Correa *et al.*, 2020)

Todos los experimentos se realizaron por duplicado, los resultados son expresados como el promedio de las 2 medidas. Para obtener el efecto de inhibición de cada aceite con respecto al halo generado por el antibiótico, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ efecto inhibitorio} = \frac{\text{Media diámetro halo de inhibición}}{\text{Diámetro halo de inhibición control positivo}} \times 100$$

Los resultados del efecto de inhibición de cada aceite y de los controles positivos y negativos se muestran en la tabla 9.

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

**Tabla 9.** Porcentaje de inhibición para las cepas usadas en este ensayo empleando la técnica de difusión en pozo. Cepa 2. *P. ananatis*, cepa 3. *P. gglomerans*, cepa 5. *P. gglomerans*, cepa 7. *S. liquefaciens*, cepa 8. *A. calcoaceticus*, cepa 9. *E. zakazakii*, cepa 14. *S. maltophilia*, cepa 15. *P. poae*, cepa 19 *P. agglomerans*, cepa 21. *P. agglomerans*, cepa 26. *P. fluorescens*, cepa 44. *P. agglomerans*.

	Microorganismo (N° de cepa)											
	2	3	5	7	8	9	14	15	19	21	26	44
	% efecto inhibición											
<i>T. vulgaris</i> 10 <sup>-1</sup>	100	100	65.4	76.9	100	100	96.2	100	100	100	46.2	100
<i>O. vulgare</i> 10 <sup>-1</sup>	100	100	76.9	57.7	100	76.9	92.3	57.7	100	100	30.8	100
DMSO	38.5	100	0.0	26.9	15.4	23.1	30.8	53.8	69.2	61.5	26.9	30.8
Estreptomicina	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Agua destilada	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fuente: Autor

Con esta prueba se determinó que los aceites esenciales evaluados presentan una alta capacidad de difusión, por lo que los resultados de inhibición utilizando esta metodología fueron positivos en la mayoría de los casos, lo anterior teniendo en cuenta que principios bioactivos y modo de acción de los aceites esenciales (Argote Vega *et al.*, 2017).

De esta manera se comprobó el efecto bactericida y se decidió establecer las concentraciones mínimas inhibitorias del compuesto. Es importante destacar que el disolvente DMSO también tuvo alguna actividad contra algunas cepas principalmente de *Pantoea*.

### 3. Pruebas con Método de Micro Dilución en Placa para Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del Crecimiento Microbiano

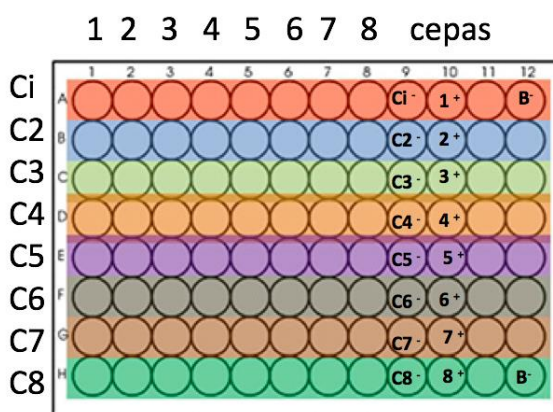
#### 3.1. Cepas bacterianas.

Adicionalmente a las cepas previamente empleadas, para este ensayo se incluyeron dos cepas ATCC una Gram positiva y una Gram negativa. En este sentido las cepas evaluadas corresponden a *E. coli* ATCC 35218, *S. aureus* ATCC 43300, 2 cepas de *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis*, *Serratia liquefaciens*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter zakazakii*,

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

*Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas poae*, *Pseudomonas azotoformans*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas trivialis*. Se cultivaron en caldo Mueller-Hinton (MH), y se incubaron a  $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24 h previo a los ensayos. Se elaboraron diluciones a escala McFarland 0,5 de la misma manera que se describió con anterioridad (Balouiri *et al.*, 2016; Bermúdez-Vásquez *et al.*, 2019).

Para la determinación de los valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI), que corresponde a la concentración más baja del agente antimicrobiano probado (aceites de Tomillo y orégano) que sea capaz de inhibir el crecimiento de los microorganismos de forma visible, se estableció el procedimiento de microdilución en placa de 96 pozos, de acuerdo con Balouiri y colaboradores, (2016), con algunas modificaciones. Se prepararon tubos falcón con 10 ml de MH para llevar a cabo diluciones seriadas de cada aceite, en total se prepararon 10 diluciones partiendo de una concentración inicial (Ci) al 8% preparada en etanol al 70%, de ahí se prepararon las 9 diluciones restantes al 4%, 2%, 1%, 0.5%, 0,25%, 0,125%, 0,062%, 0,031% y 0,015%, añadiendo, según cada concentración, 10 ml de la solución anterior en 10 ml de caldo MH. Estas diluciones se dispersaron en placas de 96 pozos añadiendo 180  $\mu\text{L}$  de la dilución correspondiente, posteriormente, se inocularon con 20  $\mu\text{L}$  de la dilución bacteriana ajustada a en escala de McFarland 0,5, y se incubaron por 48h a  $27^{\circ}\text{C}$ . El control negativo contenía 200  $\mu\text{L}$  del aceite, y el control positivo 20  $\mu\text{L}$  cepa + 180  $\mu\text{L}$  de caldo Mueller Hinton (Balouiri *et al.*, 2016; Bermúdez-Vásquez *et al.*, 2019). Las experiencias se realizaron por duplicado. Posteriormente las placas se leyeron en el equipo SPECTROstar Nano - BMG LABTECH, a una absorbancia de 600 nm.



**Figura 13.** Placa de microtitulación de 96 pocillos (microdilución), y orden para rellenar los pocillos, tomada y modificada de Heselpoth, R., & Nelson, D. (2012). A New Screening Method

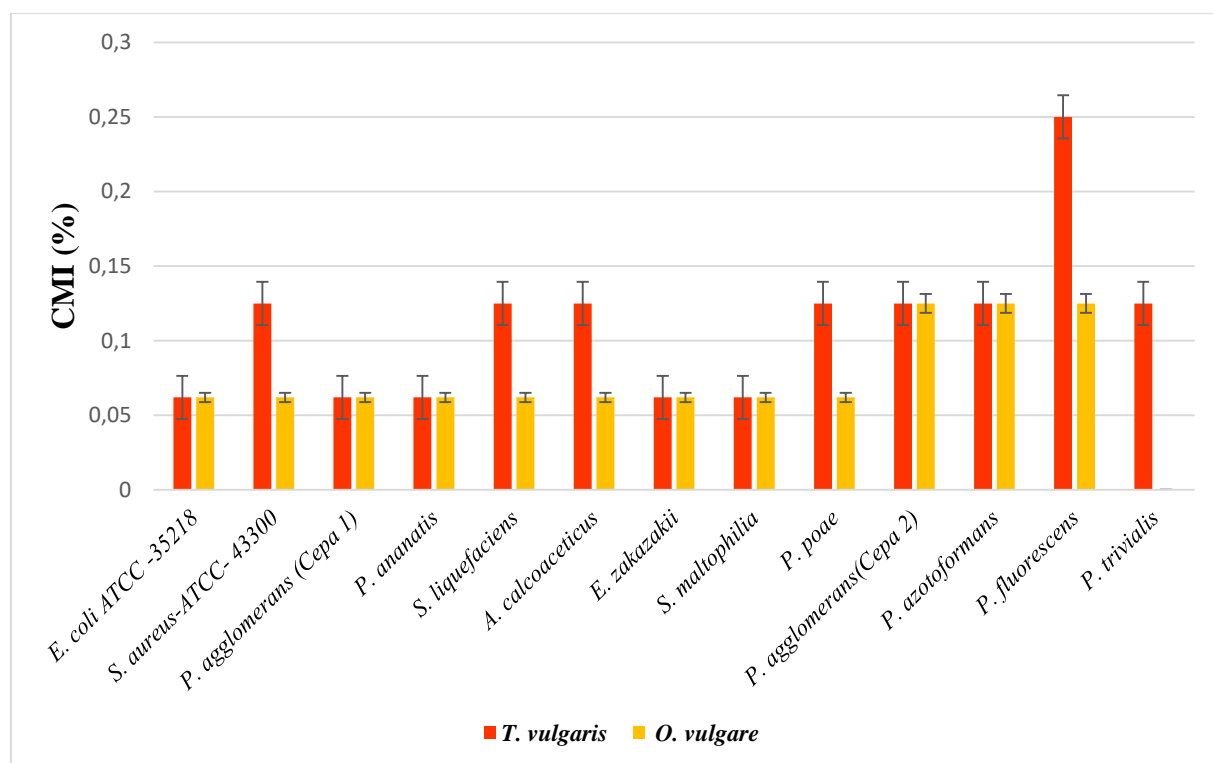
**BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA**

for the Directed Evolution of Thermostable Bacteriolytic Enzymes. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 69. <https://doi.org/10.3791/4216> (Heselpoth & Nelson, 2012).

En la gráfica 5 se evidencia la CMI obtenida para los aceites esenciales de Tomillo (*T. vulgaris*) y Orégano (*O. vulgare*), frente a las 13 bacterias seleccionadas para este estudio, el aceite esencial de orégano presentó una CMI de 0,062 frente a 10 de las cepas evaluadas y una CMI de 0,125 frente a 3 cepas evaluadas *P. agglomerans* (Cepa 2), *P. azotoformans* y *P. fluorescens*. Respecto al aceite de Tomillo se evidencia que la CMI es de 0,062 para 5 cepas: *E. coli* ATCC -35218, *P. agglomerans* (Cepa 1), *P. ananatis*, *E. zakazakii* y *S. maltophilia*; una CMI mayor de 0.125 para *S. aureus* ATCC - 43300, *S. liquefaciens*, *A. calcoaceticus*, *P. poae*, *P. agglomerans* (Cepa 2), *P. azotoformans* y *P. trivialis* y solo hay una cepa con una CMI mayor de 0.25 *P. fluorescens*.

Se realizó un análisis estadístico con T – student, donde se comparó la CMI de los dos aceites esenciales de Tomillo y Orégano, todos los valores se normalizaron, se trabajó con un nivel de significación de  $p < 0,05$  (nivel de confianza del 95%). Al hacer la comparación de la CMI el análisis muestra un valor ( $p < 0,05$ ), que indica que, si existen diferencias estadísticamente significativas entre la CMI de los dos aceites usados, mostrando una fuerte actividad antibacteriana del aceite de orégano ya que a menor concentración utilizada mayor es su efectividad para inhibir el crecimiento bacteriano, proporcionando un efecto bacteriostático después de 24 horas de exposición.

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA



**Gráfica 5.** CMI de aceites esenciales de tomillo (*T. vulgaris*) y orégano (*O. vulgare*), Fuente autor.

Se evidencian diferencias entre las CMI de los dos aceites esenciales sobre las bacterias evaluadas; sin embargo, cabe señalar que la mayoría de las cepas bacterianas son más susceptibles al orégano. No obstante, *P. fluorescens* presentó una menor resistencia contra este aceite esencial. La susceptibilidad de las cepas bacterianas a los compuestos antimicrobianos de los aceites esenciales es diferente, principalmente debido a su morfología específica (estructura de la pared celular bacteriana, formación de cápsulas, entre otras) (Man *et al.*, 2019).

La pared celular de peptidoglicano para bacterias Gram positivas permite que las moléculas hidrófobas penetren y lleguen al ambiente interno. El lipopolisacárido, que forma parte de la capa externa de las bacterias gramnegativas, permite que pasen principalmente moléculas hidrófilas pequeñas y solo es parcialmente permisivo para las moléculas hidrófobas. La hidrofobicidad de los aceites esenciales es responsable de la alteración de las estructuras bacterianas. Los mecanismos de acción del aceite esencial sobre las bacterias son: degradación de la pared celular y membrana citoplasmática, coagulación y difusión del citoplasma a través

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

de la doble capa lipídica de la membrana, junto con alteración de su permeabilidad y función (Man *et al.*, 2019).

El aceite de orégano presentó un contenido muy alto de carvacrol (66,7%), lo que respalda los hallazgos del efecto antimicrobiano, ya que este componente inhibe la producción de toxinas microbianas, inhibe la formación de biopelículas, reduce la producción de fimbrias y la motilidad de enjambre. El alto contenido de carvacrol del aceite de orégano junto con su solubilidad en agua puede explicar el buen efecto antibacteriano de su extracto acuoso en comparación con el extracto acuoso de otros aceites esenciales (Man *et al.*, 2019).

Aunque el orégano presentó un efecto comparable con el aceite de tomillo, ocupó el primer lugar en su efecto antibacteriano. Según el análisis de las muestras de los aceites esenciales de este estudio, el aceite de tomillo presenta casi la mitad de su contenido en timol (37,9%), seguido de p-cimeno y en menores cantidades de  $\gamma$ -terpineno, y carvacrol (Sharifzadeh *et al.*, 2016). Se ha reportado que mayores cantidades de timol, presentan un efecto antimicrobiano más fuerte (Man *et al.*, 2019).

Además, se ha reportado un efecto diferencial de acuerdo a la tinción de Gram por lo que es necesario mencionar que 12 de las especies bacterianas seleccionadas en este estudio bacilos entéricos Gram-negativos, Özkalp y colaboradores (2010) reportaron previamente que las bacterias grampositivas fueron más sensibles a aceites esenciales de orégano que las gramnegativas (Özkalp *et al.*, 2010). Un problema a la hora de determinar la eficiencia de los aceites esenciales en cuanto a las propiedades antibacterianas es su naturaleza hidrófoba que los hace insolubles en medios a base de agua. En este sentido, con el fin de obtener una mezcla homogénea del antibacteriano y el medio de dilución, se resuelve elaborando una emulsión que permita la coexistencia de sus componentes los cuales generalmente son sustancias hidrófilas e hidrófobas más tensoactivos en combinación con acetona, polietilenglicol o etanol (Argote Vega *et al.*, 2017).

Si bien los aceites esenciales probados presentaron actividad bactericida contra todos los aislados bacterianos a bajas concentraciones, es importante mencionar que no todas las cepas probadas son fitopatógenas. Cepas con potencial biocontrolador y promotoras de crecimiento vegetal presentaron una alta susceptibilidad a ambos aceites por lo que no sería recomendable realizar un control orgánico con dichos aceites en nichos nativos puesto que puede perjudicar los microorganismos funcionales. Sin embargo, se recomienda evaluar otras aplicaciones en las

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

que pudieran resultar ser de gran utilidad como en protocolos de desinfección de semillas, ya que se ha reportado su amplio efecto contra bacterias patógena de plantas como *Pseudomonas syringae*, *Erwinia chrysanthemi*, entre otras (Gormez *et al.*, 2016), tal como se ha planteado por Dadasoglu y colaboradores (2011) actividades antibacterianas de extractos y aceites esenciales de tres especies de *origanum* contra bacterias patógenas de plantas y su potencial uso como desinfectantes de semillas, en su estudio se probaron aceites esenciales de orégano contra 25 cepas bacterianas patógenas de plantas con los cuales se observó un amplio espectro de actividad antibacteriana, probablemente debido a los componentes fenólicos como el carvacrol y el timol, el terpinen-4-ol y el linalol (Dadasoglu *et al.*, 2011). Wolf y colaboradores (2008) probaron varios aceites esenciales por sus propiedades antimicrobianas para desinfectar semillas de hortalizas. Los autores reportaron que en ensayos *in vitro*, el aceite de tomillo, el aceite de orégano, el aceite de canela y el aceite de clavo tuvieron la mayor actividad contra los patógenos transmitidos en semillas por bacterias como *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y fúngicos como *Alternaria* y *Botrytis*, los autores han considerado que el aceite de tomillo es el compuesto natural más prometedor para reducir los patógenos transmitidos por semillas por su amplia efectividad y baja fitotoxicidad (Wolf *et al.*, 2008).

Otros usos han sido reportados por Souza y colaboradores (2006) evaluaron la actividad antibacteriana del aceite esencial de orégano en diversas bacterias Gram positivas y Gram negativas descomponedores y/o patógenas relacionadas con los alimentos y su efectividad antimicrobiana en un micro-modelo de conservación de alimentos. Los resultados mostraron una fuerte actividad antibacteriana del aceite esencial analizado, se reportó que el aceite esencial pudo causar un efecto inhibitorio significativo ( $P < 0,05$ ) sobre la viabilidad de las bacterias, proporcionando un efecto bacteriostático después de 24 horas de exposición. Además, la CMI proporcionó una disminución significativa ( $P < 0,05$ ) de la flora bacteriana autóctona en muestras de carne picada almacenadas en refrigeración. Estos resultados respaldan la posibilidad de utilizar este aceite esencial como compuesto antimicrobiano alternativo en los sistemas de conservación de alimentos. (Souza *et al.*, 2006)



## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

### Conclusiones

A través de la utilización de medios selectivos y la técnica molecular MALDI-TOF fue posible aislar e identificar bacterias de interés agronómico en el cultivo de la quinua, de los géneros: *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Lelliottia*, *Pseudomonas* y *Erwinia*. las cuales han sido reportadas como promotoras de crecimiento vegetal y biocontroladoras y otras como *Pseudomonas* como fitopatógenas para este cultivo.

El aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfato a partir de suelos de cultivos de quinua, permitió identificar y caracterizar cepas del género y especie *Pantoea ananatis*, con potencial biocontrolador las cuales resultan promisorias para ser empleadas en el control de los hongos fitopatógenos más relevantes del cultivo como son *Fusarium* y *Aternaria*, con un bajo impacto en la microbiota fúngica del suelo funcional ya que hongos tales como *Mucor* sp. y *Rizhopus* sp. no se vieron afectados significativamente en las pruebas de enfrentamiento. Esto demuestra que el suelo es una fuente importante de microorganismos biocontroladores como se evidencia en este estudio, bacterias del género *Pantoea* fueron efectivas para el biocontrol de hongos fitopatógenos, además de ser promotoras de crecimiento vegetal, solubilizando el fosforo y ayudando en la fijación de nitrógeno disponible para la planta.

Se logró la identificación a nivel de especie de un aislado de *Trichoderma* de suelos nativos de cultivos de quinua del departamento de Boyacá. *T. asperellum* que mostró un mayor efecto antagónico contra los hongos fitopatógenos más relevantes del cultivo como son, el complejo *Fusarium* y *Alternaria alternata*, resultados que muestran que *T. asperellum* es un hongo promisorio para el biocontrol de hongos fitopatógenos y enfermedades puesto que previamente se ha reportado la resistencia de dichos patógenos a diversos fungicidas comerciales.

Los aceites esenciales de tomillo y orégano demostraron tener un efecto bactericida a bajas concentraciones, aunque el efecto es indiscriminado entre las cepas fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos y las patógenas, estos pudieran ser empleados en tratamientos de desinfección de semillas lo cual evitaría la propagación de enfermedades preexistentes y dar un manejo fitosanitario preventivo más eficiente.

Tanto las bacterias del género *Pantoea* como los hongos del género *Trichoderma* sp. y los aceites esenciales de tomillo y orégano, mostraron ser efectivos para el control *in vitro* del

**BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA**

complejo *Fusarium* y *Alternaria alternata*, esto evidencia el potencial de estos tratamientos en el biocontrol de los microorganismos fitopatógeno presentando una alternativa amigable con el ambiente.

### Sugerencias y Recomendaciones

Se sugiere realizar identificación molecular mediante la técnica PCR para las bacterias que no se identificaron o que presentan un score bajo con la técnica MALDI TOF.

Se deben realizar estudios *in vivo* para analizar el potencial real de estos agentes biocontroladores tanto fúngicos como bacterianos y en condiciones de campo, para determinar sus modos de acción y la mejor forma de introducción en el huésped.

Se sugiere evaluar la aplicación de aceites sobre semillas en protocolos de desinfección tanto *in vitro* como en condiciones de campo.

Se debe considerar el uso de microorganismos como bioinoculantes ecológicos ideales que reemplazarían los fertilizantes químicos. Al igual que su uso como agentes biocontroladores que permitan la disminución de las dosis de plaguicidas químicos, siendo un procedimiento saludable y respetuoso con el medio ambiente.

Adicionalmente se sugiere evaluar el efecto sinérgico de estos tratamientos de manera combinada.

Se sugiere evaluar la patogenicidad de *P. agglomerans* en quinua, dado que se ha reportado como una bacteria patógena en otros cultivos.

## Referencias

- Abugoch James, L. E. (2009). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): composition, chemistry, nutritional, and functional properties. *Advances in Food and Nutrition Research*, 58, 1–31. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(09\)58001-1](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(09)58001-1)
- Adnan, M., Islam, W., Shabbir, A., Khan, K. A., Ghramh, H. A., Huang, Z., Chen, H. Y. H., & Lu, G. (2019). Plant defense against fungal pathogens by antagonistic fungi with *Trichoderma* in focus. *Microbial Pathogenesis*, 129, 7–18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.042>
- Álvarez, M. E., Isaza, G., & Echeverry, H. M. (2005). Efecto antibacteriano in vitro de *Austroeupatorium inulaefolium* HBK (Salvia amarga) y *Ludwigia polygonoides* HBK (Clavo de laguna). *Biosalud*, 46–56.
- Amado Rodríguez, L. (2021). Aprender de microbiología desde la importancia de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal. Una experiencia en la escuela primaria. *Revista Eureka Sobre Enseñanza y Divulgación de Las Ciencias*, 18(3), 1–17. [https://doi.org/10.25267/Rev\\_Eureka\\_ensen\\_divulg\\_cienc.2021.v18.i3.3201](https://doi.org/10.25267/Rev_Eureka_ensen_divulg_cienc.2021.v18.i3.3201)
- Argote Vega, F. E., Suarez Montenegro, Z. J., Tobar Delgado, M. E., Perez Alvarez, J. A., Hurtado Benavidez, A. M., & Delgado Ospina, J. (2017). Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 15(Edición Especial 2), 52. [https://doi.org/10.18684/bsaa\(15\).593](https://doi.org/10.18684/bsaa(15).593)
- Badawy, M. E. I., & Abdelgaleil, S. A. M. (2014). Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. *Industrial Crops and Products*, 52, 776–782. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.003>
- Balestrini, R., Lumini, E., Borriello, R., & Bianciotto, V. (2015). Plant-Soil Biota Interactions. In E. A. B. T.-S. M. Paul Ecology and Biochemistry (Fourth Edition) (Ed.), *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry* (pp. 311–338). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415955-6.00011-6>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79.

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

- Barrera Necha, L. L., & García Barrera, L. J. (2008). Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. aislado de papaya (*Carica papaya*). *Revista Científica UDO Agrícola*, 8(1995), 33–41. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3094829>
- Bashan, Y., Holguin, G., & Ferrera-Cerrato, R. (1996). Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. *Terra*, 14(2), 159–192.
- Bazile, D., Bertero, D., & Nieto, C. (2014). Estado del arte de la quinua en el mundo en 2013: FAO (Santiago de Chile) y CIRAD (Montpellier, Francia). *Perspectivas Nutracéuticas de La Quinua: Propiedades Biológicas y Aplicaciones Funcionales*. FAO Pp, 724.
- Becton Dickinson and Company. (2015). *BBL™ Crystal™ Identification Systems, Enteric/Nonfermenter ID Kit* (pp. 1–39). [https://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/8809241JAA\(02\).pdf](https://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/8809241JAA(02).pdf)
- Beltrán Pineda, M. E. (2015). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 15(1), 101–113. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol15\\_num1\\_art:401](https://doi.org/10.21930/rcta.vol15_num1_art:401)
- Beltrán Pineda, M. E., & Castellanos Roza, J. (2016). *Manual de prácticas de laboratorio de microbiología ambiental* (Primera). Universidad de Boyacá.
- Benítez, S., Bentley, J., Bustamante, P., Sánchez, L. C., & Corrales, L. (2007). Aislamiento de los microorganismos cultivables de la rizosfera de *Ornithogalum umbellatum* y evaluación del posible efecto biocontrolador en dos patógenos del suelo. *Nova*, 5(8), 147. <https://doi.org/10.22490/24629448.383>
- Benizri, E., Baudoin, E., & Guckert, A. (2001). Root Colonization by Inoculated Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Biocontrol Science and Technology*, 11(5), 557–574. <https://doi.org/10.1080/09583150120076120>
- Bermúdez-Vásquez, M. J., Granados-Chinchilla, F., & Molina, A. (2019). Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Psidium guajava* y *Cymbopogon citratus*. *Agronomía Mesoamericana*, 30(1 SE-Articles), 147–163. <https://doi.org/10.15517/am.v30i1.33758>
- Bowles, T. M., Acosta-Martínez, V., Calderón, F., & Jackson, L. E. (2014). Soil enzyme activities, microbial communities, and carbon and nitrogen availability in organic

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

- agroecosystems across an intensively-managed agricultural landscape. *Soil Biology and Biochemistry*, 68, 252–262.
- Cabrera, C. E. (2019). Actividad antimicrobiana de un sistema a base de un extracto vegetal y tres aceites esenciales Antimicrobial activity of a system based on a vegetable extract and three essential oils. *Ciencia e Investigación*, 22(1), 21–26.
- Camelo, M., Vera, S. P., & Bonilla, R. R. (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 12(2), 159–166. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol12\\_num2\\_art:227](https://doi.org/10.21930/rcta.vol12_num2_art:227)
- Carhuallanqui, A. P., Salazar, M. E. S., & Ramos, D. D. (2020). Efecto antimicrobiano del aceite esencial de Orégano frente a *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 22(1), 23–33. <https://doi.org/10.18271/ria.2020.530>
- Carrera, M. A. C., & Salazar, H. T. C. (2018). Análisis in vitro de la actividad biológica de aceites esenciales de orégano y tomillo en hongos fitopatógenos del arroz (*Oryza sativa* L.). *Ciencia e Ingeniería*, 5(1), 1–11.
- Carrillo, A. C., Rodríguez, N., & Rodríguez, C. (2018). Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos de *bidens pilosa*, *lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 13(2 SE-Artículos Científicos). <https://revistas.udca.edu.co/index.php/ruadc/article/view/738>
- Carrillo Gualancañay, I. P. (2019). *Evaluación para el aprovechamiento de las saponinas de los residuos de Quinoa (Chenopodium quinoa Willd) como inhibidoras de hongos fitopatógenos.* [Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/11163>
- Cerón R., L. E., & Aristizábal G., F. A. (2012). Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XIV(1), 285–295. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77624081026>
- Chávez, G., Tenorio, R., Mamani, M., Crespo, C., Espinal, C., & Álvarez, M. (2014). Potencial de cepas fúngicas aisladas en el área de Biotecnología Fúngica. Segunda parte: Biocontroladores fúngicos. In *Revista CON-CIENCIA* (Vol. 2, pp. 49–55). scielobo.
- Chumpitaz-Segovia, C., Alvarado, D., Ogata-Gutiérrez, K., & Zúñiga-Dávila, D. (2020). Bioprospection of native psychrotolerant plant-growth-promoting rhizobacteria from

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

- Peruvian Andean Plateau soils associated with *Chenopodium quinoa*. *Canadian Journal of Microbiology*, 66(11), 641–652. <https://doi.org/10.1139/cjm-2020-0036>
- Cid-Pérez, T., Ávila-Sosa, R., Ochoa-Velasco, C., Rivera-Chavira, B., & Nevárez-Moorillón, G. (2019). Antioxidant and Antimicrobial Activity of Mexican Oregano (*Poliomintha longiflora*) Essential Oil, Hydrosol and Extracts from Waste Solid Residues. *Plants*, 8(1), 22. <https://doi.org/10.3390/plants8010022>
- Colque-Little, C., Amby, D. B., & Andreasen, C. (2021). A Review of *Chenopodium quinoa* (Willd.) Diseases—An Updated Perspective. *Plants*, 10(6), 1228. <https://doi.org/10.3390/plants10061228>
- Companioni González, B., Domínguez Arizmendi, G., & García Velasco, R. (2019). Trichoderma: su potencial en el desarrollo sostenible de la agricultura . In *Biotecnología Vegetal* (Vol. 19, pp. 237–248). scielocu .
- Correa, M., Martínez, F., Patiño Vidal, C., Streitt, C., Escrig, J., & Lopez de Dicastillo, C. (2020). Antimicrobial metal-based nanoparticles: a review on their synthesis, types and antimicrobial action Open Access. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 11, 1450–1469. <https://doi.org/10.3762/bjnano.11.129>
- Coutinho, T. A., & Venter, S. N. (2009). *Pantoea ananatis* : an unconventional plant pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 10(3), 325–335. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00542.x>
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564–582. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.564>
- Cruces, L. M., Callohuari, Y., & Carrera, C. (2016). Quinoa: Manejo Integrado de plagas, estrategias en el cultivo de la quinoa para fortalecer el sistema agroalimentario en la zona andina. In *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*. <http://www.fao.org/publications/card/es/c/0336fc7c-a013-410d-9dec-ee8d0d0438f0/>
- Cruz-Triana, A., Rivero-González, D., Martínez-Coca, B., Echevarría-Hernández, A., & Tania-Rodríguez, A. (2017). Evaluación de la actividad antifúngica de *Trichoderma asperellum* Samuels ante patógenos fúngicos que afectan al cultivo de la soya (*Glycine max* L.) . In *Cultivos Tropicales* (Vol. 38, pp. 15–21). scielocu .
- Cubilla-Ríos, A., Ruíz-Díaz-Mendoza, D., Romero-Rodríguez, M., Flores-Giubi, M., & Barúa-Chamorro, J. (2019). Antibiosis of proteins and metabolites of three species of

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

- Trichoderma against paraguayana isolates of *Macrophomina phaseolina*. *Agronomía Mesoamericana*, 30(1 SE-Articles). <https://doi.org/10.15517/am.v30i1.34423>
- Dadasoglu, F., Aydin, T., Kotan, R., Cakir, A., Ozer, H., Kordali, S., Cakmakci, R., Dikbas, N., & Mete, E. (2011). Antibacterial activities of extracts and essential oils of three origanum species against plant pathogenic bacteria and their potential use as seed disinfectants. *Journal of Plant Pathology*, 93(2), 271–282. <http://www.jstor.org/stable/41998997>
- Danielsen, S., Bonifacio, A., & Ames, T. (2003). Diseases of Quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Food Reviews International*, 19(1–2), 43–59. <https://doi.org/10.1081/FRI-120018867>
- de Mello Prado, R. (2021). Phosphorus. In R. de Mello Prado (Ed.), *Mineral nutrition of tropical plants* (pp. 113–131). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-71262-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-71262-4_6)
- Dingle, T. C., & Butler-Wu, S. M. (2013). MALDI-TOF Mass Spectrometry for Microorganism Identification. *Clinics in Laboratory Medicine*, 33(3), 589–609. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2013.03.001>
- Dutkiewicz, J., Mackiewicz, B., Lemieszek, M. K., Golec, M., & Milanowski, J. (2016). *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part IV. Beneficial effects. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 23(2), 206–222. <https://doi.org/10.5604/12321966.1203879>
- El Hazzam, K., Hafsa, J., Sobeh, M., Mhada, M., Taourirte, M., EL Kacimi, K., & Yasri, A. (2020). An Insight into Saponins from Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd): A Review. *Molecules*, 25(5), 1059. <https://doi.org/10.3390/molecules25051059>
- Esquivel-Cote, R., Gavilanes-Ruiz, M., Cruz-Ortega, R., & Huante, P. (2013). Importancia agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa en rizobacterias, una revisión. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(3), 251–258.
- Ezziyyani, M., Sánchez, C. P., Requena, M. E., Rubio, L., & Castillo, M. E. C. (2004). Biocontrol por *Streptomyces rochei*–Ziyani–, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología*, 26, 61–68.
- FAO, & ALADI. (2014). Tendencias y perspectivas del comercio internacional de quinua. In *ALADI (Asociación Latinoamericana de Integración), FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura)*. <http://www.fao.org/3/i3583s/i3583s.pdf>



**BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA**

- Fernández, M. T. (2007). Fósforo: amigo o enemigo. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, *XLI*(2), 51–57. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223114970009>
- Fernández, R. J., & Suárez, C. L. (2009). Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *passiflorae* en maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. *Flavicarpa*) del municipio zona bananera colombiana. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, *62*(1), 4743–4748.
- Fonseca-Guerra, I., Chiquillo, C., Padilla, M., & Benavides-Rozo, M. (2021). First report of bacterial leaf spot on *Chenopodium quinoa* caused by *Pseudomonas syringae* in Colombia. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 1–4.
- Foysal, M. J., & Lisa, A. K. (2018). Isolation and characterization of *Bacillus* sp. strain BC01 from soil displaying potent antagonistic activity against plant and fish pathogenic fungi and bacteria. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *16*(2), 387–392. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.01.005>
- Fraile, P. G., Flores-Félix, J., Sanchez-Juanes, F., Rivas, R., Mateos, P., Peix, A., Igual, J., Velázquez, E., & Martínez-Molina, E. (2021). *Identification of quinoa seed bacterial endophytes and selection of strains for biofertilization of quinoa crops*.
- Galal-Gorchev, H. (1991). Dietary intake of pesticide residues: Cadmium, mercury, and lead. *Food Additives and Contaminants*, *8*(6), 793–806. <https://doi.org/10.1080/02652039109374038>
- García-Núñez, H. G., Martínez-Campos, Á. R., Hermosa-Prieto, M. R., Monte-Vázquez, E., Aguilar-Ortigoza, C. J., & González-Esquivel, C. E. (2017). Caracterización morfológica y molecular de cepas nativas de *Trichoderma* y su potencial de biocontrol sobre *Phytophthora infestans*. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, *35*(1), 58–79. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1605-4>
- García, R., & Palou, E. (2008). Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, *2*(2), 41–51.
- Gleń-Karolczyk, K., Witkowicz, R., & Boligłowa, E. (2016). In vitro study on the use of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) extracts from to limit the development of phytopathogenic fungi. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, *61*(3).
- Gomez, A., Bozari, S., Yanmis, D., Gulluce, M., Agar, G., & Sahin, F. (2016). The Use of

**BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA**

- Essential Oils of *Origanum rotundifolium* as Antimicrobial Agent Against Plant Pathogenic Bacteria. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19(3), 656–663. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.935052>
- Guédez, C., Cañizález, L., Castillo, C., & Olivar, R. (2009). Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria* spp) . In *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* (Vol. 29, pp. 34–38). scielon .
- Halifu, S., Deng, X., Song, X., Song, R., & Liang, X. (2020). Inhibitory Mechanism of *Trichoderma virens* ZT05 on *Rhizoctonia solani*. *Plants (Basel, Switzerland)*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/plants9070912>
- Hasan, Z. A. E., Mohd Zainudin, N. A. I., Aris, A., Ibrahim, M. H., & Yusof, M. T. (2020). Biocontrol efficacy of *Trichoderma asperellum*-enriched coconut fibre against *Fusarium* wilts of cherry tomato. *Journal of Applied Microbiology*, 129(4), 991–1003. <https://doi.org/10.1111/jam.14674>
- Heselpoth, R., & Nelson, D. (2012). A New Screening Method for the Directed Evolution of Thermostable Bacteriolytic Enzymes. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 69. <https://doi.org/10.3791/4216>
- Higa, T., & Parr, J. F. (2013). Microorganismos Benéficos y efectivos para una agricultura y medio ambiente sostenibles. *Maryland (USA): Centro Internacional de Investigación de Agricultura Natural, Departamento de Agricultura de Los Estados Unidos*, 13.
- Hinsinger, P. (2001). Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil*, 237(2), 173–195. <https://doi.org/10.1023/A:1013351617532>
- Horna, D., Sialer, C., Incio, M., Hernández, A., & Leiva, J. (2014). Antifúngicos de origen natural frente a los de síntesis química para el control de hongos fitopatógenos en *Chenopodium quinoa* “Quinoa.” *Revista Ingeniería: Ciencia, Tecnología e Innovación*, 1(1), 61–76.
- Norma técnica colombiana NTC 4092, Pub. L. No. NTC 4092, 85 (2009).
- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. In *Revista de Protección Vegetal* (Vol. 24, pp. 14–21). scielocu.
- Jiménez, J. M. T. (2020). *Evaluación de la actividad antifúngica in vivo del aceite esencial de*

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

- tomillo (*Thymus vulgaris*) en diferentes concentraciones contra *Colletotrichum acutatum* en cultivos de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) [Universidad Politécnica Salesiana].  
<https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/18718>
- Kalemba, D., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10(10), 813–829.  
<https://doi.org/10.2174/0929867033457719>
- Kumar, A., Prakash, A., & Johri, B. N. (2011). Bacillus as PGPR in Crop Ecosystem. In *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems* (pp. 37–59). Springer Berlin Heidelberg.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-642-18357-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-18357-7_2)
- Lee, S., Kim, H., Beuchat, L. R., Kim, Y., & Ryu, J.-H. (2020). Synergistic antimicrobial activity of oregano and thyme thymol essential oils against *Leuconostoc citreum* in a laboratory medium and tomato juice. *Food Microbiology*, 90, 103489.  
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103489>
- Leon Ttacca, B., Ortiz Calcina, N., Condori Ticona, N., & Chura Yupanqui, E. (2018). Cepas de *Trichoderma* con capacidad endofítica sobre el control del mildiu (*Peronospora variabilis* Gäum.) y mejora del rendimiento de quinua . In *Revista de Investigaciones Altoandinas* (Vol. 20, pp. 19–30). scielo .
- Li, T., Zhang, J., Tang, J.-Q., Liu, Z.-C., Li, Y.-Q., Chen, J., & Zou, L.-W. (2020). Combined Use of *Trichoderma atroviride* CCTCCSBW0199 and Brassinolide to Control *Botrytis cinerea* Infection in Tomato. *Plant Disease*, 104(5), 1298–1304.  
<https://doi.org/10.1094/PDIS-07-19-1568-RE>
- Llobet, J. M., Falcó, G., Casas, C., Teixidó, A., & Domingo, J. L. (2003). Concentrations of Arsenic, Cadmium, Mercury, and Lead in Common Foods and Estimated Daily Intake by Children, Adolescents, Adults, and Seniors of Catalonia, Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 838–842. <https://doi.org/10.1021/jf020734q>
- López-Ambrocio, R. M., Ruiz-Posadas, L. M., & Delgadillo-Martínez, J. (2016). Actividad antimicrobiana del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris* L.). *AGRO*.  
<https://mail.revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/849>
- Luengo, M. T. L. (2006). Tomillo: Propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas. *Offarm: Farmacia y Sociedad*, 25(1), 74–77.
- Luziatelli, F., Gatti, L., Ficca, A. G., Medori, G., Silvestri, C., Melini, F., Muleo, R., & Ruzzi,

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

- M. (2020). Metabolites Secreted by a Plant-Growth-Promoting *Pantoea agglomerans* Strain Improved Rooting of *Pyrus communis* L. cv Dar Gazi Cuttings. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 539359. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.539359>
- Mahdi, I., Fahsi, N., Hafidi, M., Benjelloun, S., Allaoui, A., & Biskri, L. (2021). Rhizospheric Phosphate Solubilizing *Bacillus atrophaeus* GQJK17 S8 Increases Quinoa Seedling, Withstands Heavy Metals, and Mitigates Salt Stress. In *Sustainability* (Vol. 13, Issue 6). <https://doi.org/10.3390/su13063307>
- Man, A., Santacroce, L., Jacob, R., Mare, A., & Man, L. (2019). Antimicrobial Activity of Six Essential Oils Against a Group of Human Pathogens: A Comparative Study. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, *8*(1), 15. <https://doi.org/10.3390/pathogens8010015>
- Manish, K., & K., S. P. (2005). Use of PCR Targeting of Internal Transcribed Spacer Regions and Single-Stranded Conformation Polymorphism Analysis of Sequence Variation in Different Regions of rRNA Genes in Fungi for Rapid Diagnosis of Mycotic Keratitis. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(2), 662–668. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.2.662-668.2005>
- Martínez-Valenzuela, C., & Gómez-Arroyo, S. (2007). Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. In *Revista internacional de contaminación ambiental* (Vol. 23, pp. 185–200). scielomx. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0188-49992007000400004&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992007000400004&lng=es&nrm=iso)
- Martínez, B., Infante, D., & Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos . In *Revista de Protección Vegetal* (Vol. 28, pp. 1–11). scielocu .
- Maximiliano, C., & Diego, H. (2016). *Perspectivas de producción de quinua en la región agrícola del centro de la provincia de Buenos Aires*. <https://digital.cic.gba.gob.ar/handle/11746/6289>
- Mayz-Figueroa, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista Científica UDO Agrícola*, *4*(1), 1–20.
- Méndez-Úbeda, J. M., Flores Hernández, M. S., & Páramo-Aguilera, L. . (2018). Aislamiento e identificación de *Bacillus subtilis* y evaluación del antagonismo in vitro frente hongos fitopatógenos. *Nexo Revista Científica*, *30*(2), 96–110. <https://doi.org/10.5377/nexo.v30i2.5530>

**BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA**

- Misra, V., & Ansari, M. I. (2021). *Role of Trichoderma in Agriculture and Disease Management BT - Plant Growth-Promoting Microbes for Sustainable Biotic and Abiotic Stress Management* (H. I. Mohamed, H. E.-D. S. El-Beltagi, & K. A. Abd-Elsalam (eds.)); pp. 425–440). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-66587-6\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-030-66587-6_15)
- Moreno Reséndez, A., García Mendoza, V., Reyes Carrillo, J. L., Vásquez Arroyo, J., & Cano Ríos, P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1), 68–83. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707>
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), 265–270. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>
- Negrete, P. S. (2012). Análisis del modo de acción de la capacidad antagonista de *Trichoderma asperellum* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium* sp. *Tumbaga*, 2(7), 3.
- Ortuño, N., Gutierrez, C., Claros Magnus, M., Angulo, M., & Castillo, J. A. (2014). Bacteria associated with the cultivation of quinoa in the Bolivian Altiplano and their biotechnological potential. *Revista de Agricultura*, 54, 53.
- Özkalp, B., Sevgi, F., Özcan, M., & Özcan, M. M. (2010). The antibacterial activity of essential oil of oregano (*Origanum vulgare* L.). *J Food Agric Environ*, 8(2), 6–8.
- Pando, L. G., & Castellanos, E. A. (2016). *Guía de cultivo de la quinua* (FAO y UNAL). recuperado de: <http://www.fao.org/3/a-i5374s.pdf>.
- Paster, N., Menasherov, M., Ravid, U., & Juven, B. (1995). Antifungal Activity of Oregano and Thyme Essential Oils Applied as Fumigants Against Fungi Attacking Stored Grain. *Journal of Food Protection*, 58(1), 81–85. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-58.1.81>
- Pimentel, M. F., Arnão, E., Warner, A. J., Subedi, A., Rocha, L. F., Srour, A., Bond, J. P., & Fakhoury, A. M. (2020). *Trichoderma* Isolates Inhibit *Fusarium virguliforme* Growth, Reduce Root Rot, and Induce Defense-Related Genes on Soybean Seedlings. *Plant Disease*, 104(7), 1949–1959. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-19-1676-RE>
- Ramírez R., J., Delgado Fernandez, E., Rodolfi, M., & Solveig, T. (2006). Actividad antagonista de hongos endófitos de plantas medicinales del Ecuador sobre bacterias patógenas. *Boletín Micológico*, 21. <https://doi.org/10.22370/bolmicol.2006.21.0.257>

**BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA**

- Rashid, M. I., Mujawar, L. H., Shahzad, T., Almeelbi, T., Ismail, I. M. I., & Oves, M. (2016). Bacteria and fungi can contribute to nutrients bioavailability and aggregate formation in degraded soils. *Microbiological Research*, *183*, 26–41. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.007>
- Relloso, M. S., Nievas, J., Fares Taie, S., Farquharson, V., Mujica, M. T., Romano, V., Zarate, M. S., & Smayevsky, J. (2015). Evaluación de la espectrometría de masas: MALDI-TOF MS para la identificación rápida y confiable de levaduras. *Revista Argentina de Microbiología*, *47*(2), 103–107. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.02.004>
- Restrepo-Franco, G. M., Marulanda-Moreno, S., de la Fe-Pérez, Y., Díaz-de la Osa, A., Lucia-Baldani, V., & Hernández-Rodríguez, A. (2018). Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, *46*(1 SE-), 63–76. <https://revista.cnic.edu.cu/index.php/RevBiol/article/view/95>
- Restrepo, L. A. M., Vianchá, L. M., & Ballesteros, J. P. (2005). Análisis de variables estratégicas para la conformación de una cadena productiva de quinua en Colombia. *INNOVAR. Revista de Ciencias Administrativas y Sociales*, *15*(25), 103–119.
- Richardson, A. E., Barea, J.-M., McNeill, A. M., & Prigent-Combaret, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil*, *321*(1–2), 305–339. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9895-2>
- Richardson, A. E., & Simpson, R. J. (2011). Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability Update on Microbial Phosphorus. *Plant Physiology*, *156*(3), 989–996. <https://doi.org/10.1104/pp.111.175448>
- Ríos, E. L. V. (2014). Caracteres principales, ventajas y beneficios agrícolas que aporta el uso de <em>Trichoderma</em> como control biológico. *Revista Científica Agroecosistemas*, *2*(1 SE-Reseñas). <https://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes/article/view/40>
- Rodriguez-Garcia, I., Silva-Espinoza, B. A., Ortega-Ramirez, L. A., Leyva, J. M., Siddiqui, M. W., Cruz-Valenzuela, M. R., Gonzalez-Aguilar, G. A., & Ayala-Zavala, J. F. (2016). Oregano Essential Oil as an Antimicrobial and Antioxidant Additive in Food Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *56*(10), 1717–1727. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.800832>

**BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA**

- Rodríguez-Romero, M. del C. J.-V. and A. S. (2008). Integración de microorganismos benéficos (Hongos micorrícicos y bacterias izoféricas) en agrosistemas de las Islas Canarias. In *Integration of beneficial microorganisms (mycorrhizal fungi and rhizospheric bacteria) in the Canary Islands agrosystems*. Servicio de Publicaciones - Universidad de Murcia. <http://hdl.handle.net/10201/23826>
- Rodríguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., & Bashan, Y. (2006). Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil*, 287(1–2), 15–21. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9056-9>
- Rojas Badía, M. M., Sánchez Castro, D., Rosales Perdomo, K., & Lugo Moya, D. (2017). Antagonism of Bacillus against fungi of the genus Fusarium, pathogens of vegetables. *Revista de Protección Vegetal*, 32(2). [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522017000200005&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522017000200005&nrm=iso)
- Rojas, W., Alandia, G., Irigoyen, J., & Blajos, J. (2011). La Quinoa: Cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial. In *Oficina Regional para América Latina y el Caribe, FAO* (Vol. 37). <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2009.03.010>
- Rueda-Puente, E. O., Juvera Bracamontes, J. J., Romo López, I. G., & Holguín Peña, R. J. (2018). Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales de orégano y tomillo contra Ralstonia solanacearum. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(20), 4251–4261. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i20.995>
- Salinas, E. S. (2018). Riesgos y estrategias en el uso de plaguicidas. *Inventio, La Génesis de La Cultura Universitaria En Morelos*, 7(14), 21–28. <http://inventio.uaem.mx/index.php/inventio/article/view/421>
- Sallam, N. M. A., Eraky, A. M. I., & Sallam, A. (2019). Effect of Trichoderma spp. on Fusarium wilt disease of tomato. *Molecular Biology Reports*, 46(4), 4463–4470. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04901-9>
- Shafique, S., Shafique, S., Javed, A., Akhtar, N., & Bibi, S. (2019). Analysis of Antagonistic Potential of Secondary Metabolites and Organic Fractions of Trichoderma Species against Alternaria Alternata. *Biocontrol Science*, 24(2), 81–88. <https://doi.org/10.4265/bio.24.81>
- Sharifzadeh, A., Khosravi, A. R., & Ahmadian, S. (2016). Chemical composition and antifungal activity of Satureja hortensis L. essential oil against planktonic and biofilm growth of

## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

- Candida albicans* isolates from buccal lesions of HIV+ individuals. *Microbial Pathogenesis*, 96, 1–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.04.014>
- Solís, P. N. C. (2012). *Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de los Aceites Esenciales de Orégano (Origanum vulgare L.) y Tomillo (Thymus vulgaris L.) como Potenciales Bioconservadores en Carne de Pollo.* [Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. <http://dspace.espoch.edu.ec/handle/123456789/1992>
- Souza, E. L. de, Stamford, T. L. M., & Lima, E. de O. (2006). Sensitivity of spoiling and pathogen food-related bacteria to *Origanum vulgare* L.(Lamiaceae) essential oil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37, 527–532.
- Suárez Meza, C. L., Fernández Barbosa, R. J., Valero, N. O., Gámez Carrillo, R. M., & Páez Redondo, A. R. (2008). Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. *Revista Colombiana de Biotecnología*, X(2), 35–43. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77610205>
- Tao, L., Zhang, Y., Li, Y., Luo, L., Zhang, Z., & Chen, J. (2020). [Antagonistic activity of volatile metabolites from *Trichoderma asperellum*]. *Sheng wu gong cheng xue bao = Chinese journal of biotechnology*, 36(6), 1181–1189. <https://doi.org/10.13345/j.cjb.190442>
- Tapia, M. E., & Fries, A. M. (2007). *Guía de campo de los cultivos andinos*. FAO, ANPE-PERÚ. <https://runamaqui.fr/wp-content/uploads/2020/07/FAO-Los-cultivos-andinos-documento-completo.pdf>
- Tejera-Hernández, B., Rojas-Badía, M. M., & Heydrich-Pérez, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 42(3), 131–138. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181222321004>
- Truyens, S., Jambon, I., Croes, S., Janssen, J., Weyens, N., Mench, M., Carleer, R., Cuypers, A., & Vangronsveld, J. (2014). The Effect of Long-Term Cd and Ni Exposure on Seed Endophytes of *Agrostis capillaris* and Their Potential Application in Phytoremediation of Metal-Contaminated Soils. *International Journal of Phytoremediation*, 16(7–8), 643–659. <https://doi.org/10.1080/15226514.2013.837027>
- Usano-Aleman, J., Paúl, J. P., & Díaz, S. (2014). Aceites esenciales: conceptos básicos y actividad antibacteriana. *Reduca (Biología)*, 7(2).



## BIOCONTROL SOBRE FITOPATÓGENOS DE QUINUA

<http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/1553>

- van Diepeningen, A. D., de Vos, O. J., Korthals, G. W., & van Bruggen, A. H. C. (2006). Effects of organic versus conventional management on chemical and biological parameters in agricultural soils. *Applied Soil Ecology*, *31*(1–2), 120–135.
- Velasco-Jiménez, A., Rodríguez-Sahagún, A., Castellanos-Hernández, O., Acevedo-Hernández, G., & Clarenc Aarland, R. (2020). Bacterias rizosféricas con beneficios potenciales en la agricultura. *REVISTA TERRA LATINOAMERICANA*, *38*(2), 333–345. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i2.470>
- Walterson, A. M., & Stavrinides, J. (2015). Pantoea: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiology Reviews*, *39*(6), 968–984. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv027>
- Wolf, G. A., van der Wolf, J., Birnbaum, Y. E., Zouwen, & Groot, S. (2008). Disinfection of vegetable seed by treatment with essential oils, organic acids and plant extract. *Seed Science and Technology* *36* (2008).
- Yañez-Yazlle, M. F., Romano-Armada, N., Acreche, M. M., Rajal, V. B., & Irazusta, V. P. (2021). Halotolerant bacteria isolated from extreme environments induce seed germination and growth of chia (*Salvia hispanica* L.) and quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) under saline stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *218*, 112273. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112273>
- Yazici, S., Yanar, Y., & Karaman, I. (2011). Evaluation of bacteria for biological control of early blight disease of tomato. *African Journal of Biotechnology*, *10*(9), 1573–1577. <https://doi.org/10.5897/AJB10.1718>
- Zboromyrska, Y. (2014). Aplicaciones del Maldi-tof en el laboratorio de microbiología. *Educ Contin En El Lab Clínico*, *20*(ISSN 1887-6463), 87–98. <https://www.seqc.es/download/tema/3/2773/64814485/2019279/cms/tema-8-aplicaciones-del-maldi-tof-en-el-laboratorio-de-microbiologia.pdf/>
- Zhou, J., He, Z., Yang, Y., Deng, Y., Tringe, S. G., & Alvarez-Cohen, L. (2015). High-Throughput Metagenomic Technologies for Complex Microbial Community Analysis: Open and Closed Formats. *MBio*, *6*(1), e02288-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.02288-14>