

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Bacterias solubilizadoras de fosfato
que forman biopelículas sobre hifas
extrarradicales de hongos
formadores de micorrizas y su
relación en la nutrición vegetal del
fósforo**

Belén Rocío Fernández Casanova

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Agronomía
Bogotá, Colombia
2022

Bacterias solubilizadoras de fosfato que forman biopelículas sobre hifas extrarradicales de hongos formadores de micorrizas y su relación en la nutrición vegetal del fósforo

Belén Rocío Fernández Casanova

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Agrarias

Directora:

Ph.D., Alia Rodríguez Villate

Codirector:

Ph.D., Daniel Uribe Vélez

Línea de Investigación:

Suelos y Aguas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Agronomía

Bogotá D.C., Colombia

2022

Dedico este trabajo a mis padres –dos grandes seres que están en el cielo, y mi madre, que ora por mí todos los días aquí en la tierra-. A mi esposo y mis hijitos, que son la fuerza del amor más puro que motiva mis días.

Declaración de obra original

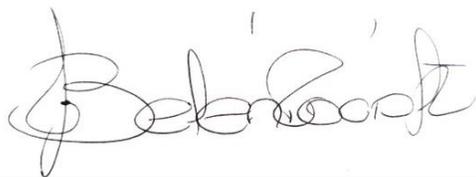
Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Nombre: Belén Rocío Fernández Casanova

Fecha DD/MM/AAAA

Fecha 27/03/2022

Agradecimientos

Agradezco a Dios por su infinita misericordia y haberme permitido llevar a cabo mi maestría y lograr su culminación.

A mis padres por su formación, ejemplo de tenacidad, amor infinito y apoyo incondicional.

A mi esposo por su compañía, apoyo, fuerza, motivación y paciencia.

A mis hijos por su compañía en el proceso desde mi vientre, su amor puro y motivación diaria.

A mi familia Fernández Casanova y Martínez Cardozo, por cuidar de mí, por su amor, presencia, oraciones y comprensión.

A Margarita López por siempre estar ahí, por su ayuda, tiempo de dedicación, gran corazón, profesionalismo, buen juicio y amistad.

A Marcela Ordoñez por generar la base del proyecto y brindarme su guía y amistad.

A los profesores Alia Rodríguez y Daniel Uribe por darme la oportunidad en este proyecto, por acogerme y apoyarme, por su guía y conocimiento, por sus correcciones siempre en sintía, palabras acertadas, dedicación y respaldo a pesar del tiempo transcurrido.

Al profesor Ian Sanders de la Universidad de Lausanne, por proporcionarnos el aislado de *Rhizophagus irregularis* y su gran aporte para la publicación de los resultados en el artículo científico.

A la Universidad Nacional de Colombia por darme la oportunidad de cursar mi maestría, y brindarme la mayor parte de los recursos para su desarrollo.

A Isabel Ceballos por su ayuda en lo estadístico, su motivación y amistad.

Al laboratorio de biotecnología de la Facultad de Agronomía, Ruben y todos los involucrados allí, por recibirme, acogerme y facilitarme el desarrollo de la tesis.

Al laboratorio de biología por recibirme y permitirme finalizar los experimentos.

Al laboratorio del IBUN por su guía en algunos procesos.

A Franci Cárdenas y a todos los seres que Dios puso en mi camino con su luz, para ayudarme a lograr la culminación de este gran proyecto.

Resumen

Bacterias solubilizadoras de fosfato que forman biopelículas sobre hifas extrarradicales de hongos formadores de micorrizas y su relación en la nutrición vegetal del fósforo

La papa es el cultivo no cerealero más grande del mundo, el cuarto cultivo de importancia para la seguridad alimentaria mundial, y actualmente, uno de los productos más encarecidos de la canasta familiar por los altos costos de producción debido en parte a los precios de los fertilizantes. El fósforo (P) es un elemento esencial y uno de los que se usa en mas altas dosis en el cultivo de papa, representando un alto porcentaje del costo de la fertilización. Se ha planteado el uso de microorganismos del suelo que potencialmente pueden interactuar sinérgicamente en beneficio del P, es el caso de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) y bacterias solubilizadoras de fósforo (BSF), sin embargo, se deben estudiar sus interacciones. Este trabajo evaluó la interacción de cepas de BSF *Pseudomonas fluorescens*, y el HFMA *Rhizophagus irregularis*, bajo dos escenarios, *in vitro* e *in vivo*. Se midieron la formación de biopelícula y motilidad de las cepas bacterianas, su influencia en el crecimiento y colonización del hongo, así como la concentración de P foliar de plantas papa criolla. Se encontró que cepas de *P. fluorescens* formaron biopelículas sobre hifas de *R. irregularis*, influyeron en el crecimiento del HFMA y en la colonización de raíces de papa. Su co-inoculación en suelos para la producción de papa, generaron incrementos en el contenido de P foliar de plantas de papa en presencia de una comunidad microbiana, con roca fosfórica, lo cual puede ser una alternativa para reemplazar el uso de fuentes de P soluble.

Palabras clave: HFMA, BSF, fósforo, biopelículas.

Abstract

Phosphate-solubilizing bacteria that form biofilms on extraradical hyphae of mycorrhizal fungi and their relationship in phosphorus plant nutrition

The potato is the largest non-cereal crop in the world, the fourth most important crop for global food security, actually, one of the most expensive products of the cost of living due to high production costs due in part to fertilizer prices. Phosphorus (P) is an essential element and one of the highest doses of application in potato cultivation, representing a high percentage of fertilization costs. The use of soil microorganisms that can potentially interact synergistically for the benefit of P has been proposed, as is the case of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and phosphorus-solubilizing bacteria (PSB), however, much remains to be studied of their interactions. This study evaluated the interaction between strains of PSB *Pseudomonas fluorescens*, and AMF *Rhizophagus irregularis*, under two scenarios, *in vitro* and *in vivo*. Biofilm formation and motility of the bacterial strains were measured, as well as their influence on the growth and colonization of the fungus, and the foliar P concentration of potato plants. It was found that *P. fluorescens* strains formed biofilms on *R. irregularis* hyphae, influenced the growth of AMF and the colonization of potato roots. Its co-inoculation in soils for potato production generated increases in the foliar P content of potato plants in the presence of a microbial community, with phosphate rock, which can be an alternative to replace the use of soluble P sources, which can be polluting and expensive.

Keywords: AMF, PSB, phosphorous, biofilm.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras	XV
Lista de tablas	XVII
Introducción	1
1. Materiales y métodos	9
1.1 Inóculos microbianos	10
1.1.1 Hongo formador de micorriza arbuscular.....	10
1.1.2 Bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF)	10
▪ Formación de biopelículas de las cepas de <i>P. fluorescens</i>	11
▪ Pruebas de motilidad por swarming y swimming.....	12
1.2 Formación de biopelículas sobre hifas extrarradicales del hongo FMA <i>in vitro</i> .	13
1.3 Evaluación del efecto de la co-inoculación de BSF y HFMA en la transferencia de fósforo (P) en plantas de papa sembradas en materas	16
1.3.1 Material vegetal	16
1.3.2 Descripción de los tratamientos en materas.....	16
1.3.3 Establecimiento de los tratamientos en las materas	18
1.3.4 Concentración de P en tejido foliar	19
1.3.5 Estimación de la colonización bacteriana rifampicina resistentes	20
1.3.6 Colonización de raíces por HFMA	20
1.3.7 Acumulación de materia seca	21
1.4 Análisis estadístico.....	21
2. Resultados	23
2.1 Formación de Biopelículas de las Cepas de BSF	23
2.2 Pruebas de Motilidad por Swarming y Swimming	24
2.3 Formación de Biopelículas sobre Hifas Extrarradicales del HFMA <i>in vitro</i>	26
2.3.1 Longitud de micelio MA extrarradical y número de esporas	29
2.4 Evaluación del Efecto de la Co-inoculación de BSF y HFMA en la Transferencia de Fósforo (P) en Plantas de Papa Sembradas en Materas	31
2.4.1 Concentración de P en tejido foliar	31
2.4.2 Estimación de la colonización bacteriana rifampicina resistentes	32
2.4.3 Colonización de raíces por HFMA	33
2.4.4 Acumulación de materia seca	35
3. Discusión.....	37

4. Conclusiones y recomendaciones	47
A. Anexo: Medios de cultivo y soluciones.....	51
▪.....	51
▪.....	52
B. Anexo: UFC.mL⁻¹ de las cepas bacterianas de <i>Pseudomonas fluorescens</i> para absorvancia DO: 0,200 +/-0,05.....	55
C. Anexo: Determinación de concentración de fosfatos en tejido vegetal.....	57
D. Anexo: Cálculos de la fertilización de las materas de papa criolla (<i>Solanum thuberosum</i>)	61
E. Anexo: Fotografías de biopelículas de las 10 cepas evaluadas de <i>P. fluorescens</i> sobre hifas de <i>R. irregularis</i> en el cultivo <i>in vitro</i> de raíces transformadas de zanahoria.....	67
F. Anexo: Resultados del análisis estadístico	69
Bibliografía	77

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1.1-1: Esquema del desarrollo de las actividades y mediciones, en la investigación.....	9
Figura 1.2-1: Esquema de la caja de Petri con dos compartimentos para establecer el cultivo <i>in vitro</i> del hongo formador de Micorriza Arbuscular (MA) <i>R. irregularis</i> . Tomado de Bücking y Shacha (2005).....	14
Figura 1.2-2: Cultivo <i>in vitro</i> de HFMA <i>Rhizophagus irregularis</i> DAOM197198, con raíces transformadas de zanahoria (compartimento “de la raíz”). Se observan los puntos de inoculación bacteriana en el compartimento “de la hifa” (marcados con puntos negros).....	15
Figura 1.2-3: Esquema representativo del método de intersección lineal (Tennant, 1975) usado para la determinación de la longitud de hifas con presencia de biopelículas. Los puntos rojos corresponden a las intersecciones de las hifas en las cuadrículas.	15
Figura 2.1-1: Placa de polipropileno con la formación de biopelículas visibles por la tinción azul del cristal violeta (anillos presentes en cada pozo), cada fila de pozos es un tratamiento diferente con varias repeticiones. De izquierda a derecha los pozos corresponden a las cepas P28, P29, P36, P63, P74, P80, P95, P102, P104, P108 y el control.....	23
Figura 2.1-2: Cuantificación de la formación de biopelícula sobre una superficie abiótica de las diez cepas de <i>Pseudomonas fluorescens</i> . Letras diferentes indican diferencias significativas por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).	24
Figura 2.2-1: Capacidad swarming de las diez cepas de <i>Pseudomonas fluorescens</i> . Letras diferentes indican diferencias significativas por la prueba de Tukey ($P < 0.05$). ...	25
Figura 2.2-2: Motilidad por swarming de cepas de <i>Pseudomonas fluorescens</i> . Cepa P74 (A), Cepa P36 (B), Cepa P28 (C) y Cepa P95 (D).	25
Figura 2.2-3: Motilidad por <i>swimming</i> de cepas de <i>Pseudomonas fluorescens</i> . Cepa P29 (A), Cepa P80 (B).	26
Figura 2.2-4: Capacidad <i>Swimming</i> de las diez cepas de <i>Pseudomonas fluorescens</i> . Letras diferentes indican diferencias significativas por la prueba de Tukey ($P < 0.05$). ...	26
Figura 2.3-1: A la izquierda, sistema de cultivo <i>in vitro</i> de raíces de zanahoria micorrizadas con inoculación de la cepa P29. A la derecha, se observa directamente en la caja de Petri, el desarrollo de las biopelículas sobre las hifas de <i>R. irregularis</i> a partir de un punto de inoculación. Los puntos pequeños, abundantes y blancos que muestra la fotografía de la derecha, son esporas del HFMA.	27

Figura 2.3-2: Formación de biopelícula de la cepa P74 sobre una hifa extrarradical de <i>R. irregularis</i> (HFMA, Hongo Formador de Micorriza Arbuscular) en el sistema de cultivo <i>in vitro</i> de raíces micorrizadas de zanahoria.....	27
Figura 2.3-3: Fotografías de las biopelículas sobre la hifa de <i>R. irregularis</i> en el cultivo <i>in vitro</i> . Crecimiento de las biopelículas: A. Alrededor de las estructuras ramificadas de absorción (BAS). B. Sobre y a lo largo de la hifa. C. Alrededor de hifas secundarias.	27
Figura 2.3-4: Longitud de hifa con presencia de biopelícula de las 10 cepas bacterianas de <i>Pseudomonas fluorescens</i> en cultivo <i>in vitro</i> . Letras diferentes indican diferencias significativas por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).....	28
Figura 2.3-5: Longitud de hifa de <i>R. irregularis</i> en la presencia de las 10 cepas bacterianas de <i>Pseudomonas fluorescens</i> en un cultivo <i>in vitro</i> . Letras diferentes indican diferencias significativas por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).	29
Figura 2.3-6: Número de esporas de <i>R. irregularis</i> en interacción con las 10 cepas bacterianas de <i>Pseudomonas fluorescens</i> en un cultivo <i>in vitro</i> . Letras diferentes indican diferencias significativas por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).	30
Figura 2.4-1: Concentración de P en tejido foliar de plantas de <i>S. tuberosum</i> grupo phureja (papa cultivar Criolla Colombia) con diferentes tratamientos. 10 tratamientos, co-inoculados con diez cepas de <i>P. fluorescens</i> (P28 – P108) y <i>R. irregularis</i> (HFMA) y fertilizados con roca fosfórica (P insoluble). Tratamiento HFMA+P Insol.: Con <i>R. irregularis</i> y roca fosfórica. Tratamiento P Sol.: No co-inoculado y fertilizado con P soluble. Tratamiento P Insol.: No co-inoculado y fertilizado con roca fosfórica. Tratamiento No P: No Co-inoculado ni fertilizado. Letras diferentes indican diferencias significativas por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).....	31
Figura 2.4-2: Porcentaje de longitud de raíz de papa colonizada por HFMA en las plantas de las materas con contenido de suelo no estéril. Letras diferentes indican diferencias significativas por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).	34
Figura 2.4-3: Porcentaje de longitud de raíz de papa con colonización micorrízica metabólicamente activa por HFMA en las plantas de las materas con contenido de suelo no estéril. Letras diferentes indican diferencias significativas por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).	34
Figura 2.4-4: Acumulación de materia seca en raíces y parte aérea de plantas de papa cultivar Criolla Colombia co-inoculadas con diez cepas de <i>P. fluorescens</i> (P28 – P108) y <i>R. irregularis</i> (HFMA) y fertilizadas con roca fosfórica (P. insol.) y una fuente de P soluble (P. sol.). Letras diferentes indican diferencias significativas por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).	36

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1.1-1: Cepas de <i>Pseudomonas fluorescens</i> utilizadas y su lugar de aislamiento	11
Tabla 1.3-1: Descripción de los tratamientos de la evaluación en materas.	17
Tabla 1.3-2: Concentración de cepas de <i>P. fluorescens</i> en la superficie de tubérculos de papa.....	18
Tabla 2.4-1: Concentración de bacterias resistentes a rifampicina en el suelo rizosférico de las plantas de papa en los tratamientos inoculados y no inoculados.	33

Introducción

Actualmente estamos viviendo un aumento excesivo de los precios de los fertilizantes. De acuerdo al DANE, en enero de 2022 subieron los precios del 51,6% de los fertilizantes, algunos hasta más del 100% de su precio respecto a enero de 2021. Esto consecuentemente ha provocado un alza generalizada de los precios de los alimentos. Por ejemplo, la papa subió un 140% respecto a enero de 2021, convirtiéndose en el producto más encarecido de la canasta familiar del momento (DANE, 2022). Y precisamente, la papa, el cultivo no cerealero más grande del mundo que ocupa una posición importante para la seguridad alimentaria mundial (Lu et al., 2021), está hoy en uno de los peores escenarios por los altos costos de producción debido a los fertilizantes. La papa, en términos de seguridad alimentaria, tiene múltiples ventajas frente a otros cultivos. Este producto es de alto contenido energético, puede producirse mayor cantidad en menos área, con menos agua y en climas más agrestes, en comparación con otros cultivos importantes. Por ejemplo, por cada metro cúbico de agua aplicado en el cultivo, la papa produce 5.600 calorías de energía alimentaria frente a 3.800 del maíz, 2.300 del trigo y 2.000 del arroz (FAO, 2008). Produce en promedio 21,8 toneladas (t) de papa en una hectárea, frente a 5,8 t de maíz, 7,7 t de arroz y 3,5 t de trigo en la misma área (FAOSTAT, 2020). En el cultivo de papa hasta el 85% de la planta es para alimento humano en comparación con alrededor del 50% en el caso de los cereales (Lu et al., 2021; FAO, 2008). Recientes estudios han encontrado que la papa tiene un aporte de proteína con valores nutricionales y funcionales más significativos que otras proteínas vegetales y cereales, alto contenido de aminoácidos esenciales necesarios para el cuerpo humano, además que sus proteínas no generan alergias y tienen actividad selectiva contra las células cancerosas (Hussain et al., 2021). Esto sucede porque el tipo de proteína de la papa contiene un alto valor biológico (BV) de 90, en comparación con la soya (BV de 84) y el frijol (BV de 73), respecto a un valor de referencia de 100 del huevo, que es el alimento cuya proteína presenta el mayor valor biológico (McGill et al., 2013).

La papa ha tenido un importante aumento de la producción y demanda en Asia, África y América Latina, donde la producción pasó de menos de 30 millones de toneladas a principios del decenio de 1960 a más de 240 millones en el 2016, debido a su inclusión dentro de la categoría de seguridad alimentaria (Pérez y Villareal, 2019). Esto, ha demandado gran exigencia a la agricultura tradicional y tecnificada, para generar los rendimientos requeridos para el cultivo, teniendo en cuenta las diversas condiciones físico químicas del suelo, condiciones climáticas y las enfermedades y plagas, entre otros. La papa se cultiva en latitudes que van desde los 65°N hasta los 50°S y altitudes que varían desde el nivel del mar hasta los 4.000 msnm (Gebhardt, 2013). Desde el punto de vista de la productividad agrícola, la nutrición mineral es uno de los factores más limitantes en su crecimiento y por lo tanto, es necesario el manejo óptimo de nutrientes y fertilización en el sistema productivo de papa (Schilling et al., 2016; Gómez, 2018), siendo esta una de las especies de mayor demanda nutricional (Kumar et al., 2013; Bertsch 2003). El P (fósforo) es uno de los elementos más demandados en el cultivo de papa, después del K (potasio) y el N (nitrógeno), con valores de absorción de 0,9 kg.t⁻¹. Sin embargo, debido a la baja eficiencia de fertilización del fósforo que puede estar entre 10 y el 40% (Gómez y Castro, 2013), este es aplicado dos o más veces que el K y el N, es el caso del 13-26-6, el fertilizante de NPK más utilizado en el cultivo de papa en los principales departamentos productores (SIRIAGRO, 2021). El P es un elemento esencial para el desarrollo de las plantas, promueve el crecimiento de las raíces, la rápida formación de tubérculos y tiene gran incidencia en la síntesis de almidón (Chung et al., 2014; Leonel et al., 2016).

Los suelos Andisoles Colombianos donde predominantemente se cultiva la papa, tienen una condición especial por tener pH ácidos, alta retención de P y formación de precipitados con hierro y aluminio, lo cual disminuye su disponibilidad (Gómez y Castro, 2013). Esta es la razón por la cual los agricultores usan hasta cuatro veces más fertilizante que el requerido para una producción óptima de cultivos, ya que hasta el 80% del P inorgánico suministrado nuevamente se fija en complejos insolubles (Johri et al., 2015). Así, esto ha conllevado a un consumo creciente de fertilizantes fosforados, que bajo las condiciones actuales de precios internacionales no podrá mantenerse. En Colombia la producción promedio de fosfatos por año está en el orden de 60.377 t, con una proyección de crecimiento de la demanda del mercado del 27% al 2035, según afirma la Unidad de Planeación Minero Energética (Quinde, 2021). Este escenario se replica a nivel global, dado que, aunque el suelo pueda contener reservas de P que podrían ser en cantidades

muy superiores a las requeridas para el crecimiento de las plantas, solo una fracción está disponible (Sohrt et al., 2017). Esto sucede, bien sea por los contenidos de hierro y aluminio en suelos ácidos, por ejemplo, de los suelos Andisoles, o por los contenidos de calcio en suelo alcalinos (Banerjee et al., 2010). De acuerdo con los datos reportados por la Asociación Internacional de los Fertilizantes (IFA), el consumo global de fertilizantes fosforados tuvo un aumento de cuatro veces entre los años 1961 a 2015, y de 2,4% al 2019 con 46,4 millones de t (FAOSTAT, 2021), y la tendencia de consumo para el 2022 es de 49,1 millones de t según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2019). Sin embargo, los especialistas advierten que las reservas de P podrían agotarse en alrededor de 70 a 300 años con una demanda máxima de P alrededor del año 2030 (Kauwenbergh, 2010; Cordell et al., 2009). Este gran aumento del uso de fertilizante fosforados no solo debe frenarse porque es un elemento con reservas globales finitas, sino que genera también problemas ambientales y de salud humana significativos (Bindraban et al., 2020), con costos que serán insostenibles en el tiempo.

En una reciente revisión del tema, Owen et al. (2015) apuntan a que el exceso de fósforo almacenado en el suelo y proveniente del superávit producto de la fertilización fosfatada, es alrededor de 1000 kg ha⁻¹ en suelos agrícolas, para el caso de Gran Bretaña. Así, autores alrededor del mundo han hecho un llamado a la optimización en la aplicación de fertilizantes de P y una mejor explotación de las reservas existentes en el suelo (Owen et al., 2015; Withers et al., 2014; Ceballos et al., 2013; Elser y Bennett, 2011; Cordell et al., 2011). Si se tuviera en cuenta el P de las reservas del suelo en la planificación de nutrientes, se ha estimado que esto podría reducir la necesidad de fertilizante inorgánico en un 50% (Sattari et al., 2012). Y es en el aprovechamiento de estas reservas del suelo donde se podría tener una estrategia viable, para incorporar en planes integrales de agricultura sostenible. Esta estrategia tiene su base en el uso de microorganismos del suelo que participan directamente en el ciclo del fósforo y que presentan adaptaciones en sus estilos de vida para la exploración y explotación del fósforo en el suelo. Tal es el caso de los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) y las bacterias solubilizadoras de fósforo (BSF) que establecen relaciones con las plantas e interactúan entre ellos dependiendo de la disponibilidad de P (Zhang et al., 2016).

Los HFMA han desarrollado una relación simbiótica con las plantas terrestres desde que estas colonizaron la tierra hace aproximadamente 450 millones de años, y se presume que

intervinieron en esta importante transición evolutiva (Chaturvedi et al., 2021). Su reciente reclasificación, los ubica en el filo Mucoromycota, subfilo Glomeromycotina (Spatafora et al., 2017). Los HFMA están presentes en la mayoría de los suelos y a través de sus redes de hifas, tienen la capacidad de llegar a zonas donde la raíz no llega para explorar el suelo en búsqueda de fósforo (P) u otros nutrientes que necesita la planta hospedadora. A cambio los hongos reciben de la planta fuentes de carbono, como azúcares, derivados de los fotosintatos de plantas y lípidos que no puede sintetizar (Smith y Read, 2008; Keymer et al., 2017). Esta se considera una relación simbiótica obligada, donde el ciclo de vida de los HFMA se completa a través de la colonización con sus hospedadores (Sugiura et al., 2019).

Los HFMA forman asociaciones con raíces en aproximadamente el 80% de las especies de plantas (Chaturvedi et al., 2021). La zona del suelo influenciada por las raíces y los hongos micorrícicos se conoce como micorrizósfera (Johansson et al., 2004), y aunque aún falta mucho por conocer del efecto de la colonización fúngica micorrícica arbuscular en la comunidad microbiana del suelo, se ha encontrado que es en la micorrizósfera en donde tienen lugar los exudados de los HFMA, lo que influencia el crecimiento de otros microorganismos como las bacterias (Akyol et al., 2019; Toljander et al., 2007; Toljander et al., 2006). Algunos estudios muestran cómo las comunidades bacterianas e incluso comunidades de otros hongos, sufren cambios en su composición debido a la presencia de HFMA (Akyol et al., 2019; Rodríguez et al., 2017; Viollet et al., 2017; Nuccio et al., 2013). Se presentan también efectos sinérgicos, por lo que los exudados producto de la asociación micorrícica arbuscular, pueden contribuir en la estimulación del crecimiento vegetal (Cano, 2011; King, 2011).

Cuando se habla de los HFMA y su capacidad de traslocar a la planta solo fuentes de P soluble del suelo (Tisserant et al., 2013), las interacciones de estos importantes hongos del suelo con especies bacterianas que tienen la capacidad de solubilización de P, presentan gran relevancia. Algunos géneros bacterianos son, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* y *Rhizobium* (Browne et al., 2009; Uribe et al., 2010), siendo las *Pseudomonas fluorescens* una de las especies más estudiadas. Así, se ha identificado que además de presentar gran capacidad para solubilizar P, producen otros compuestos de beneficio para la planta (Showkat et al., 2012). Estas bacterias solubilizadoras de fósforo (BSF) son de vida libre y se encuentran en la mayoría de los suelos (Santillana, 2006),

solubilizan el P orgánico e inorgánico a través de diferentes mecanismos como: bajar el pH del suelo, la síntesis de fosfatasas, síntesis de quelantes de P de Al^{3+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} y Ca^{2+} con la ayuda de ácidos orgánicos (Browne et al., 2009). El P ya solubilizado presente en el suelo puede ser interceptado por las raíces y llegar a la planta. Esta es la forma de absorción directa de P, facilitada por los propios transportadores de P de la planta. Así mismo, puede haber una absorción indirecta a través de la simbiosis micorrizicas arbusculares, donde la planta hospedadora obtiene P principalmente del socio fúngico quien lo transporta a través de sus hifas (Johri et al., 2015). Esta segunda forma de absorción del P, tiene mayor probabilidad de ocurrencia dado el gran volumen del suelo que alcanzan las hifas del hongo *versus* el volumen que alcanzan las raíces. En este contexto, Peña y Cardona (2010), afirman que la efectividad de movilización de nutrientes hacia la planta se puede aumentar hasta 40 veces más con la asociación de micorrizas arbusculares, ya que un pelo radical puede absorber los nutrientes a 2 mm a la redonda y con las hifas del micelio extrarradical se logra explorar hasta 80 mm.

Se cree que los HFMA y las BSF, deben haber co-evolucionado a través de millones de años, y hoy sabemos el potencial individual que tienen estos grupos de microorganismos para generar beneficio a las plantas. Sin embargo, la interacción de estos grupos microbiales es aún poco entendida. Se conocen estudios que afirman que actúan sinérgicamente (Ordoñez, 2009) y en una relación de cooperación (Zhang et al., 2016). Zhang et al. (2016), realizaron evaluaciones tanto en suelo como *in vitro* en plantas de *Medicago sativa*, concluyendo que estos microorganismos interactúan en beneficio mutuo respecto al P y C, dependiendo la disponibilidad de P. En otros estudios, con la co-inoculación de cepas de HFMA y BSF, se obtuvieron mayores contenidos de P en plantas de cebolla y tomate en condiciones de invernadero (Gamalero et al., 2004; Toro et al., 1997). Así, muy probablemente estas bacterias mejoren el P disponible que sería tomado por la hifa de los HFMA para ser trasladado a la planta (Nazir et al., 2009; Toro et al., 1997).

Por otro lado, se ha encontrado adherencia de las bacterias a las hifas de los hongos (Sharma et al., 2020; Ordoñez et al., 2016; Toljander et al., 2006). Los autores destacan que esta es una propiedad favorable, que está asociada con la capacidad de formar complejos multicelulares, biopelículas, que les proporciona una ventaja de supervivencia, les permite soportar tensiones ambientales, tolerancia antimicrobiana, protección contra depredación, entre otros (Danhorn y Fuqua, 2007). Se han reportado estudios de bacterias

que forman biopelículas, y su papel en la promoción del crecimiento de las plantas para una agricultura sostenible (Rana et al., 2020). Particularmente la especie *Pseudomonas fluorescens*, ha sido reconocida en varios estudios, por tener capacidad de formar biopelículas (Jara et al., 2021; Barahona et al., 2010; Hinsy y O'Toole, 2006) sobre las estructuras de HFMA (Ude et al., 2006; Bianciotto et al., 2001). Y aunque antes de 2016 no se hablaba mucho de bacterias con la capacidad de solubilizar P como formadoras de biopelículas sobre hifas de HFMA, a partir de algunos estudios, se cree podría funcionar como una estrategia de mutuo beneficio para ambos microorganismos (Sharma et al., 2020; Ordoñez, et al., 2016; Hettiarachchi et al., 2016). Así, la bacteria tendría una ruta por la cual llegar a la micorrizósfera (Bianciotto et al., 2002) y el hongo podría acceder directamente a las zonas del P solubilizado (Wang K et al., 2016), el cual trasladaría a la planta a cambio de fuentes de carbono (Smith y Read, 2008).

De acuerdo con el escenario general descrito, es claro que se requiere aportar en el diseño de estrategias hacia una agricultura sostenible, basada en el uso eficiente de los recursos disponibles, así como en el aprovechamiento de las interacciones microbianas que ocurren naturalmente entre sí, y con las plantas. La literatura describe un amplio número de publicaciones, a partir de las cuales, se han desarrollado productos comerciales a base de microorganismos, como una alternativa a los fertilizantes de síntesis (Raklami et al., 2019; Inculet et al., 2019; Pérez et al., 2018; Rizzardi et al., 2017; Owen et al., 2015). Sin embargo, los resultados obtenidos son muy variables, ya que no es fácil determinar la eficacia directa de los bioinoculantes comerciales, y en la mayoría de casos, son desconocidos los mecanismos subyacentes responsables de sus efectos benéficos (Owen et al., 2015). Esta situación puede deberse en parte, a que se han usado sistemas de aplicación en la agricultura muy simplificados que ignoran los principios ecológicos básicos (Owen et al., 2015; Rodríguez y Sanders, 2015). Por ejemplo, se han llevado a cabo diferentes investigaciones en sustratos ó suelos estériles (Rodríguez y Sanders, 2015), y otros estudios, utilizando cepas individuales de estos grupos microbiales para evaluar la capacidad de solubilizar P ó mejorar la adquisición de P por la planta, en condiciones de laboratorio ó invernadero (Singh et al., 2019; Jhori et al., 2015; Cavagnaro et al., 2015). Pero es necesario acercar estas investigaciones a estudios que permitan el conocimiento de las interacciones de los microorganismos y su beneficio sobre las plantas en condiciones naturales.

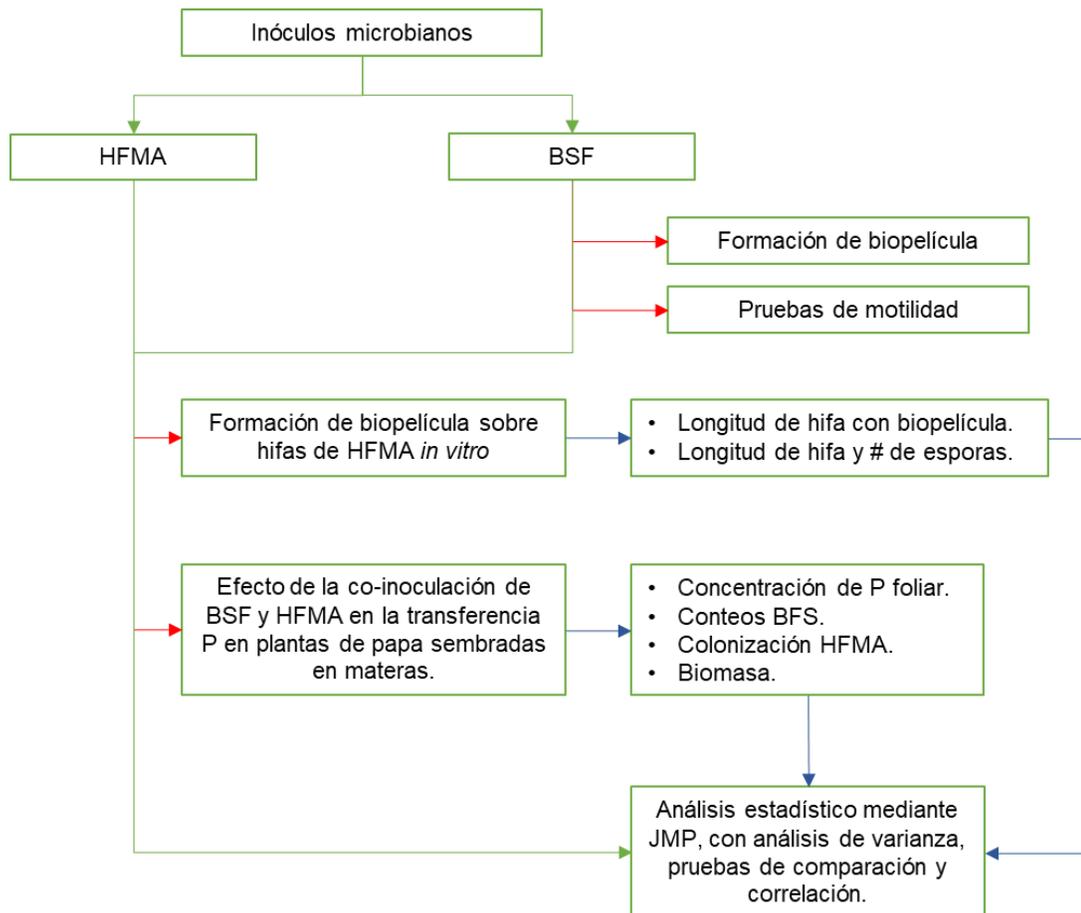
Ordoñez (2009) realizó un trabajo de investigación de la interacción de cepas de BSF de *P. fluorescens* y el HFMA *Rhizophagus irregularis*, mediante un modelo de estudio *in vitro* e *in vivo* en suelo no estéril, que demostró que la co-inoculación de estos microorganismos resulta en beneficios positivos para la planta y logra incrementar el contenido de P foliar. Su estudio no investigó la formación de biopelícula y su implicación en la interacción BSF – HFMA, y es a partir de allí que se vió la necesidad de avanzar en la temática, y de replicar en el tiempo un fenómeno biológico observado, altamente relevante, y que debe ser reproducido con miras a su aplicabilidad en condiciones naturales.

A través de la presente investigación se pretende generar soluciones a la problemática ya mencionada de la producción del cultivo de papa. Evaluando la interacción de dos microorganismos del suelo en condiciones más cercanas a una agricultura real (suelo no estéril), centrándonos en el efecto de la interacción de dos microorganismos que intervienen en el ciclo del fósforo así: las bacterias con la capacidad de solubilizar el P y los HFMA con su capacidad de transportar el nutriente a la planta. La verificación de esta interacción, podría permitir el uso del P almacenado en suelos agrícolas y así la mejora en la eficiencia del uso de este recurso. En dicha interacción, se evalúa como característica importante la capacidad de formación de biopelículas de las bacterias solubilizadoras, y se utiliza un sistema *in vitro* y un sistema *in vivo*. Y así, estudiar el efecto de la co-inoculación de estos dos microorganismos en el contenido de P foliar en plantas de papa (*Solanum tuberosum*), cuando está presente el microbioma del suelo. Otras características de los microorganismos, como motilidad bacteriana y crecimiento del hongo son evaluadas.

1. Materiales y métodos

Se realizaron montajes *in-vitro*: con BSF, en la evaluación de características de formación de biopelícula y motilidad; así como también con HFMA y BSF, para la formación de biopelículas sobre las hifas de los hongos. Y montajes *in-vivo*, en suelo con plantas de papa co-inoculadas con HFMA y BSF. La figura 1.1-1 presenta los principales montajes experimentales y las mediciones realizadas.

Figura 0-1: Esquema del desarrollo de las actividades y mediciones, en la investigación.



1.1 Inóculos microbianos

1.1.1 Hongo formador de micorriza arbuscular: HFMA

El inóculo del hongo formador de micorrizas arbusculares (HFMA) utilizado en los experimentos *in vitro*, fue el aislado DAOM197198 de *Rhizophagus irregularis*, suministrado por el profesor Ian Sanders de la Universidad de Lausanne, Suiza. El aislado fue crecido y conservado *in vitro* en asocio con raíces de zanahoria (*Daucus carota*) transformadas con *Agrobacterium rhizogenes*. El medio de cultivo utilizado fue medio mínimo (MM) (Fortin et al., 2002) (Anexo A) y las condiciones de crecimiento fueron 25 °C por 90 días.

Se hizo un experimento en materas, en el cual se utilizó como inóculo el producto comercial Glomygel®, que contiene 2.000 propágulos por mililitro del hongo *R. irregularis* en una matriz de gel. Para la aplicación se preparó una suspensión de producto por un mililitro de agua siguiendo las indicaciones del fabricante.

1.1.2 Bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF)

Se utilizaron 10 cepas de *Pseudomonas spp* aisladas de rizósfera de plantas de papa cultivadas en diferentes zonas productoras de Colombia (Lara, 2007), del linaje *Pseudomonas fluorescens* y caracterizadas como solubilizadoras de fosfato (Tabla 1.1-1) (Ordóñez et al., 2016). Todas las cepas fueron seleccionadas en medios selectivos como resistentes a rifampicina y forman parte del Banco de Cepas y Genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia.

Las cepas fueron conservadas en medio Gherna a -20 °C (Gherna, 1994), y para su uso en cada experimento, fueron activadas en medio Luria Bertani (LB) suplementado con rifampicina (100 µg mL⁻¹) a 27 °C por 48 horas y resuspendidas en solución salina a 0.85 % (p/v), según la concentración requerida. La composición de los medios Gherna y LB se encuentran en el Anexo A.

Tabla 1.1-1: Cepas de *Pseudomonas fluorescens* utilizadas y su lugar de aislamiento

Cepas	m.s.n.m	Fosfato tricálcico solubilizado <i>in vitro</i> (mg.L ⁻¹)	Municipio	Cultivar
P28	2663	102,93	Subachoque	Pastusa
P29	2663	60,27	Subachoque	Pastusa
P36	3050	100,75	Tausa	Pastusa
P63	2631	110,28	Cogua	Pastusa
P74	2631	95,55	Cogua	Pastusa
P80	2631	27,159	Cogua	Criolla
P95	2300	114,54	Motavita	Parda
P102	2631	101,67	Cogua	Pastusa
P104	2200	46,84	Motavita	Pastusa
P108	2300	33,15	Motavita	Parda P.

Tomada de Ordóñez et al. 2016

- Formación de biopelículas de las cepas de *P. fluorescens*

Se realizó un experimento para evaluar la capacidad de formación de biopelículas de las 10 cepas de *P. fluorescens*, para lo cual se estableció un diseño completamente al azar con 11 tratamientos y 8 repeticiones por tratamiento, 10 de los tratamientos correspondían a las cepas y uno al tratamiento control, este último, al no tener cepa bacteriana permitió comparar la formación de biopelículas en los otros tratamientos. Esta evaluación se hizo sobre una superficie abiótica, una microplaca de propileno, como se describe a continuación.

La evaluación de la formación de biopelícula en una superficie abiótica se realizó utilizando el protocolo establecido por O'Toole et al. (1999) con algunas modificaciones reportadas por Hamon y Lazazzera (2001). Brevemente, una vez activadas, las 10 cepas fueron incubadas en 10 mL de medio Biopelícula (Anexo A) en tubos para centrífuga de 15 mL de capacidad a una temperatura de 30 °C y agitación a 150 rpm por 48 horas. Posteriormente, se llevaron a una densidad óptica de 0.01 (DO600nm), se tomaron cantidades de 100 µl de cada una y se depositaron en los pozos de una microplaca de polipropileno de 96 pozos. Se utilizaron ocho pozos por cada cepa y ocho pozos adicionales con medio Biopelícula sin inocular como control.

La microplaca se conservó sin agitación a 30°C por 48 horas, transcurrido este tiempo, se retiró el contenido de cada pozo, se realizaron lavados con agua destilada estéril hasta eliminar por completo el medio, se agregaron 125 µl de una solución de cristal violeta al 0.1 % (p/v) (Anexo A) y se dejaron por 20 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron lavados con agua destilada estéril y se dejó por 24 horas en posición invertida para eliminar el exceso de agua. Después de este tiempo, se adicionaron 125 µl de una solución de etanol al 80% y aceta al 20% en cada pozo, para extraer el colorante adherido en las paredes, y se cuantificó la absorbancia a 600nm en un espectrofotómetro (BIORAD® SmartSpec Plus), utilizando la solución de etanol aceta como blanco.

- Pruebas de motilidad por *swarming* y *swimming*

Se realizó un experimento para evaluar la capacidad de motilidad por *swarming* y *swimming* de las 10 cepas de *Pseudomonas fluorescens*. *Swarming* se le denomina a la traslocación de las bacterias sobre superficies, y *swimming*, a la traslocación en ambientes acuosos (McCarter y Morabe, 2019). Se estableció un diseño completamente al azar con 11 tratamientos y 5 repeticiones en cada tratamiento. Diez de los tratamientos correspondieron a las cepas y uno al tratamiento control, este último consistió en agregar al medio de *swarming* y *swimming*, solución salina al 85% sin cepa bacteriana, lo que permitió verificar que no hubiera crecimiento de microorganismos ni en la solución ni en el medio sin adición de cepa bacteriana.

Las pruebas se realizaron siguiendo protocolos reportados por Suarez y Venturi (2008) con algunas modificaciones (Bastidas y Uribe, 2010). Para la prueba de *swarming* se utilizó el medio M8 (Anexo A) sin NH₄Cl y suplementado con 0,2% de glucosa y 0,05% de glutamato, con una concentración de agar bacteriológico de 0.5 %; y para *swimming* se utilizó medio LB con una concentración de agar bacteriológico de 0.3 %.

Se obtuvo una suspensión bacteriana de cada cepa a una concentración de aproximadamente 1x10⁷ UFC.mL⁻¹ (unidades formadoras de colonia por cada mililitro), se tomaron 2 µL de cada suspensión y se depositaron en el centro de cada caja de Petri. Para *swarming* se aplicó la suspensión en la superficie del medio y para el medio de *swimming* se aplicó en la parte intermedia, a través de una punción, teniendo cuidado de no tocar el

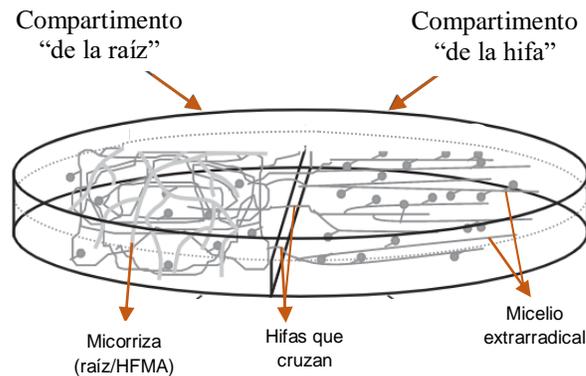
fondo de la caja. Las cajas se incubaron a 25°C por 72 y 24 horas, para *swarming* y *swimming* respectivamente, y después de este tiempo se realizó la medición del diámetro de crecimiento de las bacterias.

1.2 Formación de biopelículas sobre hifas extrarradicales del HFMA *in vitro*

Se realizó un experimento para evaluar la formación de biopelículas de 10 cepas de *Pseudomonas fluorescens* sobre hifas extrarradicales de *Rhizophagus irregularis* en cultivos *in vitro* con raíces transformadas de zanahoria. Para esto, se estableció un diseño completamente al azar con 11 tratamientos y 3 repeticiones en cada tratamiento. Diez de los tratamientos correspondían a las cepas y uno al tratamiento control. En este último se dispuso la misma solución sin células bacterianas mediante lo cual se pudo comprobar la ausencia de crecimiento bacteriano al final del experimento.

Los cultivos *in vitro* se desarrollaron siguiendo la metodología establecida por St-Arnaud et al. (1996). Se utilizaron cajas de Petri plásticas de dos compartimentos, en las que, uno de los compartimentos se denominó compartimento “de la raíz” y el otro, compartimento “de la hifa” (Figura 1.2-1). En el compartimento “de la raíz” se agregaron 20 mL de medio mínimo (MM) con 0,35% de phytigel (Fortin et al., 2002) (Anexo A), una vez el medio solidificó, se posicionó la caja de forma inclinada y se agregaron 8 mL de MM sin fuente de azúcar ni fósforo en el compartimento “de la hifa”, formando una pendiente desde el fondo del compartimento hasta la parte superior de la división de la caja (Figura 1.2-1), con el fin de facilitar el paso de las hifas extrarradicales del hongo de un compartimento a otro.

Figura 1.2-1: Esquema de la caja de Petri con dos compartimentos para establecer el cultivo *in vitro* del HFMA *R. irregularis*.



Tomado de Bücking y Shacha (2005).

A partir de cultivos *in vitro* previamente crecidos bajo condiciones similares, se tomaron raíces de zanahoria e inóculo del HFMA para establecer los cultivos *in vitro* del experimento. En cada caja de Petri ya descrita, se ubicó un fragmento de raíz, de 5 cm aproximadamente, sobre la superficie del medio del compartimento "de la raíz", y sobre esta raíz, un bloque de medio de 1 cm² aproximadamente, que contenía hifas y esporas de hongo.

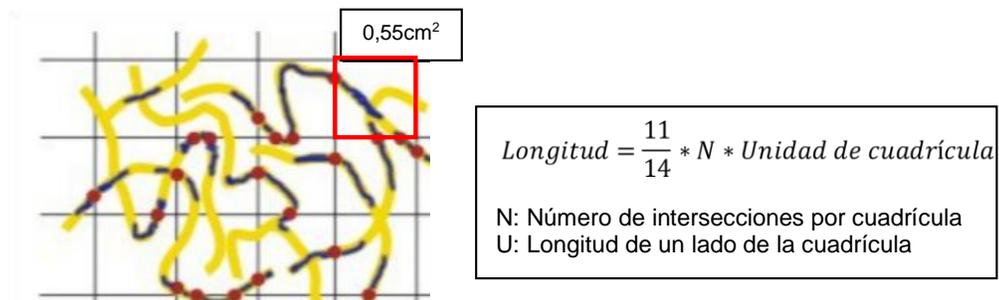
Las cajas se incubaron a 25 °C en oscuridad y se revisaron semanalmente, con el fin de verificar el crecimiento de las hifas extrarradicales del hongo y controlar la ramificación de las raíces de zanahoria, para que estas no pasaran al compartimento "de la hifa" (Figura 1.2-2). Después de siete semanas, se adicionaron 12 mL de MM semilíquido (Phytigel® 1 %), sin fuente de azúcar ni fósforo, en el compartimento "de la hifa", en donde fueron colocados 4 pozos, cada uno de 25 µL de suspensión bacteriana (1×10^8 UFC.mL⁻¹), como muestra la Figura 1.2-2. El total de las cajas se incubaron a 25 °C en oscuridad y después de 30 días se realizó la medición de longitud de la hifa extrarradical del hongo con presencia de biopelícula siguiendo el método de intersección lineal establecido por Tennant (1975). Brevemente, se realizó el conteo de las hifas que cruzaban las líneas de una cuadrícula en el lente del ocular del microscopio óptico en aumento 10X (Nikon Eclipse

TS100), sobre 25 puntos al azar en el compartimento “de la hifa”. Cada cuadrícula medía 0,55 cm², se aplicó la fórmula que describe el método, para obtener el dato por cm², se dividió la suma en 25 y en el área de la cuadrícula. En el tratamiento control se comprobó la ausencia de bacterias tanto en el compartimento “de la hifa” como en la superficie de las hifas del HFMA, ante esta ausencia no hubo medición de hifa con biopelículas en el control.

Figura 1.2-3: Cultivo *in vitro* de HFMA *Rhizophagus irregularis* DAOM197198, con raíces transformadas de zanahoria (compartimento “de la raíz”). Se observan los puntos de inoculación bacteriana en el compartimento “de la hifa” (marcados con puntos negros).



Figura 1.2-4: Esquema representativo del método de intersección lineal (Tennant, 1975) usado para la determinación de la longitud de hifas con presencia de biopelículas. Los puntos rojos corresponden a las intersecciones de las hifas en las cuadrículas.



Sobre este sistema *in vitro* también se realizó la medición de la longitud de hifas, siguiendo el método de intersección lineal descrito anteriormente, utilizando la misma cuadrícula y

lente. También se cuantificó el número de esporas presentes en un rectángulo de área de 1 cm² en 25 puntos seleccionados al azar. Con estas mediciones se pudieron comparar estas estructuras del hongo frente a la presencia de las diferentes cepas de BSF.

Con más de 90 días de haber realizado la inoculación bacteriana en el compartimento “de la hifa”, se evaluó la viabilidad de las cepas para verificar que las células que hacían parte de la biopelícula estaban efectivamente interactuando con el hongo sobre la hifa. Con este fin, se realizó una punción con un asa de aguja sobre una biopelícula de hifa, esto para 4 hifas diferentes de cada cepa y escogidas de forma aleatoria. Esta punción se sembró en medio LB suplementado con rifampicina (100 µg mL⁻¹) y se llevó a incubadora a 27°C por 48 horas.

1.3 Evaluación del efecto de la co-inoculación de BSF y HFMA en la transferencia de fósforo (P) en plantas de papa sembradas en materas

1.3.1 Material vegetal

Se utilizaron tubérculos semilla calidad certificada de papa *Solanum tuberosum* grupo especial *phureja* variedad Criolla Colombia, con un diámetro promedio de 4 cm, adquiridos en la empresa Plantar Colombia Ltda. Los tubérculos fueron lavados con agua de grifo, desinfectados mediante inmersión en alcohol al 75% seguido de hipoclorito de sodio al 1 % durante 1 minuto cada uno, y enjuagados con abundante agua destilada estéril para eliminar residuos que afectaran los brotes.

1.3.2 Descripción de los tratamientos en materas

Experimento *in vivo* que se llevó a cabo en el cuarto de crecimiento de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia, en Bogotá. Con suelo no estéril proveniente de áreas de producción de papa del municipio de Madrid – Cundinamarca. El experimento se realizó en materas con 2,8 kg de suelo, para evaluar el efecto de la inoculación conjunta de *Pseudomonas fluorescens* y *Rhizophagus irregularis* en la

transferencia de P en plantas de papa. Los tratamientos consistieron en dosis de P utilizando una fuente de P insoluble, roca fosfórica marca comercial Granufos 20 (contenido del 20% de P_2O_5 , ver Anexo D), otros con P soluble (fosfato dipotásico (K_2HPO_4)), y otros sin fuente de P, como se describe a continuación.

Se estableció un diseño completamente al azar con 14 tratamientos y cuatro repeticiones por tratamiento. En los tratamientos 1 a 10 se realizó la co-inoculación de una cepa bacteriana y del HFMA y la adición de la fuente de P insoluble (denominando cada tratamiento con el nombre de la cepa bacteriana), el tratamiento 11 se inoculó con el hongo y se adicionó P insoluble (HFMA+P Insol.), al tratamiento 12 se adicionó P insoluble sin inoculación de alguno de los microorganismos (P Insol.), al tratamiento 13 se adicionó P soluble sin inoculación de alguno de los microorganismos (P sol.) y para el tratamiento 14 no hubo inoculaciones ni adiciones de fuentes fertilizantes (No P), se describen los tratamientos a continuación:

Tabla 1.3-1: Descripción de los tratamientos de la evaluación en materas.

N°	Denominación	Descripción
1	P28	Co-inoculación de la cepa bacteriana P28 y HFMA más P insoluble
2	P29	Co-inoculación de la cepa bacteriana P29 y HFMA más P insoluble
3	P36	Co-inoculación de la cepa bacteriana P36 y HFMA más P insoluble
4	P63	Co-inoculación de la cepa bacteriana P63 y HFMA más P insoluble
5	P74	Co-inoculación de la cepa bacteriana P74 y HFMA más P insoluble
6	P80	Co-inoculación de la cepa bacteriana P80 y HFMA más P insoluble
7	P95	Co-inoculación de la cepa bacteriana P95 y HFMA más P insoluble
8	P102	Co-inoculación de la cepa bacteriana P102 y HFMA más P insoluble
9	P104	Co-inoculación de la cepa bacteriana P104 y HFMA más P insoluble
10	P108	Co-inoculación de la cepa bacteriana P108 y HFMA más P insoluble
11	HFMA + P Insol.	Inoculación de HFMA y adición de P insoluble
12	P Insol.	Sin inoculación, adición de P insoluble
13	P sol.	Sin inoculación, adición P soluble
14	No P	Sin inoculación ni adición de P

1.3.3 Establecimiento de los tratamientos en las materas

Para el establecimiento de los tratamientos, se utilizaron las mismas cepas bacterianas descritas en la Tabla 1.3-1, utilizadas en los experimentos anteriores, y se obtuvieron las suspensiones bacterianas de cada una de las 10 cepas a una concentración de 1×10^8 UFC. mL⁻¹; y como inóculo del HFMA se aplicó el producto comercial Glomygel® en una suspensión de 250 propágulos.mL⁻¹ para la inoculación. La cantidad de fertilizante requerido en el suelo se determinó teniendo en cuenta el análisis físico-químico de suelos y los requerimientos de la variedad de papa (Anexo D), aplicando el método cuantitativo con parámetros como la absorción, el potencial de producción en papa Criolla, y los nutrientes aprovechables del suelo, entre otros. Para el caso puntual del fósforo, para los tratamientos correspondientes de acuerdo a la Tabla 1.3-1, se hizo una adición de 150 kg.ha⁻¹ de P₂O₅ y de 368 kg.ha⁻¹ de K₂HPO₄ para los tratamientos de P insoluble y P soluble respectivamente, los cálculos se describen en el Anexo D.

Los tubérculos desinfectados se sumergieron en las suspensiones bacterianas por 15 minutos con agitación cada 3 minutos (Ordoñez, 2009), se utilizaron 7 tubérculos por suspensión por cepa -cuatro tubérculos fueron sembrados en las materas y con tres se hizo el recuento de UFC finales adheridas en la superficie de estos-. El recuento consistió en sumergir cada tubérculo en 10 mL de solución salina estéril al 0.85 %, agitar en vórtex por 1 min y hacer diluciones seriadas, de las cuales, se tomaron 100 µL y se sembraron en tapete en cajas de Petri con medio LB más rifampicina (100 µg.mL⁻¹). Después de 48 horas de incubación a 28 °C, se hizo el conteo de las UFC. Los datos de concentración (expresados en UFC) de las cepas bacterianas presentes en la superficie de los tubérculos, después de la inoculación, se observan en la Tabla 1.3-2.

Tabla 1.3-2: Concentración de cepas de *P. fluorescens* en la superficie de tubérculos de papa

Cepa	UFC/tubérculo
P28	8,7E+06
P29	4,1E+06

P36	5,0E+06
P63	2,3E+06
P74	9,0E+06
P80	2,6E+06
P95	2,7E+06
P102	3,7E+07
P104	8,7E+06
P108	5,6E+07

El procedimiento de siembra fue el siguiente:

En las materas con suelo se aplicó el fertilizante de acuerdo con los cálculos del análisis de suelo señalados en el Anexo D, la dosis de P se dispuso de acuerdo al tratamiento correspondiente Tabla **1.3-1**. Se sembró un tubérculo, inoculado o no inoculado (según correspondiera) por matera, a una profundidad de 5 cm. En los tratamientos que debían tener HFMA, se realizó su inoculación antes de cubrir los tubérculos, mediante la aplicación de 1 mL de la suspensión alrededor de cada tubérculo según recomendaciones del fabricante. Y se procedió a tapar la semilla con suelo. Las materas se ubicaron de manera aleatoria en el cuarto de crecimiento con temperatura de 16°C, humedad relativa de 60% y fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad. El riego se realizó manual, tres veces por semana, aplicando agua hasta capacidad de campo, esta capacidad de campo se determinó con el volumen de agua adicionado previo al inicio del drenaje de exceso de agua. El experimento tuvo una duración de 70 días en etapa de inicio de floración de las plantas. No se presentaron plagas ni enfermedades que afectaran el desarrollo de las plantas.

1.3.4 Concentración de P en tejido foliar

Finalizado el experimento, se realizó la medición del contenido de fósforo foliar, para lo cual se utilizó el método colorimétrico de azul de molibdato reportado por Murphy y Riley (1962) (Anexo C). Se cosechó el cuarto peciolo por cada planta tratamiento (Agvise 2013; Berardo et al., 2010; Núñez et al., 2006), se registró el peso de cada uno, se marcaron y el total de peciolos fue llevado a horno de secado a una temperatura constante de 60 °C por 48 horas. Posteriormente, se pesaron y se pulverizaron con nitrógeno líquido, este material se pasó a un tubo de ensayo y se adicionaron 2 mL de agua destilada desionizada,

se mezcló con vórtex durante 1 min y se centrifugó a 8000 rpm por 10 min. Se tomaron 100 μL del sobrenadante y se diluyeron en agua destilada desionizada para un volumen final de 500 μL . Esta solución se utilizó en la medición de PO_4 por el método colorimétrico de azul de molibdato.

1.3.5 Estimación de la colonización bacteriana rifampicina resistentes

Con el objetivo de estimar la presencia de *Pseudomonas fluorescens* rifampicina resistentes expresado como la concentración de UFC. g^{-1} de suelo, se realizaron diluciones seriadas. Se colectó el suelo que estaba fuertemente adherido a las raíces (suelo rizosférico) con la ayuda de un asa de laboratorio previamente esterilizada, y con cuidado de no herir la raíz, se pesó un gramo, se diluyó en 9 mL de solución salina estéril al 0.85 % (p/v) y se mezcló utilizando un vórtex por 1 min. Se sembraron 100 μL de la dilución en medio LB suplementado con rifampicina (100 $\mu\text{L mL}^{-1}$), se incubaron por 48 h a 28 °C y se realizó el conteo de colonias (Ordoñez, 2009).

1.3.6 Colonización de raíces por HFMA

Para la medición de la colonización de HFMA en las raíces, se cortaron trozos de 1 cm de longitud y un grosor no mayor a 2 mm, y se almacenaron en tubos para centrifuga de 2 mL (30 trozos/tubo) sumergidos en hielo; se obtuvieron dos tubos por cada planta del experimento, para ser usados en las dos metodologías implementadas: un tubo por metodología.

- Tinción con Azul de Tripán:

Esta metodología tuvo como objetivo estimar el porcentaje de colonización total de HFMA en las raíces y se utilizó el método de tinción de Phillips y Hayman (1970), tomado de Marulanda (2006). En cada tubo, se adicionó una solución de KOH al 10 % cubriendo las raíces durante 10 min a 60 °C, se lavaron las raíces con agua destilada, se adicionó HCl al 10 % por 10 min a temperatura ambiente, se eliminó el HCl y se agregó una solución de azul de tripán al 0.05 % en ácido láctico durante toda la noche. Las raíces se conservaron en una solución de ácido láctico hasta su observación.

La observación se realizó en un microscopio (Nikon Eclipse TS100). Las raíces se ubicaron en láminas portaobjetos, 15 trozos de raíz por lámina, dos láminas por cada tratamiento. El procedimiento de lectura utilizado fue el reportado por Trouvelot et al., (1986) como: Frecuencia de micorrización en el sistema radicular = (Número de fragmentos micorrizados/total de raíces contadas) *100.

- Tinción histoquímica para actividad fosfatasa alcalina:

Esta metodología consistió en estimar la actividad fosfatasa alcalina siguiendo el protocolo establecido por Tisserant et al., (1993), esto con el objetivo de observar las estructuras metabólicamente activas del hongo. Se adicionó, a cada tubo, una solución incubadora (1 mg mL^{-1} de α -naftil PO_4 , 0.5 mg mL^{-1} de Cl_2Mg anhidro, 0.8 mg mL^{-1} de $\text{Cl}_2\text{Mn } 4\text{H}_2\text{O}$ y Tris ácido cítrico 0.05 M , pH 9,2), asegurándose de cubrir todas las raíces y se dejó actuar a $37\text{ }^\circ\text{C}$ por 18 horas. Se lavaron las raíces con agua destilada, se adicionó hipoclorito sódico de cloro activo al 1 % (v/v) por 20 min a temperatura ambiente, se lavaron las raíces nuevamente con agua destilada y se agregó ácido láctico al 10% y glicerol para conservarlas hasta su observación (Marulanda, 2006). La observación al microscopio se realizó de forma inmediata.

El procedimiento de lectura utilizado fue el mismo descrito en el anterior numeral.

1.3.7 Acumulación de materia seca

Luego de los 70 días de crecimiento de las plantas, se cosecharon los peciolo para el análisis foliar, las raíces para la evaluación de la intensidad micorrízica y el suelo rizosférico para la cuantificación bacteriana. Se separó la parte aérea de las raíces para registrar el peso seco de la parte aérea y de la raíz de cada una de las plantas del experimento (4 plantas por tratamiento), se llevaron a un horno de secado a una temperatura constante de $60\text{ }^\circ\text{C}$ por 48 horas, hasta obtener peso constante y se registró el peso seco.

1.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa JMP® licenciado. Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias de Tukey aplicando el modelo completamente aleatorio unifactorial, luego de la validación de normalidad de los

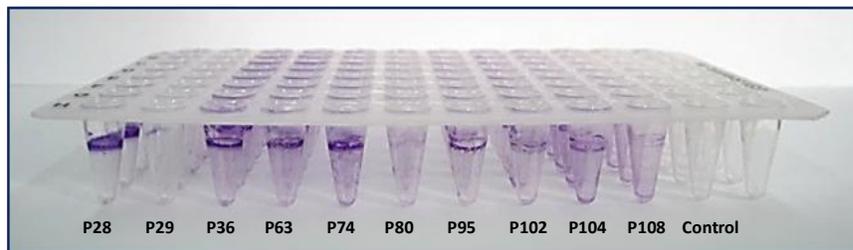
datos. Las correlaciones entre variables fueron analizadas por el método Pearson. Las diferencias fueron aceptadas con un nivel de significancia del 5%.

2.Resultados

2.1 Formación de Biopelículas de las Cepas de BSF

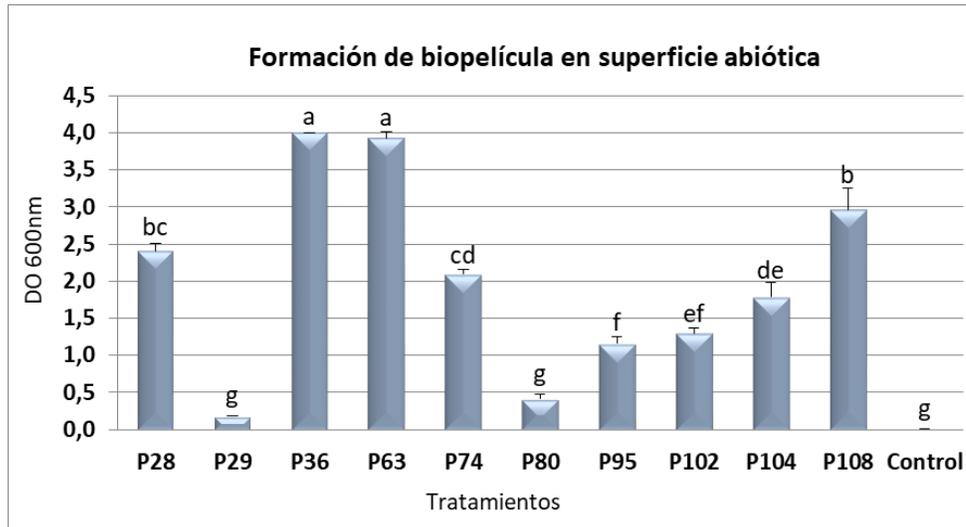
Las diez cepas de *Pseudomonas fluorescens* evaluadas presentaron formación de biopelícula en la microplaca de polipropileno, cada una con una capacidad diferente y estadísticamente significativa para adherirse a esta superficie abiótica (Figura 2.1-1).

Figura 2.1-1: Placa de polipropileno con la formación de biopelículas visibles por la tinción azul del cristal violeta (anillos presentes en cada pozo), cada fila de pozos es un tratamiento diferente con varias repeticiones. De izquierda a derecha los pozos corresponden a las cepas P28, P29, P36, P63, P74, P80, P95, P102, P104, P108 y el control.



En la Figura 2.1-2 se observan los valores de absorbancia (DO_{600}) de la dilución del colorante de la biopelícula adherida en la placa de polipropileno. Las cepas P29 y P80 no presentaron diferencias estadísticas significativas comparadas con el control, mientras que las restantes ocho cepas si las tuvieron. Las cepas P36 y P63 se destacaron con los mayores valores de absorbancia, es decir, mayor formación de biopelícula adherida a esta superficie abiótica.

Figura 2.1-2: Cuantificación de la formación de biopelícula sobre una superficie abiótica de las diez cepas de *Pseudomonas fluorescens*. Letras diferentes indican diferencias significativas por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).



2.2 Pruebas de Motilidad por *Swarming* y *Swimming*

Las diez cepas de *P. fluorescens* presentaron motilidad por *swarming* después de 72 horas, con diferencias estadísticas entre tratamientos. La capacidad *swarming* de las cepas P80 y P95 fue significativamente mayor que en los otros tratamientos; y la menor capacidad *swarming* se observó en las cepas P74 y P108 (Figura 2.2-1).

Figura 2.2-1: Capacidad *swarming* de las diez cepas de *Pseudomonas fluorescens*. Letras diferentes indican diferencias significativas por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

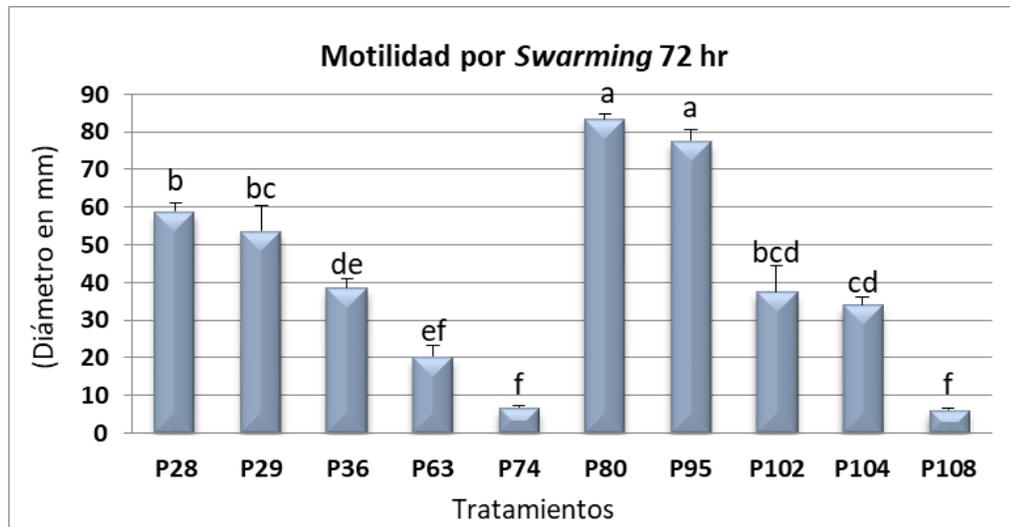
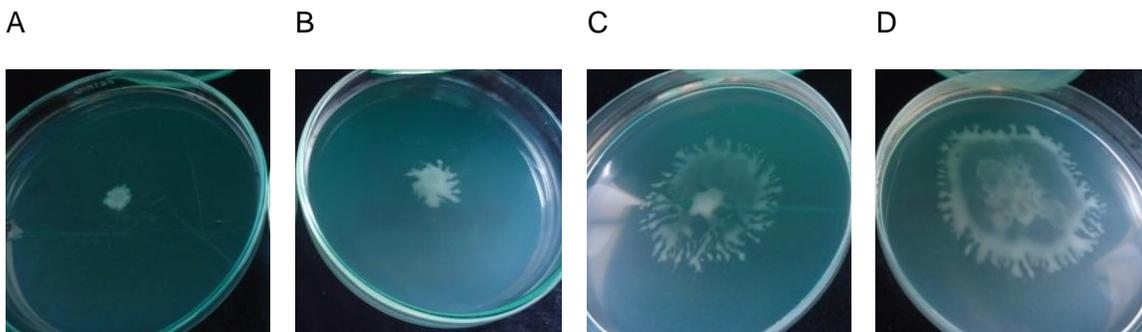


Figura 2.2-2: Motilidad por *swarming* de cepas de *Pseudomonas fluorescens*. Cepa P74 (A), Cepa P36 (B), Cepa P28 (C) y Cepa P95 (D).



Las diez cepas de *P. fluorescens* presentaron motilidad por *swimming* después de 24 horas y diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. Se observan valores de desplazamiento menores en comparación con *swarming*. Las cepas P29, P28, P63 y P102 tuvieron mayor movilidad estadísticamente significativa por *swimming*, que las cepas P36 y P108 (Figura 2.2-4).

Figura 2.2-3: Motilidad por *swimming* de cepas de *Pseudomonas fluorescens*. Cepa P29 (A), Cepa P80 (B).

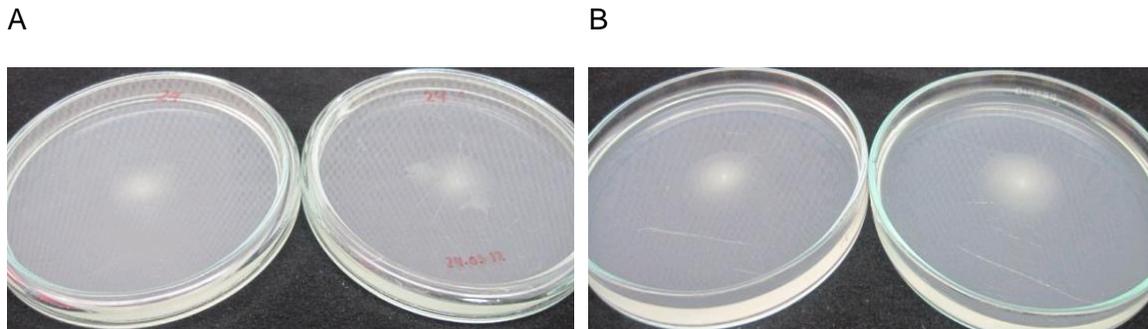
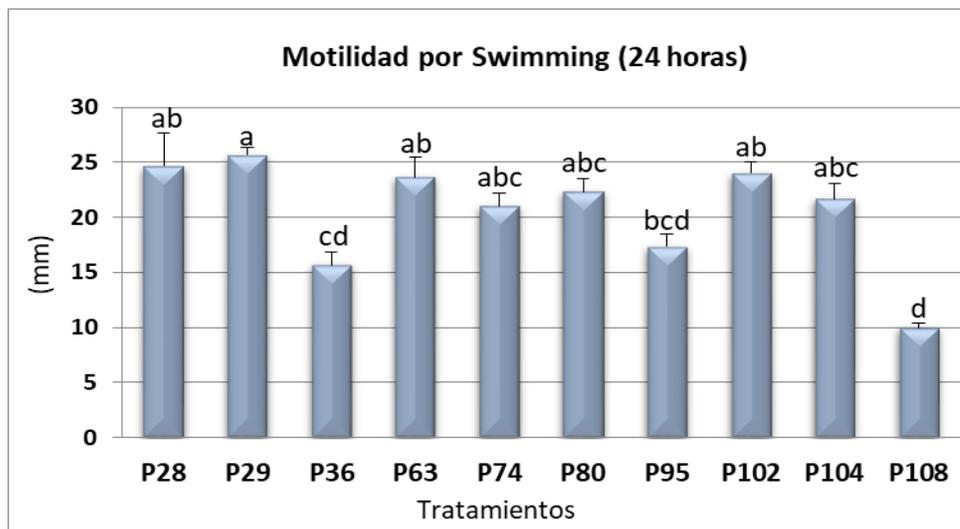


Figura 2.2-4: Capacidad *Swimming* de las diez cepas de *Pseudomonas fluorescens*. Letras diferentes indican diferencias significativas por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).



2.3 Formación de Biopelículas sobre Hifas Extrarradicales del HFMA *in vitro*

Las diez cepas de *P. fluorescens* formaron biopelícula sobre las hifas extrarradicales del hongo *R. irregularis* en el cultivo *in vitro*, en las cuales se observaron células bacterianas

adheridas a lo largo de las hifas extrarradicales del HFMA (Figuras 2.3-1 y 2.3-2), así como también, alrededor de las estructuras ramificadas de absorción (BAS) y de hifas secundarias (Figura 2.3-3).

Figura 2.3-1: A la izquierda, sistema de cultivo *in vitro* de raíces de zanahoria micorrizadas con inoculación de la cepa P29. A la derecha, se observa directamente en la caja de Petri, el desarrollo de las biopelículas sobre las hifas de *R. irregularis* a partir de un punto de inoculación. Los puntos pequeños, abundantes y blancos que muestra la fotografía de la derecha, son esporas del HFMA.

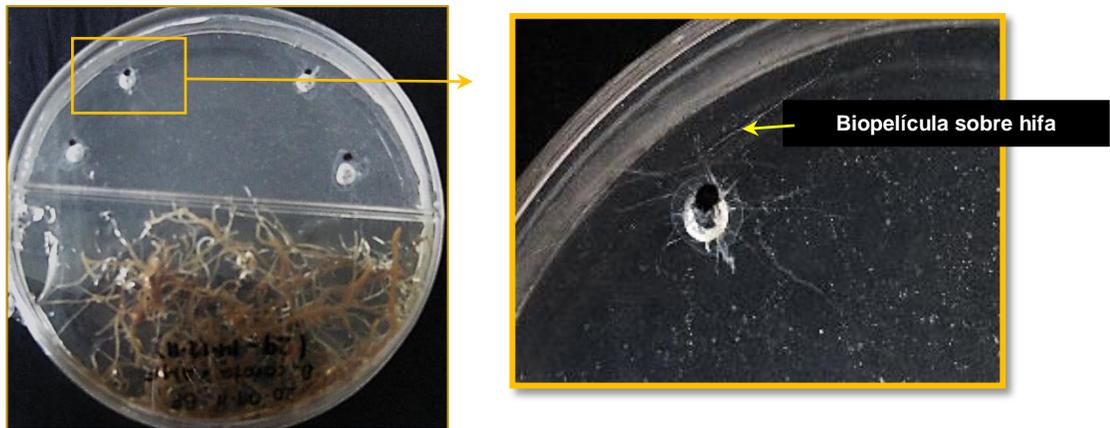


Figura 2.3-2: Formación de biopelícula de la cepa P74 sobre una hifa extrarradical de *R. irregularis* (HFMA, Hongo Formador de Micorriza Arbuscular) en el sistema de cultivo *in vitro* de raíces micorrizadas de zanahoria.

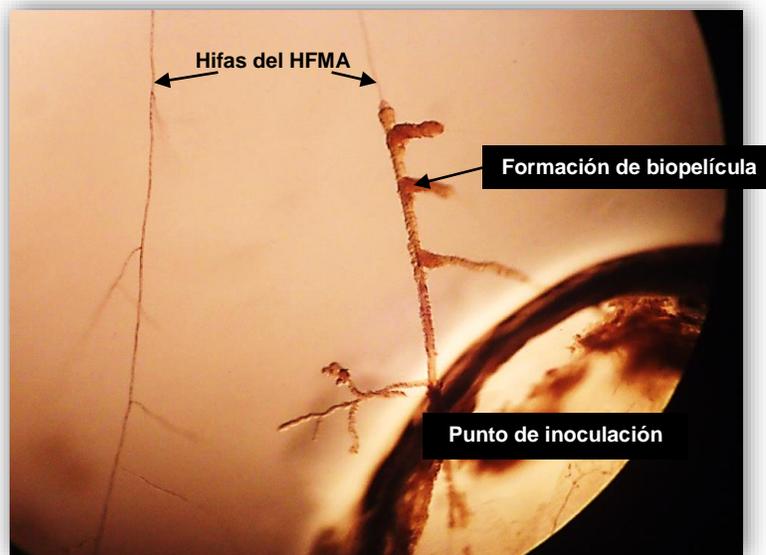


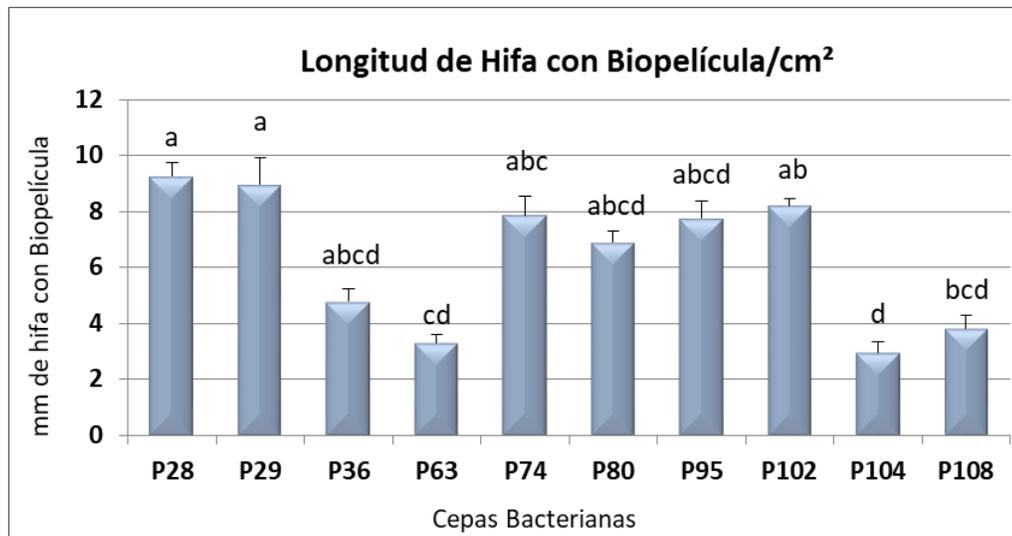
Figura 2.3-3: Fotografías de las biopelículas sobre la hifa de *R. irregularis* en el cultivo *in vitro*. Crecimiento de las biopelículas: A. Alrededor de las estructuras ramificadas de absorción (BAS). B. Sobre y a lo largo de la hifa. C. Alrededor de hifas secundarias.



La longitud de la hifa colonizada varió significativamente entre cepas ($P = 0,0003$). Las cepas P28, P29 y P102 cubrieron una mayor longitud de hifa que las cepas P63 y P104. (Figura 2.3-4). El detalle de las observaciones microscópicas de la formación de biopelícula de cada cepa sobre las hifas se puede observar en el Anexo E. No se observó crecimiento de bacterias en el tratamiento control.

Aunque la longitud de biopelículas sobre hifa que se registró de las cepas bacterianas evaluadas es considerable, no alcanzaron a llegar al “compartimento de la raíz” en donde se pensaría que, de haber llegado, se podría evidenciar esta estructura de biopelícula sobre la raíz de zanahoria.

Figura 2.3-4: Longitud de hifa con presencia de biopelícula de las 10 cepas bacterianas de *Pseudomonas fluorescens* en cultivo *in vitro*. Los datos representan la longitud de hifa promedio con biopelícula por tratamiento por 1 cm². Letras diferentes indican diferencias significativas por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).



En la prueba de viabilidad realizada a los 90 días, la totalidad de las cepas bacterianas mostraron crecimiento en el medio LB con rifampicina después de 48 horas, lo que permite sugerir que su crecimiento sobre las hifas del hongo aseguró su supervivencia por un largo periodo, teniendo en cuenta que el medio de cultivo utilizado en el compartimento “de la hifa” no contenía fuentes de fósforo ni carbono.

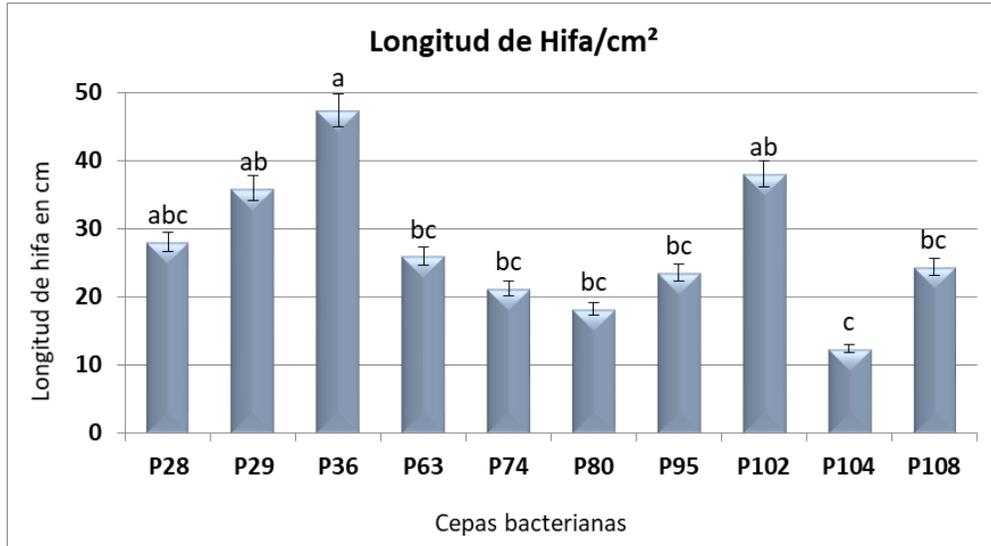
Los resultados de correlación del análisis estadístico mostraron que hay correlación estadística positiva entre la motilidad por *swarming* ó *swimming* y la formación de biopelícula sobre las hifas (coeficiente de Pearson de 0.404 y 0.419, respectivamente)., sin embargo, es baja dicha correlación.

2.3.1 Longitud de micelio extrarradical y número de esporas

Los resultados de longitud de hifas extrarradicales en el sistema *in vitro* presentaron diferencias estadísticas significativas entre cepas (ANOVA $F_{(9, 20)} = 6.21$, $P = 0.0003$) (Figura 2.3-5), por lo que se infiere que el desarrollo del hongo fue afectado por la presencia de las diferentes cepas. En los sistemas *in vitro* inoculados con las cepas P36, P102 y P29 se observó la mayor longitud de hifa (36 a 47 cm), mientras la inoculación con la cepa P104 tuvo la menor longitud de hifa extrarradical (12 cm).

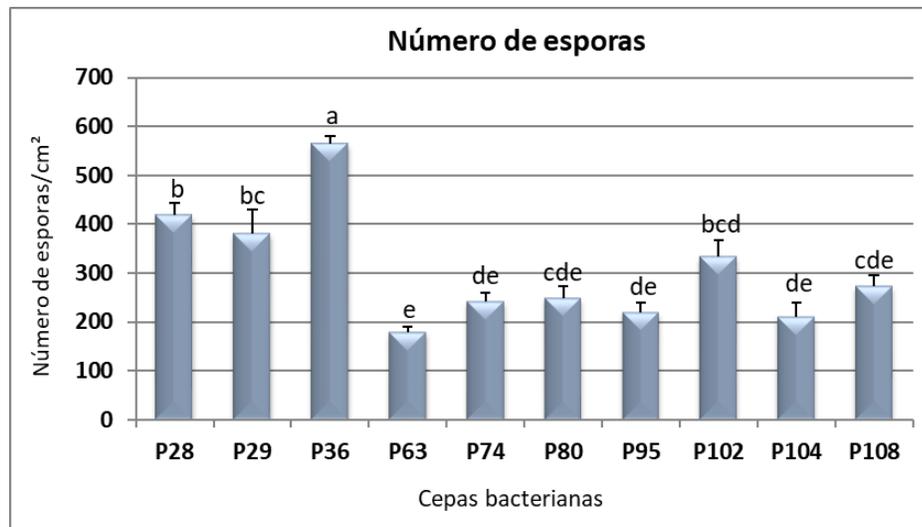
Figura 2.3-5: Longitud de hifa de *R. irregularis* en la presencia de las 10 cepas bacterianas de *Pseudomonas fluorescens* en un cultivo *in vitro*. Los datos representan la longitud de

hifa promedio por tratamiento por 1 cm². Letras diferentes indican diferencias significativas por la prueba de Tukey (P < 0.05).



De la misma manera, la producción de esporas del HFMA también fue significativamente afectada por la presencia de las diferentes cepas bacterianas en el cultivo *in vitro* (ANOVA $F_{(9,20)} = 18.86$, $P < 0.0001$) (Figura 2.3-6). Por las pruebas de comparación se puede inferir que la cepa P36 presenta la mayor diferencia estadística, seguida por las cepas P28, P29 y P102 superando en número de esporas a las demás cepas en estudio. Merece destacar que estas cepas también presentaron los mayores valores en el desarrollo de longitud de hifa en el mismo sistema *in vitro*, y la cepa P104 presentó el menor valor de longitud de hifa y uno de los menores números de esporas/cm². Se encontró una correlación positiva de estas dos variables (coeficiente de correlación de Pearson de 0,760).

Figura 2.3-6: Número de esporas de *R. irregularis* producidas en interacción con las 10 cepas bacterianas de *Pseudomonas fluorescens* en un cultivo *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas por la prueba de Tukey (P < 0.05).



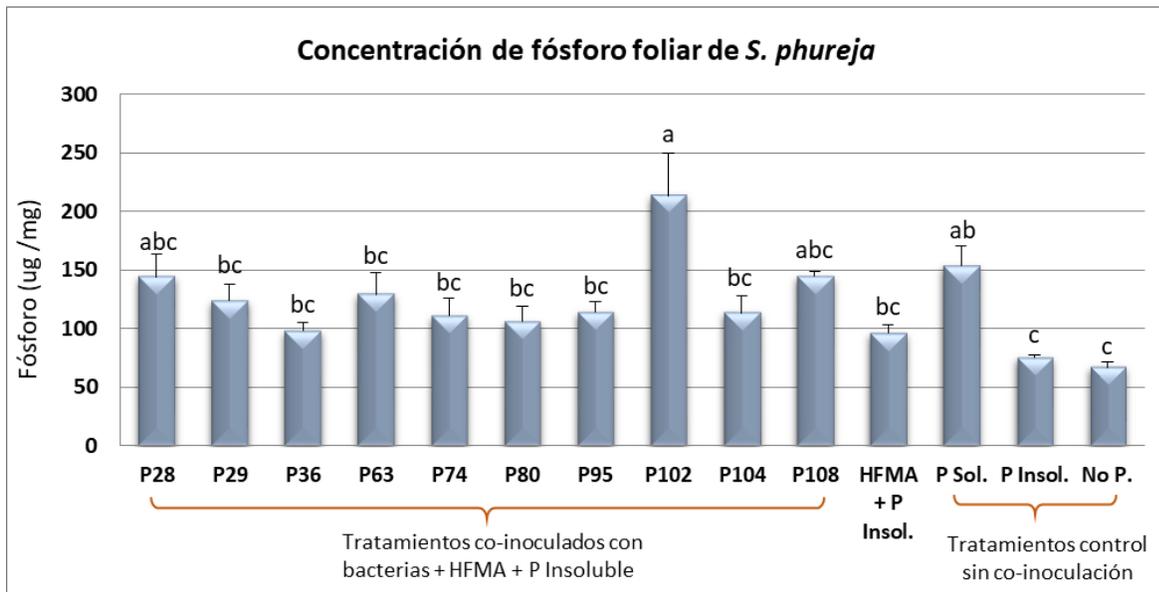
2.4 Evaluación del Efecto de la Co-inoculación de BSF y HFMA en la Transferencia de Fósforo (P) en Plantas de Papa Sembradas en Materas

2.4.1 Concentración de P en tejido foliar

La concentración de P foliar en las plantas de papa criolla, fue significativamente afectada por la co-inoculación de cepas de BSF y *R. irregularis* (ANOVA, $F_{(13, 42)} = 5.53$, $P < 0.0001$) (Figura 2.4-1). La más alta concentración de P foliar se encontró en plantas inoculadas con la cepa P102, con diferencia significativa en comparación a los 7 tratamientos de los co-inoculados y los controles sin inoculación de BSF. El tratamiento de P soluble también presentó un valor alto de concentración de P, pero solo estadísticamente diferente respecto a los tratamientos control: P insoluble sin co-inoculación (P Insol.) y sin P ni co-inoculación (No P). Las plantas inoculadas con el HFMA y con fuente de P insoluble, aunque presentaron un mayor valor de concentración de P foliar respecto a los tratamientos control (P Insol. y No P) éste no fue estadísticamente diferente, lo que puede indicar que la inoculación con HFMA por si sola no ayudó a la planta en la absorción de P con una fuente de P insoluble (roca fosfórica), sino que pudo deberse a la acción de la población microbiana nativa.

Figura 2.4-1: Concentración de P en tejido foliar de plantas de *S. tuberosum* grupo *phureja* (papa cultivar Criolla Colombia) con diferentes tratamientos. 10 tratamientos, co-

inoculados con diez cepas de *P. fluorescens* (P28 – P108) y *R. irregularis* (HFMA) y fertilizados con roca fosfórica (P insoluble). Tratamiento HFMA+P Insol.: Con *R. irregularis* y roca fosfórica. Tratamiento P Sol.: No co-inoculado y fertilizado con P soluble. Tratamiento P Insol.: No co-inoculado y fertilizado con roca fosfórica. Tratamiento No P: No Co-inoculado ni fertilizado. Letras diferentes indican diferencias significativas por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).



2.4.2 Estimación de la colonización bacteriana rifampicina resistentes

Al finalizar el experimento, el número promedio de las bacterias resistentes a rifampicina recuperadas del suelo de los tratamientos inoculados con BSF, estuvo entre $1,10 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ (P36) y $1,40 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ de suelo (P108), y de $6,80 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ de suelo en el tratamiento no inoculado con microorganismos (Tabla 2.4-1). La presencia de esta población bacteriana rifampicina resistente en el tratamiento no inoculado, supone que el suelo tenía una población nativa de bacterias rifampicina resistentes. El tratamiento control presentó menor número de bacterias, lo que equivaldría a que las cepas bacterianas de *P. fluorescens* inoculadas lograron colonizar la rizósfera de *S. tuberosum*, sin embargo, no se puede inferir respecto a una diferencia estadística significativa dado que hubo una alta varianza entre las repeticiones de los tratamientos, tampoco se encontró relación de esta

variable y las registradas de crecimiento de las plantas o colonización fúngica en este experimento.

Tabla 2.4-1: Concentración de cepas de *Pseudomonas* resistentes a rifampicina en el suelo rizosférico de las plantas de papa en los tratamientos inoculados y no inoculados.

TRATAMIENTO	UFC/gSuelo
No inoculado	6,8E+04
P28	2,0E+05
P29	9,3E+05
P36	1,1E+05
P63	9,5E+05
P74	3,5E+05
P80	7,5E+05
P95	2,0E+06
P102	1,9E+05
P104	1,6E+05
P108	1,4E+06

2.4.3 Colonización de raíces por HFMA

La inoculación con diferentes BSF tuvo un efecto estadísticamente significativo en la colonización micorrícica (ANOVA, $F_{(13, 55)} = 4.65$, $P = 0.0001$). El porcentaje de longitud de la raíz colonizada por el hongo, fue significativamente mayor en el tratamiento inoculado con P102 en comparación con los demás tratamientos. También las cepas P29, P74, P80 y P104 tuvieron una mayor colonización micorrícica *versus* dos de los tratamientos control no co-inoculados (tratamiento sin P y tratamiento con P insoluble) (Figura 2.4-2). El tratamiento de P insoluble fue el de menor valor de colonización por el hongo en raíz, con diferencia estadística con los tratamientos ya mencionados además del inoculado con P28. Los resultados estadísticos dieron una correlación de 0,66 entre las variables colonización micorrícica y el contenido de P foliar, lo que podría inferir una importante influencia de la colonización del hongo en raíz respecto a la traslocación de P del hongo micorrícico arbuscular.

La colonización micorrícica metabólicamente activa, medida como porcentaje de la longitud de las raíces colonizadas por estructuras micorrícicas de hongos teñidas como

evidencia de la actividad de la fosfatasa, también fue significativamente mejorada en tratamientos con algunas cepas de BSF (ANOVA, $F_{(13, 55)} = 2.51$, $P = 0.008$). Por ejemplo, las plantas inoculadas con P29, P80 y P102 mostraron niveles significativamente mayores de colonización fúngica metabólicamente activa en las raíces en comparación con los tres tratamientos sin BSF ni HFMA: tratamiento con adición de P soluble, el de P insoluble y el sin adición de P (Figura 2.4-3). Los demás tratamientos bacterianos y el inoculado con HFMA, no presentaron diferencias significativas con los tratamientos control no inoculados.

Figura 2.4-2: Porcentaje de longitud de raíz de papa colonizada por HFMA en las plantas de las materas con contenido de suelo no estéril. Letras diferentes indican diferencias significativas por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

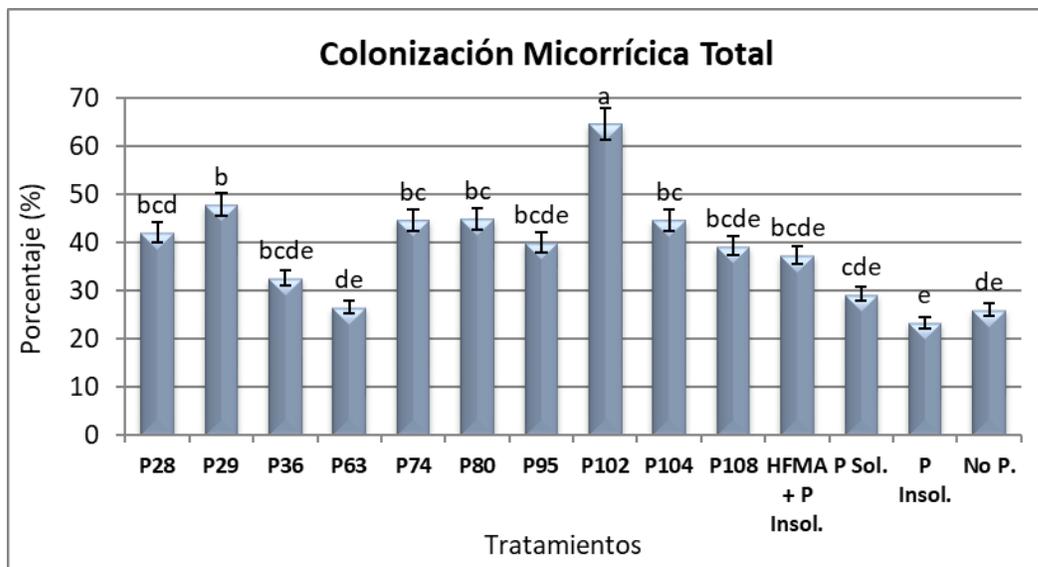
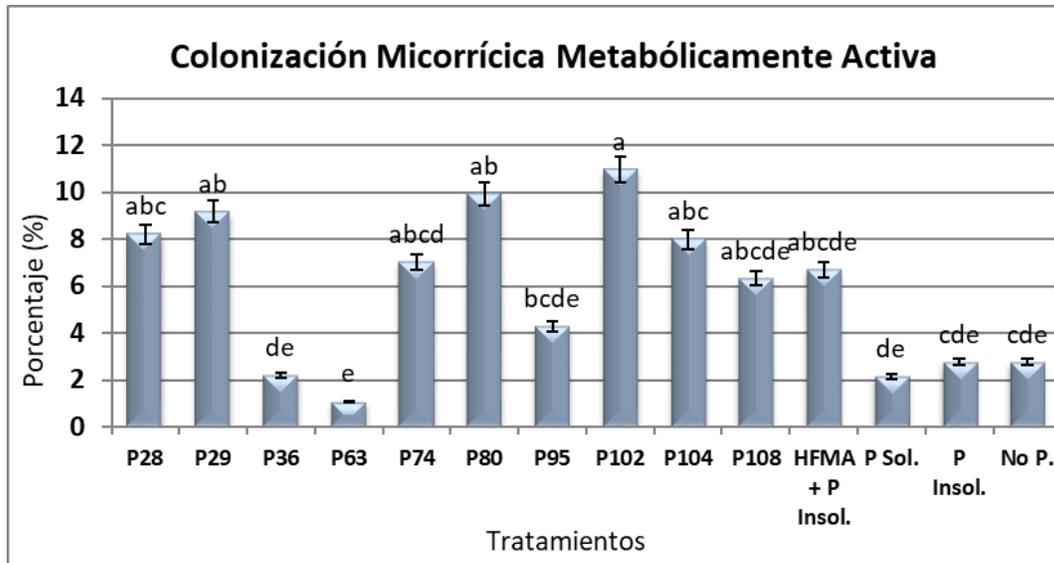


Figura 2.4-3: Porcentaje de longitud de raíz de papa con colonización micorrícica metabólicamente activa por HFMA en las plantas de las materas con contenido de suelo no estéril. Letras diferentes indican diferencias significativas por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

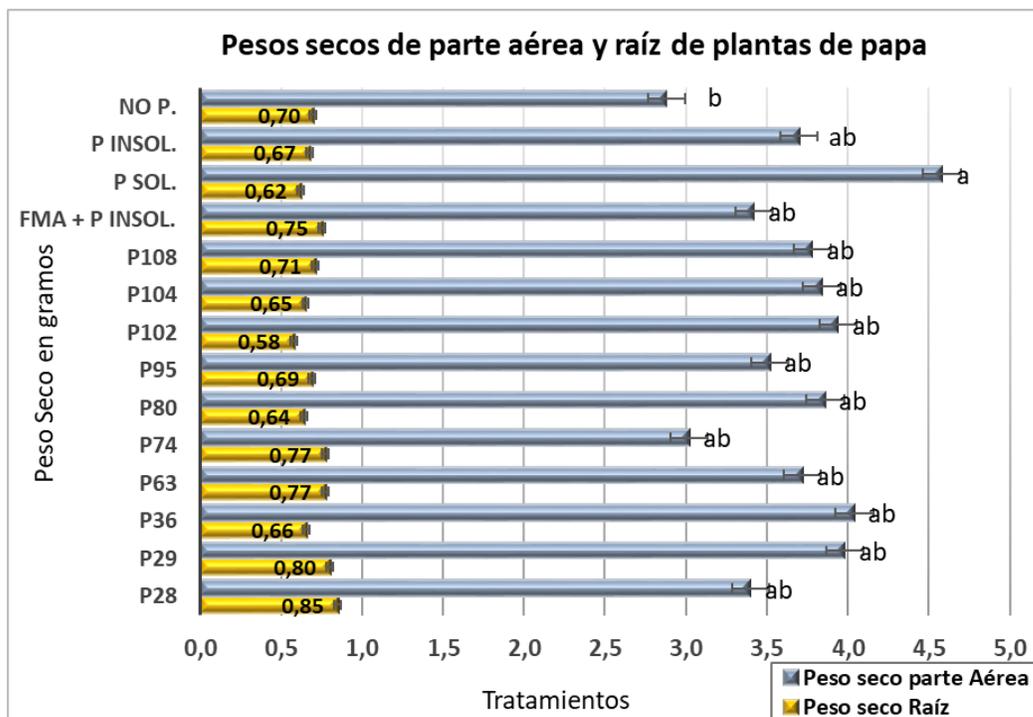


2.4.4 Acumulación de materia seca

La co-inoculación de BSF y *R. irregularis* no tuvo efecto sobre la acumulación de materia seca en la parte aérea ni en la raíz de las plantas de papa ($\rho = 0,08$ y $\rho = 0,8$ respectivamente), sin embargo, se presentaron diferencias significativas en la prueba de comparación de medias entre los tratamientos.

El tratamiento con solo aplicación de la fuente de fósforo soluble (P Sol.) presentó la mayor acumulación de biomasa en la parte aérea de la planta con diferencia estadística respecto al tratamiento sin co-inoculación ni aplicación de fósforo (No P), el cual fue el tratamiento de menor peso seco (Figura 2.4-4). Lo que puede significar que, esta fuente de P soluble fue absorbida directamente y eficientemente por la planta e incidió en mayor biomasa.

Figura 2.4-4: Acumulación de materia seca en raíces y parte aérea de plantas de papa cultivar Criolla Colombia co-inoculadas con diez cepas de *P. fluorescens* (P28 – P108) y *R. irregularis* (HFMA) y fertilizadas con roca fosfórica (P. insol.) y una fuente de P soluble (P. sol.). Letras diferentes indican diferencias significativas por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).



3. Discusión

Este estudio evalúa las interacciones de microorganismos del suelo de alta relevancia en el crecimiento vegetal y la producción de cultivos, usando dos modelos experimentales, *in vitro* e *in vivo*, lo que permite acercar el conocimiento obtenido de los experimentos de laboratorio bajo condiciones controladas de crecimiento y desarrollo de los microorganismos, a ambientes que se aproximan a las condiciones reales de campo.

- Formación de biopelículas de BSF *Pseudomonas sp.*

Mediante los experimentos *in vitro*, se observó la formación de biopelículas de las 10 cepas de *P. fluorescens* evaluadas, tanto en una superficie abiótica como en una superficie biótica, con una amplia variación entre las cepas en estudio. Los resultados presentados sobre la superficie abiótica, son congruentes con lo descrito por varios autores, destacándose entre otros atributos la gran capacidad de *Pseudomonas fluorescens* de formar biopelículas (Novinscak y Fillion, 2018; Hinsy y O'Toole, 2006; O'Toole y Kolter, 1998). La cepa P36 con valor de absorbancia de 4.0, mostró la mayor formación de biopelícula, seguida muy cercanamente de la P63. Novinscak y Fillion (2018) obtuvieron valores de absorbancia significativamente altos de *Pseudomonas fluorescens* versus otros géneros, sin embargo, sus resultados reportan valores de absorbancia que oscilan entre 0.1 y 0.8, de cepas promotoras de crecimiento vegetal aisladas de suelos agrícolas, mientras en este estudio, los resultados de absorbancia están en el orden de 0.18 a 4.0, lo que puede sugerir que estamos frente a unas cepas de *P. fluorescens* que provienen de suelos agrícolas y podrían tener la capacidad de formación de biopelículas superior a otras cepas.

En la evaluación de biopelícula sobre la superficie biótica, como se mencionó, hubo formación de biopelícula de las 10 cepas de *P. fluorescens* sobre las hifas del HFMA *R. irregularis*. Con estos resultados, y otros del presente estudio, se logró consolidar la

publicación realizada en el año 2016 (Ordoñez et al., 2016), en la cual hacen parte también resultados previos al presente, obtenidos por Lara (2007) y Ordoñez (2009). Esta, fue una de las primeras, y aun una de las pocas, investigaciones que divulgaron resultados acerca de formación de biopelículas de bacterias con capacidad de solubilizar fósforo, sobre hifas de HFMA. Se conocían interacciones previas a esta publicación, en las que bacterias se adherían a la superficie de hifas de HFMA (Toljander et al., 2006; Scheublin et al., 2010; Lecomte y St-Arnaud, 2011), y de formación de biopelículas sobre las estructuras del hongo (Bianciotto et al., 2001; Ude et al., 2006), sin tener mayor reporte de la capacidad de solubilizar fósforo. En los últimos años se ha registrado mayor atención a la formación de biopelículas por las rizobacterias (Rana et al., 2020; Ahmad et al., 2017; Hettiarachchi et al., 2016), ya que la realidad bacteriana es que el crecimiento planctónico puro es poco común, y las biopelículas han sido parte del entorno de forma frecuente (Herrera, 2004). Sharma et al., (2020), realizaron un estudio con cepas bacterianas del suelo que estaban adheridas a hifas de HFMA, utilizaron actividades de investigación y sistemas *in vitro* similares a los aquí descritos, y sus resultados mostraron formación de biopelículas de 3 cepas de BSF *Pseudomonas spp.* sobre hifas de HFMA. De manera que partieron de asociaciones naturales entre BSF y HFMA para tener un sinergismo más estable. Lo que permite inferir que experimentos y resultados de nuestra investigación puedan haber dado pauta e inspirado el estudio de Sharma et al., (2020) y el avance de la temática.

Dentro de los montajes *in vitro*, además de probar la capacidad de formación de biopelícula, se evaluó la motilidad de las cepas bacterianas por *swimming* y *swarming*, ya que son características importantes dentro de las fases de adhesión para la formación de biopelículas y colonización competitiva (Ying et al., 2009; Danhorn y Fuqua, 2007; Ramsey y Whiteley, 2004; O'Toole et al., 2000). Todas las 10 cepas bacterianas evaluadas presentaron capacidad de motilidad tanto por *swarming* como por *swimming*, generando una mayor colonización del área por *swarming*, que es el modo bacteriano conocido más rápido para su desplazamiento en una superficie y rápida colonización de un ambiente rico en nutrientes (Verstraeten et al., 2008). Las cepas P80 y P95 colonizaron casi la totalidad de área, mientras las cepas P74 y P108 tuvieron los menores desplazamientos. Sharma et al., (2020) también encontraron motilidad por *swimming* y *swarming* en 12 cepas de BSF dentro de los cuales 8 eran *Pseudomonas spp.*, definiendo el 25% de estas como rápidas

swimmers con valores de desplazamiento hasta de 8.4 mm en el tiempo de evaluación. Los resultados de nuestras cepas mostraron valores de desplazamiento hasta de 25 mm por *swimming*, lo que puede sugerir que las cepas analizadas por nosotros, presentan una mayor capacidad de motilidad, de la misma manera como se destacaron en la formación de biopelícula. Y es que estas formas de locomoción hacen parte de las estrategias de supervivencia bacteriana muy relacionadas con la formación de biopelículas (McCarter y Morabe, 2019).

La prueba de formación de biopelícula sobre superficie abiótica nos mostró la capacidad de formación de biopelícula de todas las cepas, y efectivamente luego en el experimento sobre las hifas, todas las cepas bacterianas formaron biopelículas en esta nueva superficie. Sin embargo, se encontró una correlación negativa estadísticamente entre estas dos variables, la cepa de mayor longitud de biopelícula sobre hifa (P29) tuvo la menor biopelícula en la superficie abiótica, de manera que un mayor desarrollo de biopelículas en superficies abióticas no predijo si la bacteria tendría la mayor formación de biopelícula sobre hifas de HFMA. Es importante resaltar, que el método aquí utilizado para determinar a las cepas como formadoras de biopelículas, el de O'Toole et al., (1999), es uno de los más empleados por los investigadores para este fin (Uz cudun, 2004), y el cual no se ha modificado para evaluar sobre una superficie biótica como las hifas. Para cuantificar la biopelícula sobre hifa, se adoptó el método de intersección lineal de Tennant (1975), el cual es utilizado para determinar la longitud de hifa, y en este caso, nos mostró la longitud de hifa con presencia de biopelícula, y esto a nivel práctico puede representar la habilidad de la bacteria en colonizar la hifa en su mayor longitud para su beneficio. Sin embargo, este método, no nos permitió calificar el tipo de formación de biopelícula en una misma longitud, por ejemplo, se observó que las cepas P95 y P102 desarrollaron biopelículas más gruesas, sugiriendo que albergaran mayor número de células bacterianas; y cepas como las P36 y P104, por el contrario, se observaron con poca biopelícula, aparentemente con menor número de células (Anexo E). Para precisar lo anterior, se deberá evaluar en un trabajo posterior, la calidad de esta biopelícula sobre hifa y si esto podría atribuir un beneficio práctico a la relación tripartita BSF-HFMA-planta. Si por ejemplo se plantea un experimento *in vitro* en el que además de realizar las mediciones de longitud de hifa con biopelícula y el crecimiento del hongo, se intenta hacer una tinción de la biopelícula a través de la cual se pueda cuantificar por absorbancia la cantidad de biopelícula por mm de longitud de hifa. También se podría intentar extraer una porción determinada del medio *in*

vitro, con contenido de longitud conocida de hifa con biopelícula, y conseguir la población bacteriana adherida a la hifa, e inferir cuantitativamente sobre la calidad de dicha biopelícula. Lo cual podría ser comparado con el comportamiento en un sistema BSF-HFMA-planta para evaluar el beneficio en la planta. Se esperaría que una biopelícula más desarrollada muestre mayor estabilidad y suficiencia frente a los sistemas plantónicos, tal y como lo demostró Simões et al. (2008), y se obtenga un incremento de la solubilización de fósforo a través del buen desarrollo de la biopelícula (Jayasinghearachchi y Seneviratne, 2006). Esto, además, podría deberse al alto nivel de producción de ácidos orgánicos asociado con la comunidad de la biopelícula con un alto nivel de expresión génica *versus* bacterias individuales (Vilain y Brozel, 2006).

Del experimento *in vitro* en el que se evaluó formación de biopelícula sobre hifa, también se evaluaron otras características del hongo bajo la influencia de las BSF. Aunque no se tuvo comparación con un control sin bacteria, se observó un efecto significativo en el crecimiento de la hifa y producción de esporas entre los tratamientos de acuerdo a la identidad de las cepas de *P. fluorescens*. Y es que en un sistema natural, es poco probable que los HFMA estén en la ausencia de alguna cepa bacteriana. Se tuvo una correlación positiva de estas dos variables, en donde la cepa P36 presentó los mayores valores de longitud de hifa y número de esporas, seguida de la P102. Ordoñez (2009), para las mismas cepas de estudio y utilizando una metodología similar, comparó con un control sin bacteria y observó un menor crecimiento del hongo en presencia de las cepas bacterianas, sin embargo, no se evaluó biopelícula sobre las hifas. Por su parte, Sharma et al., (2020), también con una metodología similar, tuvieron presencia de biopelículas sobre hifas y sugirieron que podía ser una relación mutualista, ya que no encontraron efecto negativo de las BSF en la longitud de hifa ni en el número de esporas del HFMA. Varios estudios han demostrado que *P. fluorescens* pueden actuar como “*helper bacteria*” de los hongos, y mejorar significativamente la colonización bajo diferentes condiciones (Shinde et al., 2019; Ghorchiani and Etesami, 2018; Frey-Klett et al., 2007). Esto puede ser el resultado de la interacción de cepas individuales con hongos que además compiten en un ambiente determinado, y conlleva a una adaptación entre ciertos grupos bacterianos a un estilo de vida asociado con hongos, lo cual se refleja en la gran diversidad de bacterias reportadas asociadas a hifas extrarradicales de HFMA (Emmett et al., 2021). Es un tema de mucho

interés, y aunque su función y naturaleza aun se desconocen, autores como Cruz e Ishii, T. (2012), hipotetizan que en el complejo sistema de bacterias-HFMA-plantas, algunas funciones que se cree llevan a cabo los HFMA en realidad dependen de sus bacterias asociadas. Ellos mostraron cómo bacterias de biopelículas pueden liberarse a los espacios intercelulares de las raíces a través de las hifas de HFMA e interactuar con otros microorganismos endófitos.

Un resultado adicional importante de la formación de biopelícula, en el cultivo *in vitro* de interacción de BSF y HFMA, fue la prueba de viabilidad positiva de las bacterias adheridas a las hifas del hongo pasados 90 días. Teniendo en cuenta que el compartimento donde fueron inoculadas contenía un medio libre de carbono y P, se puede sugerir, que mediante las hifas del hongo las bacterias se suplieron del carbono necesario para su supervivencia durante este periodo de tiempo, y puede que la presencia en biopelícula haya favorecido la capacidad de supervivencia (Hamon y Lazazzera, 2001). Otros estudios con *helper bacteria*, han comprobado la supervivencia de cepas de *P. fluorescens* en suelo por largos periodos de tiempo, gracias a la presencia de los HFMA (Frey-Klett et al., 2007; Gamalero et al., 2004). Y es que los HFMA generan exudados a través de sus hifas en su estrecha región del suelo, los cuales no solo contienen compuestos ricos en carbono, sino que también promueven el crecimiento y la actividad bacteriana e influyen en la estructura de la comunidad microbiana, además conducen a cambios en la función y en el ciclo de nutrientes orgánicos, lo que la hace una zona única e importante en los ecosistemas (Zhang et al., 2022).

- Interacción tripartita HFMA-BSF-planta

A partir de comprobar la capacidad de formación de biopelículas de las cepas de BSF de la especie *P. fluorescens* evaluadas, y a su vez, de las observaciones en el sistema *in vitro* de las biopelículas sobre hifas, se podría pensar en la formación de biopelículas de estas cepas BSF sobre el HFMA en las interacciones que tienen lugar en nuestros suelos agrícolas. Aunque estudiar la biopelícula directamente en el suelo no fue viable, se presume que las cepas bacterianas de este estudio, harían uso de esa gran capacidad de formación de biopelículas en el sistema *in vivo*. Existen varios reportes de la presencia de diferentes cepas bacterianas en la superficie de hifas y de esporas de HFMA formando estructuras similares a biopelículas en ecosistemas naturales (Etesami et al., 2021; Iffis et

al., 2016; Agnolucci et al., 2015; Cruz and Ishii, 2012; Lecomte y Arnaud, 2011; Scheublin et al., 2010;). La presencia de biopelícula garantiza mayor supervivencia de las bacterias, ya que pueden superar condiciones ambientales cambiantes, generar una mayor colonización y protegerse (Danhorn y Fuqua, 2007). Los autores Etesami et al. (2021), mencionan que para las BSF y los HFMA, la biopelícula podría funcionar como una estrategia de mutuo beneficio, las BSF podrían usar la hifa para permitir su crecimiento en la dirección hacia la planta, colonizar la rizósfera, y usar más exudados de plantas. Wang et al. (2016), demostraron como el flujo del carbono que pasa de las plantas al micelio del HFMA, es exudado como fotosintatos por el hongo y asimilado por las BSF que están asociadas a este, y que mineralizan el P orgánico del suelo.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, se evaluó la interacción de estas cepas de BSF formadoras de biopelículas y el HFMA en un sistema *in vivo*, con suelo no esterilizado y plantas de *Solanum tuberosum* grupo *phureja*. Los resultados obtenidos fueron congruentes con lo observado *in vitro*. Las diferentes cepas bacterianas tuvieron también un efecto diferencial y estadísticamente significativo sobre la colonización del hongo, en presencia de una comunidad microbiana local. La cepa P102 mostró un aumento de la colonización del hongo en raíz de papa del 147% versus los tratamientos sin inoculación (controles), y en comparación con los tratamientos co-inoculados, la cepa P102, aumentó la colonización del hongo desde un 34%, versus la cepa P29, hasta un 140%, versus la cepa P63. Otros tratamientos co-inoculados, P29, P74, P80 y P104, incrementaron la colonización del HFMA en un 75% en promedio en comparación con los controles sin inoculación. Varios estudios también han reportado aumentos en la colonización de raíces con cepas de BSF, en suelos sin esterilizar, fertilización fosforada y cultivos de papa (Saini et al., 2021; Fuquen y Siancho, 2009; Ordoñez, 2009). Ordoñez (2009) en su estudio con las mismas cepas, también destacó mayor colonización de raíces con las cepas P29, P74 y P104 frente a los controles, aunque en su estudio, la cepa P102 no tuvo la mejor colonización. Sin embargo, varios estudios al igual que el presente, han reportado diferentes resultados de estas cepas bacterianas que pueden diferir entre si (Lara 2007; Fuquen y Siancho 2009; Ordoñez, 2009), siendo todos acertados para cada caso de aplicación, ya que responden a diferentes factores biológicos, ecológicos y de ambiente, pero que evidencian las interacciones microbianas y sus importantes efectos.

La colonización metabólicamente activa, evaluada mediante la tinción para fosfatasa alcalina, también fue fuertemente influenciada por la identidad de las cepas de BSF. Así, los tratamientos con las cepas bacterianas P29, P80 y P102 tuvieron una mayor colonización activa en comparación a los tratamientos control no inoculados, logrando aumentos del 340% con la cepa P102. En concordancia con otros reportes y como era de esperarse, se obtuvo una mayor colonización micorrícica con la tinción con azul de Tripán, que con la tinción que evidencia la actividad de la fosfatasa alcalina (Covacevich y Echeverria, 2010; Van Aarle et al., 2002). Mientras el azul de Tripán tiñe todas las estructuras del hongo (incluyendo estructuras no activas/viejas), la actividad fosfatasa alcalina involucra enzimas que participan en la traslocación activa del P en los HFMA (Marulanda, 2006), lo cual estaría relacionado con el contenido de P de la planta.

En el experimento *in vivo*, estuvo presente la comunidad microbiana nativa del suelo, incluyendo los HFMA locales. En ese sentido, comunidades nativas de HFMA generaron porcentajes de colonización en raíces del 25% al 29%, descritos por los tratamientos control sin inoculación (Figura 2.4-1). Y el tratamiento inoculado únicamente con HFMA, no presentó diferencias significativas respecto a los controles, lo que puede sugerir que la inoculación con el HFMA introducido no tuvo efecto sobre la colonización de las plantas, la cual ocurrió por HFMA nativos. Aunque las diferentes fuentes de fósforo de los tratamientos no tuvieron incidencia en la colonización micorrícica de los tratamientos control sin co-inoculación, la adición de P, como roca fosfórica, a los tratamientos co-inoculados, se cree pudo ser importante para generar un resultado de aumento en la colonización micorrícica (Peña et al., 2021), ya que el contenido de P en el suelo era bajo (Anexo D, Gómez y Castro, 2013). De acuerdo a Zhang et al. (2016), los HFMA y la BSF interactúan en el suelo en beneficio de cada uno, por el P ó carbono requerido, solo si se tiene el contenido de P adecuado en el medio. En el estudio realizado por Wang et al. (2016), la BSF compitió con el HFMA por el P del suelo, no hubo beneficio en la asimilación de P por la planta y se redujo el crecimiento de la hifa del hongo. Para el presente estudio, se puede inferir que algunas cepas de BSF interactuaron sinérgicamente con los HFMA y no competitivamente, mediado posiblemente por el P suficiente en la interacción. Estos resultados refuerzan la objeción al paradigma de inhibición de P (Peña et al., 2021), este paradigma dice, que la colonización de las raíces y el beneficio en las plantas por la inoculación de HFMA decrece con el incremento de P en el suelo, y ha sido validado por diferentes investigaciones (Mosse, 1973; Thomson et al., 1986; Smith and Read, 2008;

Balergue et al., 2010; Salvioli di Fossalunga and Novero, 2019). Sin embargo, también existen otros estudios en los que se evidencia que una disponibilidad muy baja de P puede inhibir la colonización de HFMA por lo que se requieren adiciones de P para estimular la colonización (Bolan et al., 1984; Miranda y Harris, 1994). En otras investigaciones, es evidente que la colonización por HFMA de raíces no siempre disminuye con el aumento de la dosis de P en campo (Higo et al., 2020; Peña et al. 2021); también se han obtenido beneficios en la productividad, por ejemplo, en el caso del cultivo de yuca con la inoculación con cepas de *R. irregularis* y fertilización 100% P (Ceballos et al., 2019). En la actualidad este paradigma no se ha generalizado en campo y no hay estudios publicados que prueben el paradigma de P en cultivos de importancia mundial en suelos tropicales. De manera que no se puede usar como una generalización, que se obtendrá una mayor colonización de raíces ó beneficios en las plantas por inoculación de HFMA en suelos deficientes de P en ausencia de fertilización de P. Sino que el resultado puede variar de acuerdo a los genotipos del cultivo, la identidad de los HFMA, las condiciones de la zona, entre otros (Peña et al. 2021).

Las plantas de *S. tuberosum* de este experimento *in vivo*, mostraron la más alta concentración de P foliar con la co-inoculación de la cepa bacteriana P102 y *R. irregularis*. Este tratamiento presentó una diferencia estadística significativa *versus* la mayoría de los tratamientos, resultado que coincidió con lo reportado por Ordóñez (2009). Con este tratamiento se aumentó en un 39% la asimilación de P de la planta respecto al uso de P soluble, y en un 184% vs. el uso de solo roca fosfórica. Estos resultados son muy interesantes en términos económicos para un productor de papa, que particularmente en estos momentos enfrenta escasez y altos costos de los fertilizantes. Esta cepa también tuvo un efecto significativo en la colonización de raíces por HFMA, y uno de los mayores valores de desarrollo de biopelícula sobre hifa, de manera que esto se pudo haber traducido en el aumento de la absorción de P por las plantas de papa. Mientras que las otras cepas de BSF que tuvieron un efecto significativo en la colonización del hongo, estadísticamente no tuvieron efecto en la asimilación de P por las plantas de *S. tuberosum*. En términos económicos, sin embargo, para un productor de papa las concentraciones obtenidas con la co-inoculación de las cepas podrían ser significativas respecto al uso de solo roca fosfórica, con aumentos del P foliar que van desde un 30,5%. Por ejemplo, la co-

inoculación de P108 y HFMA con roca fosfórica genera concentraciones similares de P foliar que la fertilización con P soluble que podría ser más costoso, además de un aumento del 93% respecto al uso de solo roca fosfórica.

No se observó una mejora significativa de la biomasa de las plantas de *S. tuberosum* con las inoculaciones de este experimento. Para las condiciones y tiempos del presente experimento, podríamos inferir de estos resultados (Figura 2.4-2), que con el uso de roca fosfórica y co-inoculación de BSF y HFMA en el cultivo de papa, se podría obtener la misma cantidad de biomasa que usar P soluble. Y aunque generar biomasa no es el objetivo del cultivo de papa, sino producir tubérculos; es claro el beneficio de roca fosfórica + BSF + HFMA en la obtención del P en plantas de *S. tuberosum* grupo *phureja*. Así, este resultado puede ser importante para nuestra actualidad agrícola y en el diseño de sistemas sostenibles económica y ambientalmente. Afirma Múnera y Velez (2014), que se deben aplicar fertilizantes como la roca fosfórica y evitar los fertilizantes solubles, ya que constituyen una fuente de toxicidad para los microorganismos y disminuyen la eficiencia en la acción de las asociaciones simbióticas como las micorrizas.

Para el presente estudio y el desarrollado por Ordoñez (2009), la cepa de BSF P102 generó las mejores concentraciones de P foliar, sin embargo, no se puede pretender recomendarlo como un inóculo universal, que va a generar esta respuesta única y garantizada en los diferentes escenarios agrícolas. Si bien es cierto que tiene el comportamiento más destacado, no se puede desconocer que en la naturaleza hay un sin número de diferentes factores que pueden cambiar el curso de los resultados esperados. De manera que, teniendo en cuenta estos resultados base y en línea con lo propuesto por Peña et al. (2021), para hacer una recomendación acertada, se podría abordar un estudio midiendo la capacidad de respuesta a la inoculación ó co-inoculación, evaluando con cepas nativas de HFMA, el inóculo de *R. irregularis* y las bacterias de este estudio. Se requieren ensayos de campo a gran escala, replicados en el tiempo, en diferentes condiciones de suelos y de ambientes, además de diferentes variedades de papa. Así, se podría obtener un conjunto de metadatos que permita buscar asociaciones entre la capacidad de respuesta a la inoculación ó co-inoculación, la identidad del inóculo, la variedad de la planta, las variables climáticas y edáficas y la composición de la comunidad microbiana del suelo. Esto permitiría precisar con una alta probabilidad de éxito que inoculación realizar para determinada combinación de factores.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

Todas las 10 cepas de *P. fluorescens* de la presente investigación, tienen la capacidad de formar biopelículas y habilidad de desplazarse por *swimming* y *swarming*.

Cada una de las 10 cepas de *Pseudomonas fluorescens* solubilizadoras de fosfato evaluadas en el presente estudio, influyen en un crecimiento diferenciado de los hongos formadores de micorrizas arbusculares *Rhizophagus irregularis*. También interactúan estos microorganismos a través de la formación de biopelículas, por las cepas bacterianas sobre las hifas extraradicales de los hongos, lo que puede tener influencia en la supervivencia de estas bacterias en condiciones limitantes de fuentes de carbono y fósforo.

La presente investigación comprobó el efecto positivo de la co-inoculación de BSF y HFMA, en el contenido de P foliar de plantas de papa (*Solanum tuberosum* variedad Criolla Colombia), en presencia del microbioma del suelo. La co-inoculación de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* P102 y *Rhizophagus irregularis*, generó el mayor contenido de P foliar con un 184% más que el tratamiento con P insoluble sin inoculación; además de aumentar en un 39% el mismo P versus el uso de P soluble y en un 122% sobre el tratamiento de HFMA y P insoluble.

Se postula a la cepa P102 como una “*helper bacteria*” de los hongos, ya que incrementa el P foliar en las plantas de papa, y mejora significativamente la colonización micorrícica.

En el presente estudio se muestra, como con el uso de una fuente de P tipo roca fosfórica como fertilizante y la co-inoculación de las 10 cepas de *P. fluorescens* y *R. irregularis*, se logran contenidos de P foliar en plantas de papa similares e incluso mayores a la obtenida

con la fertilización con una fuente de P soluble, en condiciones controladas de crecimiento. Esto, sin utilizar dosis en exceso de la roca fosfórica, sino dosis mínimas para el potencial de producción de papa.

Los resultados de este estudio generaron aportes que sirvieron a otras investigaciones a abordar temas fundamentales de la interacción HFMA – BSF, demostrado por los artículos que han citado su publicación en la revista científica PLoS One en el año 2016, el cual se ubicó en el 10% de los más citados en ese año, publicados por la revista.

4.2 Recomendaciones

Es importante llevar estas investigaciones bajo condiciones de campo, con la co-inoculación de estos microorganismos, que involucren diferentes localidades, suelos, variedades de plantas, y se obtengan resultados en el tiempo. De esta manera se pueda tener información robusta para la toma de decisiones frente a las inoculaciones de microorganismos. Uno de los tratamientos que se recomienda evaluar, es la cepa de BSF P102 y el hongo *R. irregularis*, para verificar en condiciones de campo, su potencial ya identificado en este trabajo. De esta manera validar si se le puede llamar una “*helper bacteria*” de los hongos y en que condiciones funciona como tal.

Se recomienda el estudio de, la influencia de la cepa P36 en el crecimiento del hongo, si lo observado en el presente estudio, de generar la mayor longitud y esporulación del hongo, es una respuesta de estrés ó que explicación podría tener el fenómeno.

Para este tipo de estudios, de evaluación de las interacciones de microorganismos como una alternativa de uso en la producción agrícola, se recomienda realizar la comparación *in vitro* e *in vivo*, sobre todo para microorganismos que estén siendo introducidos en las investigaciones con fines de aplicabilidad agrícola. Debido a que esta aproximación permite evaluar su comportamiento con un seguimiento exhaustivo desde el sistema *in*

vitro en condiciones controladas, y su aplicación en un sistema suelo planta en presencia de la comunidad microbiana nativa y condiciones reales del suelo.

Se recomienda abordar otras investigaciones que evalen la calidad de la biopelícula sobre la hifa extraradical del hongo, por ejemplo, algunas cepas bacterianas forman biopelículas más densas, al parecer con mayor número de células bacterianas que otras, si esto podría atribuir un beneficio práctico a la relación tripartita BSF-HFMA-planta.

A. Anexo: Medios de cultivo y soluciones

Medio Gherna para la conservación de bacterias a -20°C (Gherna, 1994).

Componentes	1000mL
Caldo Tripticasa de soya	3,125 g
Glucosa	0,52 g
Leche en polvo descremada	2,075 g
Glicerol 87%	4,15 g
Pasterizar a 10 lb por 15 minutos.	

Medio Luria Bertani (LB). (Ordoñez, 2009)

Componentes	1000mL
Tripta	10 g
NaCl	10 g
Extracto de levadura	5 g
Agar bacteriológico	12 g
Disolver y esterilizar a 121°C por 20 minutos.	

Medio Biopelícula (O'Toole et al., 1999)

Son los componentes del medio LB más otros adicionales	1000mL
Tripta	10 g
NaCl	10 g
Extracto de levadura	5 g
Sulfato de amonio	0,15 M -19,82 g
Fosfato de potasio	100 mM – 13,09 g
pH : 7	

Citrato de sodio	34 mM – 9,9 g
Sulfato de magnesio	1 mM – 0,151 g
Glucosa	0,1% - 1 g

Medio Mínimo Completo (MM). (Fortin et al., 2002)

Componentes	1000mL
Calcio	100 mL
KI	1 mL
*Macroelementos	100 mL
**Microelementos	1 mL
NaFe/EDTA	5 mL
Vitaminas	10 mL
Sacarosa	10 g
Disolver sin calentar y ajustar pH a 5,5	
Phytigel	3,5 g
Calentar hasta disolver el phytigel. Autoclavar a 121°C por 15 min.	

Macroelementos y microelementos del medio mínimo completo MM

Componentes *Macroelementos	Concentración stock g/L	Componentes **Microelementos	Concentración stock g/100ml
MgSO ₄ 7H ₂ O	73,1 g	MnCl ₂ 4H ₂ O	0,6 g
KNO ₃	8 g	ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,265 g
KCl	6,5 g	H ₃ BO ₃	0,15 g
KH ₂ PO ₄	0,48 g	CuSO ₄ 5H ₂ O	0,013 g

Medio M8 y solución de sales M9 para *Swarming*. (Suárez and Venturi, 2008)

Componentes	A 800mL de agua adicionar:
Na ₂ HPO ₄ -7H ₂ O	64 g
KH ₂ PO ₄	15 g
NaCl	2.5 g
NH ₄ Cl	5 g
Agitar hasta disolver.	
Ajustar a 1000mL con agua destilada.	

Esterilizar autoclavando por 15min a 15lb de presión.

Preparación de Medio M8 para Swimming

Componentes	750mL de agua* adicionar
Preparar las sales M9 (5x) sin NH ₄ Cl	200mL
Agua estéril para completar 1L	
Solución MgSO ₄ 1M	2mL
Glucosa al 20%	20mL
Solución de CaCl ₂ 1M	0,1mL
Las soluciones de MgSO ₄ y CaCl ₂ se deben preparar por separado, esterilizar y adicionar después de diluir las sales M9 (5x) a 1L de agua.	
Glucosa debe ser esterilizada por filtración antes de ser adicionada a las sales M9	

* Los 750mL de agua es destilada estéril (<50°C)

B. Anexo: UFC.mL⁻¹ de las cepas bacterianas de *Pseudomonas fluorescens* para absorvancia DO: 0,200 +/-0,05

UFC de las cepas bacterianas para una absorvancia de densidad óptica DO: 0,2

CEPA bacteriana	UFC.mL⁻¹
Ps fl 028	7,5E+07
Ps fl 029	9,6E+07
Ps fl 036	4,4E+07
Ps fl 063	5,1E+07
Ps fl 074	1,2E+08
Ps fl 080	1,8E+08
Ps fl 095	5,9E+07
Ps fl 102	1,0E+08
Ps fl 104	9,0E+07

C. Anexo: Determinación de concentración de fosfatos en tejido vegetal

Método modificado de Fiske – Subbarow (1925) por Murphy y Riley (1962). Técnica de azul de molibdato para la evaluación de fosfatos:

- Solución stock de fosfato 0,2 mgP/mL (Se disuelven 87,9 mg de KH_2PO_4 en 75 mL de agua, se agrega 1 mL de ácido sulfúrico 10N y se completa el volumen hasta 100 mL con agua).
- Solución patrón de fósforo 0,02 mgP/mL, recién preparada (Se diluye 1 mL de la solución stock y se completa hasta 10 mL con agua).
- Solución de ácido molíbdico (se disuelve 84 mL de H_2SO_4 concentrado (libre de fosfatos y silicatos) en 300 mL de agua, se agita y se deja enfriar. Aparte se disuelven 25 g de molibdato de amonio en agua, luego se mezclan las dos soluciones y se completa a un litro con agua destilada).
- Solución de ácido ascórbico 1.5 mg/mL. Recién preparada.

A partir de estas soluciones, se procede a generar la curva de calibración con concentraciones de fósforo conocidas, para lo cual se aplica el procedimiento descrito en la siguiente tabla, con diferentes concentraciones del patrón de fósforo:

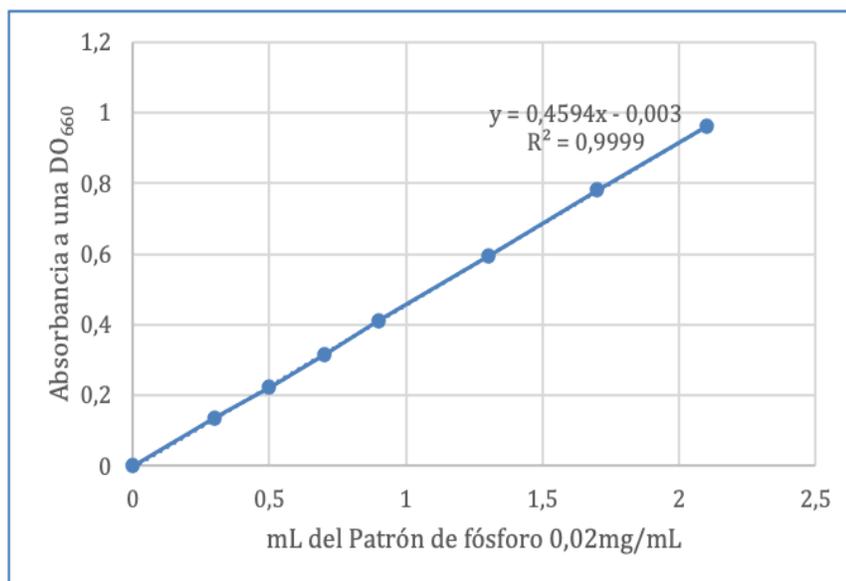
Volúmenes de las soluciones para la obtención de la curva de calibración de fósforo inorgánico

Solución (mL)	Blanco	1	2	3	4	5	6	7
Patrón de fósforo 0,02mg/mL	0	0.3	0.5	0.7	0.9	1.3	1.7	2.1
Agua	4	3.7	3.5	3.3	3.1	2.7	2.3	1.9
Ácido molíbdico*	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Ácido ascórbico**	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

*Luego de la adición del ácido molíbdico se agita bien y se deja en reposo 3 minutos.

** Finalmente con la adición del ácido ascórbico, se deja en reposo 10 min. y se lee la absorbancia DO_{660} para cada punto de la curva.

Valores de absorbancia DO_{660} de acuerdo a las concentraciones de la solución patrón de P. "Curva de calibración con concentraciones de fósforo conocidas.



Obtención del sobrenadante a partir de material vegetal.

- Digerir el material vegetal con nitrógeno líquido
- Resuspender en 2 mL de agua destilada desionizada
- Vórtex por 1 min. a 2500 rpm
- Centrifugar a 8000 rpm por 10 min.

- Tomar 100 µl del sobrenadante diluidos en agua destilada desionizada para un volumen final de 500µl

Procedimiento para la determinación de la cantidad de Fósforo en material vegetal.

Procedimiento y volúmenes de componentes para la determinación del contenido de fósforo en las muestras vegetales evaluadas.

Componentes	Volumen
Sobrenadante (muestra)	1 mL
Agua destilada	1 mL
Ácido molíbdico*	0.5 mL
Ácido ascórbico**	0.5 mL

*Luego de la adición del ácido molíbdico se agita bien y se deja en reposo 3 minutos.

** Con la adición del ácido ascórbico, se agita y se deja en reposo 10 min. y se lee la absorbancia DO_{660} para cada muestra.

Los resultados obtenidos de absorvancia para cada muestra, fueron dispuestos en la curva de calibración descrita en el numeral anterior, obteniéndose los contenidos de fósforo requeridos.

D. Anexo: Cálculos de la fertilización de las materas de papa criolla (*Solanum tuberosum*)

Análisis físico-químico del suelo proveniente del cultivo de papa que se usó para el montaje de las materas



Calle 79B No. 70-16 Bogotá, D.C.
Teléfono: 2231999
Telefax: 2234087
email: agrilab@etb.net.co

Página 1 de 1

ANÁLISIS DE SUELO

02-27-2013

Campo <input checked="" type="checkbox"/>	Invernadero <input type="checkbox"/>	No. Laboratorio	104510
Remitente	Ing. Belén Rocio Fernández	Propietario	Sr. Alejandro Estévez
Ciudad		Asist. Técnico	Ing. José Villar
Dirección		Fecha Muestreo	
Teléfono		Fecha Recepción	19/02/2013

Cultivo	PAPA	Municipio	MADRID
Cultivar	NO ESPECIFICADO	Departamento	CUNDINAMARCA
Densidad	0	Finca	SPLENDOR
Edad	0 No Especificado	Lote	153

RESULTADO

TEXTURA	FRANCO-LIMOSO	pH	6,33	M
		C.E. dS/m	0,96	B
Arena %	30	Sat. Hum. %	Media	N.A.
Limo %	58	G.I.C.E. me/100	22,98	A
Arcilla %	12	C.O. %	4,70	B

Potasio me/100 g	2,3	899	ppm	E	Hierro ppm	36	M	Fósforo ppm	34	M
Calcio me/100 g	15,8	3166	ppm	E	Mn ppm	38	M	S-SO4 ppm	51	M
Mg me/100 g	3,88	472	ppm	A	Cobre ppm	2,8	A	N-NH4 ppm	N.A.	
Sodio me/100 g	1	230	ppm	E	Zinc ppm	18	A	N-NO3 ppm	N.A.	
Aluminio me/100g	N.A.	N.A.	ppm		Boro ppm	0,82	M			

% Sat. Magnesio	16,9	Ca/Mg	4,07
% Sat. Sodio	4,35	Ca/K	6,87
% Sat. Aluminio	N.A.	Mg/K	1,69
% Sat. Potasio	10	(Ca+Mg)/K	8,56
% Sat. Calcio	68,8		

Nº Laboratorio	Identificación	Fósforo Bray II	Fósforo Soluble
		p.p.m de suelo	
SU. 104510	Finca: Splendor Lote: 153	34	4,7

Método: Fósforo Bray II y Soluble (Colorimétrico).

Niveles de los elementos y parámetros del análisis físico-químico del suelo para el cultivo de papa (Gómez y Castro, 2013; Pedraza, 2013; centro de investigación la Selva, 2009).

Análisis físico químico del suelo de las materas

PARÁMETRO	RESULTADO	Unidad	Nivel
Textura	Franco-Limoso		Apto papa
Arena	30	%	
Limo	58	%	
Arcilla	12	%	
pH	6,33		M
C.E	0,96	dS/m	B
Sat. Hum. %	Media		M
C.I.C.E	22,98	me/100	A
C.O	4,7	%	M
M.O	8,1	%	M
Potasio	899	ppm	E
Calcio	3166	ppm	E
Mg	472	ppm	A
Sodio	230	ppm	E
Aluminio	N.A	ppm	N.A
Hierro	36	ppm	M
Mn	38	ppm	A
Cobre	2,8	ppm	M
Zinc	18	ppm	E
Boro	0,88	ppm	A
Fósforo Bray II	34	ppm	B
Fósforo soluble	4,7	ppm	MB

S-SO4	51	ppm	A
N-NH4	N.A	ppm	
N-NO3	N.A	ppm	
% Sat. Magnesio	16,9		M
% Sat. Sodio	4,35		M
% Sat. Aluminio	N.A		N.A
% Sat. Potasio	10		E
% Sat. Calcio	68,8		A

Análisis de fertilización y de la dosis para los tratamientos con fósforo soluble e insoluble.

Cálculos de la determinación de la necesidad del nutriente a aplicar edáficamente mediante el método cuantitativo. Elementos mayores.

Nutriente:	N	P	K	Ca	Mg
Absorción del nutriente en papa criolla (Kg/T) (Arévalo y Fandiño, 2013):	4,02	0,74	8,85	1,72	0,52
Potencial de producción estimado (T/ha) (Arévalo y Fandiño, 2013)	38	38	38	38	38
RPP (kg/ha): Requerimiento nutricional ponderado para un potencial de producción:	152,76	28,12	336,30	65,36	19,76
Nutriente en el suelo (mg/kg):	52,5	34	899	3166	472
Nutriente en el suelo (kg/ha):	105,09	68,00	1798,00	6332,00	944,00
Factor de aprovechabilidad (Gómez, y Castro, 2013):	1,3	4,0	1,7	8,0	4,0
S (kg/ha): Disponibilidad del nutriente en el suelo:	80,8	17,0	1057,6	791,5	236,0
E: Eficiencia de la fertilización (Gómez y Castro, 2013)	50	17	60	65	58
NF (kg/ha): Necesidad del nutriente a aplicar:	143,8	66	NA	-	- 372,8

* Requerimiento nutriente (kg/ha), x balance de saturación de bases:					136,8
Molécula a ser aplicada:	N	P2O5**		CaO	MgO
% Presencia de elemento en molécula:		44		30	60,3
Kg/ha de molécula:	150	150		161,2	226,8
Fuente fertilizante:	Urea	Roca fósforica		Roca fosforica	Micromagnesio
Kg/ha de fertilizante:	326,7	537			567,1
*Análisis importante en la determinación del nutriente a aplicar edáficamente: Aunque el Mg está en contenidos altos en el suelo, y de acuerdo al cálculo el suelo estaría en capacidad de suplir en forma natural el Mg, pero la saturación de K es excesiva y limita la toma de Ca y Mg, por lo que se necesita determinar los requerimientos de Mg a partir de la saturación óptima que es de 20 según Gómez (2013).					
** Para algunos tratamientos como fuente de P insoluble, otros tratamientos con P soluble se usó fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄) bajo los mismos cálculos pero con un contenido de P en la molécula del 18%					
K y Ca están en contenidos excesivos y saturaciones máximas para el elemento, de esta manera se hace un balance con Mg para que no se genere antagonismo con Ca y K.					
NA. No aplicación adicional. De acuerdo al cálculo y la interpretación de la tabla del análisis de suelo, estos elementos están en el suelo en contenidos tales que estaría en condiciones de suplir en forma natural estos nutrientes sin considerar aplicaciones adicionales.					

Cálculos de la determinación de la necesidad del nutriente a aplicar edáficamente mediante el método cuantitativo. Elementos menores.

Nutriente:	Fe	Cu	Zn	B	Mn
Absorción del nutriente en papa criolla (Kg/T) (Arévalo y Fandiño, 2013):	0,0284	0,0011	0,0100	0,0017	0,0057
Potencial de producción estimado (T/ha) (Arévalo y Fandiño, 2013)	38,8	38,8	38,8	38,8	38,8
RPP (kg/ha): Requerimiento nutricional ponderado para un potencial de	1,101	0,044	0,386	0,067	0,219
Nutriente en el suelo (mg/kg):	36	2,8	18	0,9	38
Nutriente en el suelo (kg/ha):	72,00	5,60	36,00	1,76	76,00
Factor de aprovechabilidad (Gómez, 2005):	20,0	10,0	10,0	8,0	25,0
S (kg/ha): Disponibilidad del nutriente en el suelo:	3,6	0,6	3,6	0,2	3,0
E: Eficiencia de la fertilización	6	15	15	15	6
NF (kg/ha): Necesidad del nutriente a aplicar:	NA	NA	NA	NA	NA
Molécula a ser aplicada:					
% Presencia de elemento en molécula:					
Kg/ha de molécula:					
Fuente fertilizante:					
Kg/ha de fertilizante:					
NA. No aplicación adicional. De acuerdo al cálculo y la interpretación de la tabla del análisis de suelo, estos elementos están en el suelo en contenidos tales que estaría en condiciones de suplir en forma natural estos nutrientes sin considerar aplicaciones adicionales.					

Se realizaron los cálculos de los requerimientos de fertilización en general, a continuación, se presenta la descripción del método usado para los cálculos en el caso del fósforo para el suelo de las materas, de acuerdo a los tratamientos. El método aplicado fue el cuantitativo (Gómez y Castro, 2013).

Necesidad de fertilización	
$NF = \frac{Rpp - S}{E} \times 100$	NF: Necesidades de fertilización (kg/Ha/cosecha) Rpp: Requerimiento nutricional ponderado para un potencial de producción estimado (kg/Ha/cosecha) S: Disponibilidad del nutriente en el suelo (Kg/Ha) E: Eficiencia de la fertilización (%)

- **Rpp = 0,74* 38 = 28,12 kg/ha** (absorción del nutriente por el potencial de producción)
- Densidad aparente= 0,8 g/cc para Andisoles (Gómez y Castro, 2013)
- Profundidad radical= 25 cm
- Cantidad de suelo en 1 ha= 2.000.000 kg/ha
- **S = 17 kg/ha** (dato obtenido del nutriente en el suelo descrito en el análisis del Laboratorio, convertido a kg/ha con los datos anteriores de densidad, profundidad y suelo y un factor de aprovechabilidad descrito en la tabla)
- **E = 17%** Para P está entre 10-45% (Gómez y Castro, 2013)
 - ✓ **Necesidad de fertilización de P = 66 kg.ha⁻¹ por cosecha**
 - ✓ **P₂O₅ que se deben aplicar = 150,4 kg.ha⁻¹**
 - ✓ **Cantidad de Roca Fosfórica total = 537 kg.ha⁻¹** (Roca fosfórica utilizada tiene 28% de P₂O₅)

Para una densidad de plantas de 40.000/ha:

- ✓ **Cantidad de Roca Fosfórica por materia: 13,4 g/materia**
- ✓ **Cantidad de fosfato dipotásico por materia: 9,2 g/materia**

Producto comercial utilizado para el ensayo de materas, aporte de roca fosfórica.

GRANUFOS 20		
Composición garantizada:		
Fosforo Total	P ₂ O ₅	20%
Azufre	S	7%
Calcio	CaO	30%
Granulometría: 100% pasa malla 4		

E. Anexo: Fotografías de biopelículas de las 10 cepas evaluadas de *P. fluorescens* sobre hifas de *R. irregularis* en el cultivo *in vitro* de raíces transformadas de zanahoria.



Ceba P28



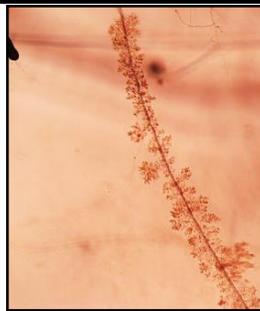
Ceba P29



Ceba P36



Ceba 63



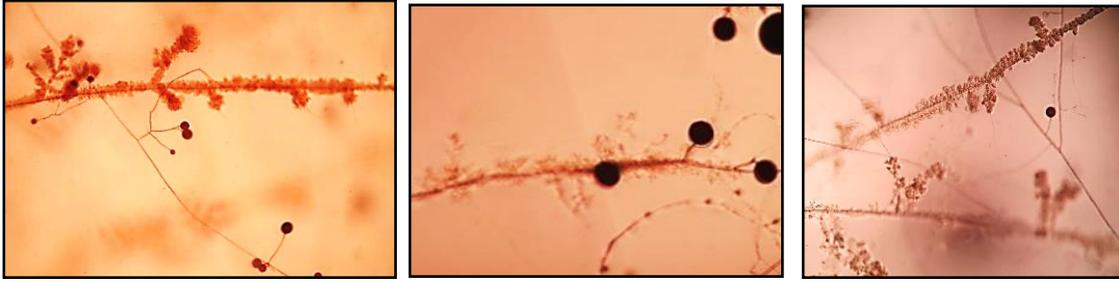
Ceba P74



Ceba P80



Ceba P95

**Cepa P102****Cepa P104****Cepa P108**

Fotografías del crecimiento biopelículas de cepas bacterianas de *Pseudomonas fluorescens* (P28, P29, P36, P63, P74, P80, P95, P102, P104, P108) sobre las hifas del HFMA *R. irregularis* en cultivos *in vitro*: crecimiento alrededor de estructuras ramificadas de absorción (cepas P29, P80, P102); alrededor de esporas (P29, P36, P63, P95); menor grosor de biopelícula sobre la hifa (P63, P104 y P108). Estas fotografías se tomaron al ocular de un microscopio Nikon Eclipse TS100 (Ocular EPI 10x/20).

F. Anexo: Resultados del análisis estadístico

ANOVA para la formación de biopelícula sobre superficie abiótica

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	Prob > F
Modelo	10	79,534095	7,95341	144,9798	
Error	33	1,810338	0,05486		Prob > F
C. Total	43	81,344433			<,0001*

Fuente	N parámetros	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Razón F	Prob > F
Cepa	10	10	79,534095	144,9798	<,0001*

Prueba de Tukey de comparación entre tratamientos de la formación de biopelícula sobre superficie abiótica

$\alpha=0.050$

Nivel	Media de Mínimos Cuadrados
P36 A	4,0000000
P63 A	4,0000000
P108 B	2,9637500
P28 B C	2,4120000
P74 C D	2,0927500
P104 D E	1,7882500
P102 E F	1,3010000
P95 F	1,1570000
P80 G	0,4155000
P29 G	0,1830000
Blanco G	0,0057500

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.

ANOVA para la motilidad por *swarming*

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	Prob > F
Modelo	9	27197.205	3021.91	61.4796	
Error	30	1474.593	49.15		Prob > F
C. Total	39	28671.798			<.0001*

Fuente	N parámetros	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Razón F	Prob > F

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	
Cepa	9	9	27197.205	61.4796	<.0001*

Prueba de Tukey de comparación entre tratamientos de la motilidad por *swarming*

$\alpha=0.050$

Nivel					Media de Mínimos Cuadrados
P80	A				83.125000
P95	A				81.750000
P28		B			55.000000
P29		B	C		50.500000
P102		B	C	D	42.000000
P104			C	D	36.675000
P36				D	28.000000
P63				E	18.250000
P74				F	6.750000
P108				F	6.375000

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.

Correlaciones Multivariadas

	Longitud Biopelícula	Swarming
Long. Biopelícula	1.0000	0.4043
Swarming	0.4043	1.0000

ANOVA para la motilidad por *swimming*

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	
Modelo	9	591.20000	65.6889	10.2107	
Error	20	128.66667	6.4333		Prob > F
C. Total	29	719.86667			<.0001*

Fuente	N parámetros	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Razón F	Prob > F
Cepa	9	9	591.20000	10.2107	<.0001*

Prueba de Tukey de comparación entre tratamientos de la motilidad por *swimming*

$\alpha=0.050$

Nivel					Media de Mínimos Cuadrados
P29	A				25.666667
P28	A	B			24.666667
P102	A	B			24.000000
P63	A	B			23.666667
P80	A	B	C		22.333333
P104	A	B	C		21.666667
P74	A	B	C		21.000000
P95		B	C	D	18.000000
P36			C	D	15.666667

Nivel	Media de Mínimos Cuadrados
P108	D 10.666667

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.

Correlaciones Multivariadas

	Longitud Biopelícula	Swimming
Long. Biopelícula	1.0000	0.4191
Swimming	0.4191	1.0000

ANOVA para la longitud de biopelícula sobre hifas de HFMA

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	Prob > F
Modelo	9	48,031688	5,33685	6,2299	
Error	20	17,132917	0,85665		Prob > F
C. Total	29	65,164604			0,0003*

Fuente	N parámetros	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Razón F	Prob > F
Cepa	9	9	48,031687	6,2299	0,0003*

Prueba de Tukey de comparación entre tratamientos de la longitud de biopelícula sobre hifas de HFMA

$\alpha=0.050$

Nivel	Media de mínimos cuadrados
P28 A	9,27273
P29 A	8,95455
P102 A B	8,20455
P74 A B C	7,86364
P95 A B C D	7,75758
P80 A B C D	6,90909
P36 A B C D	4,80303
P108 B C D	3,81818
P63 C D	3,30303
P104 D	2,95455

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos

ANOVA para la longitud de micelio extrarradical de HFMA

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	Prob > F
Modelo	9	871,2247	96,8027	6,2101	
Error	20	311,7600	15,5880		Prob > F
C. Total	29	1182,9848			0,0003*

Fuente	N parámetros	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Razón F	Prob > F
Cepa	9	9	871,22474	6,2101	0,0003*

Prueba de Tukey de comparación entre tratamientos de la longitud de micelio extrarradical de HFMA $\alpha=0.050$

Nivel		Media de mínimos cuadrados
P36	A	47,38095
P102	A B	38,09524
P29	A B	35,95238
P28	A B C	28,09524
P63	B C	26,01190
P108	B C	24,46429
P95	B C	23,57143
P74	B C	21,25000
P80	B C	18,21429
P104	C	12,38095

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.

Correlación multivariada

	Long. Biopelícula	Longitud Hifa
Long. Biopelícula	1,0000	0,3396
Longitud Hifa	0,3396	1,0000

ANOVA para el número de esporas

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	Prob > F
Modelo	9	385247,91	42805,3	18,8633	
Error	20	45384,79	2269,2	Prob > F	
C. Total	29	430632,71		<,0001*	

Fuente	N parámetros	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Razón F	Prob > F
Cepa	9	9	385247,91	18,8633	<,0001*

Prueba de Tukey de comparación entre tratamientos el número de esporas

Nivel		Media de mínimos cuadrados
P36	A	565,63810
P28	B	419,35238
P29	B C	380,34286
P102	B C D	332,80000
P108	C D E	272,45714
P80	C D E	248,07619
P74	D E	241,37143
P95	D E	218,20952
P104	D E	210,28571
P63	E	177,98095

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.

Correlaciones multivariadas

	Long. Biopelícula	Longitud Hifa
Long. Biopelícula	1,0000	0,3396
Longitud Hifa	0,3396	1,0000

Correlaciones multivariadas

	Longitud de Hifa	# Esporas
Longitud de Hifa	1,0000	0,7600
# Esporas	0,7600	1,0000

ANOVA para la concentración de P en tejido foliar

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	Prob > F
Modelo	13	69612,65	5354,82	5,5251	
Error	42	40705,73	969,18		Prob > F
C. Total	55	110318,38			<.0001*

Fuente	N parámetros	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Razón F	Prob > F
Cepa	13	13	69612,65	5,5251	<.0001*

Prueba de Tukey de comparación entre tratamientos de la concentración de P en tejido foliar

Nivel	Media de mínimos cuadrados		
P102	A		213.36450
P Sol.	A	B	153.62400
P108	A	B C	144.54350
P28	A	B C	144.07625
P63		B C	129.40075
P29		B C	123.79225
P95		B C	113.99075
P104		B C	113.44900
P74		B C	110.83525
P80		B C	106.11325
P36		B C	97.93275
HFMA + P Insol.		B C	96.06450
P Insol.		C	75.07900
No P.		C	66.68075

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.

Correlaciones Multivariadas

	Longitud Biopelícula	Contenido P
Long. Biopelícula	1,0000	0,4997
Contenido P	0,4997	1,0000

ANOVA para la colonización micorrícica total

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	Prob > F
Modelo	13	7731.723	594.748	4.6502	
Error	55	7034.308	127.897	Prob > F	
C. Total	68	14766.031		<.0001*	
Fuente	N parámetros	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Razón F	Prob > F
Cepa	13	13	7731.7227	4.6502	<.0001*

Prueba de Tukey de comparación entre tratamientos de la colonización micorrícica total

Nivel					Media de mínimos cuadrados
P102	A				64.680000
P29		B			48.020000
P80		B	C		45.000000
P104		B	C		44.680000
P74		B	C		44.660000
P28		B	C	D	41.980000
P95		B	C	D	40.020000
P108		B	C	D	39.320000
HFMA + P Insol.		B	C	D	37.340000
P36		B	C	D	32.660000
P Sol.			C	D	29.320000
P63				D	26.680000
No P.				D	26.000000
P Insol.				E	23.320000

Correlaciones Multivariadas

	Contenido P	%Colonización Total
Contenido P	1.0000	0.6673
%Colonización total	0.6673	1.0000

ANOVA para la colonización micorrícica metabólicamente activa

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	Prob > F
Modelo	13	672.9118	51.7624	2.5164	
Error	55	1131.3730	20.5704	Prob > F	
C. Total	68	1804.2848		0.0088*	
Fuente	N parámetros	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Razón F	Prob > F
Cepa	13	13	672.91175	2.5164	0.0088*

Prueba de Tukey de comparación entre tratamientos de la colonización micorrícica metabólicamente activa

Nivel		Media de mínimos cuadrados				
P102	A				10.988000	
P80	A	B			9.900000	
P29	A	B			9.178000	
P28	A	B	C		8.200000	
P104	A	B	C		7.992000	
P74	A	B	C	D	7.012000	
HFMA + P Insol.	A	B	C	D	E	6.668000
P108	A	B	C	D	E	6.328000
P95		B	C	D	E	4.286000
No P.			C	D	E	2.754000
P Insol.			C	D	E	2.750000
P36				D	E	2.194000
P Sol.				D	E	2.126000
P63					E	1.068000

ANOVA para el peso seco de la parte aérea de las plantas de papa

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	Prob > F
Modelo	13	12.062857	0.927912	1.7177	
Error	56	30.252000	0.540214		Prob > F
C. Total	69	42.314857			0.0823
Fuente	N parámetros	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Razón F	Prob > F
Cepa	13	13	12.062857	1.7177	0.0823

Prueba de Tukey de comparación entre tratamientos del peso seco de la parte aérea de las plantas de papa

Nivel		Media de mínimos cuadrados	
P Sol.	A		4.5800000
P36	A	B	4.0400000
P29	A	B	3.9800000
P102	A	B	3.9400000
P80	A	B	3.8600000
P104	A	B	3.8400000
P108	A	B	3.7800000
P63	A	B	3.7200000
P Insol.	A	B	3.7000000
P95	A	B	3.5200000
HFMA + P Insol.	A	B	3.4200000
P28	A	B	3.4000000
P74	A	B	3.0200000
1 SP		B	2.8800000

ANOVA para el peso seco de raíz

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	Prob > F
Modelo	13	0.3714530	0.028573	0.6129	
Error	55	2.5641740	0.046621	Prob > F	
C. Total	68	2.9356270		0.8330	
Fuente	N parámetros	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Razón F	Prob > F
Cepa	13	13	0.37145299	0.6129	0.8330

Prueba de Tukey de comparación entre tratamientos del peso seco de raíz

Nivel		Media de mínimos cuadrados
P28	A	0.84860000
P29	A	0.80220000
P74	A	0.77320000
P63	A	0.77240000
HFMA + P Insol.	A	0.75020000
P108	A	0.71080000
No P.	A	0.69880000
P95	A	0.69220000
P Insol.	A	0.67480000
P36	A	0.65800000
P104	A	0.65140000
P80	A	0.64320000
P Sol.	A	0.62160000
P102	A	0.57680000

Bibliografía

Agnolucci, M., Battini, F., Cristani, C., Giovannetti, M. (2015). Diverse bacterial communities are recruited on spores of different arbuscular mycorrhizal fungal isolates. *Biol. Fertility Soils* 51, 379–389. doi: 10.1007/s00374-014-0989-5

Agvise Laboratories. (2013). Plant Nutrient Analysis Sampling Guide. <http://www.agvise.com/wp-content/uploads/2012/07/Plant-Tissue-SamplingGuide2013.pdf>

Ahmad, I., Khan, M., Altaf, M., Qais, F., Ansari, F., Rumbaugh, K., (2017). Biofilms: an overview of their significance in plant and soil health. *Biofilms in Plant and Soil Health*. Wiley, Hoboken, pp. 1–26.

Akyol, T., Niwa, R., Hirakawa, H., Maruyama, H., Sato, T., Suzuki, T., Fukunaga, A., Sato, T., Yoshida, S., Tawaraya, K., Saito, M., Ezawa, T., Sato, S. (2019). Impact of Introduction of Arbuscular Mycorrhizal Fungi on the Root Microbial Community in Agricultural Fields. *Microbes Environ.* Mar 30;34(1):23-32. doi: 10.1264/jsme2.ME18109.

Balzerque, C., Puech-Pagés, V., Bécard, G., Rochange, S. (2010). The regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis by phosphate in pea involves early and systemic signalling events. *J. Exp. Bot.* 62, 1049–1060. doi: 10.1093/jxb/erq335

Banerjee, S., Palit, R., Sengupta, C., Standing, D. (2010). Stress induced phosphate solubilization by *Arthrobacter* sp. and *Bacillus* sp. Isolated from tomato rhizosphere. *Australian Journal of crop science* 4(6):378-383.

Barahona, E., Navazo, A., Coronado, F., Aguirre, D., Martínez, F., Espinosa, M., Martín, M., Rivilla, R. (2010). Efficient rhizosphere colonization by *Pseudomonas fluorescens* f113 mutants unable to form biofilms on abiotic surfaces. *Environ Microbiol.* Dec;12(12):3185-95. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02291.

Bertsch, F. (2003). Absorción de nutrimentos por los cultivos. *Asociación Costarricense de la Ciencia del Suelo*. San José, Costa Rica. 307p.

Bastidas, L., Uribe D. (2010). Protocolo de motilidad “*Swimming y Swarming*”. *Laboratorio de Microbiología Agrícola*. IBUN. Universidad Nacional de Colombia.

Berardo, A., Reussi, N., Diovisalvi, N. (2010). Pautas para el muestreo de peciolas en papa. *Laboratorio de suelos Fertilab*. Mar de Plata.

Bindraban, P., Dimkpa, C., Pandey R. (2020). Exploring phosphorus fertilizers and fertilization strategies for improved human and environmental health. *Biology and Fertility of Soils* 56:299–317

Bianciotto, V., Andreotti, S., Balestrini, R., Bonfante, P., Perotto, S. (2001). Mucoïd Mutants of the Biocontrol Strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 Show Increased Ability in Biofilm Formation on Mycorrhizal and Nonmycorrhizal Carrot Roots. *The American Phytopathological Society*. Vol. 14, No. 2, 2001, pp. 255–260.

Bolan, N., Robson, A., and Barrow, N. (1984). Increasing phosphorus supply can increase the infection of plant roots by vesicular- arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.* 16, 419–420.

Browne, P., Rice, O., Miller, S., Burke, J., Dowling, D., Morrissey, J. (2009). Superior inorganic phosphate solubilization is linked to phylogeny within the *Pseudomonas fluorescens* complex. *Applied Soil Ecology*. 2009; 43:131–8.

Bücking, H., Shacha, Y. (2005). Phosphate uptake, transport and transfer by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is stimulated by increased carbohydrate availability. *New Phytologist* 165: 899–912. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01274.x

Cordell, D., Drangert, J., White, S. (2009). The story of phosphorus: global food security and food for thought. *Glob Environ Chang* 19:292– 305

DANE – Departamento Administrativo Nacional de Estadística– (2022). Boletín mensual N°115 Insumos y factores de la producción agropecuaria (SIPSA_1), 15 de febrero de 2022 [documento en línea]. Disponible en:

https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/Bol_Insumos_ene_2022.pdf

Cano, M. (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 14(2), 15-31.

Cavagnaro, T., Bender, F., Asghari, H., Heijden, M. (2015). The role of arbuscular mycorrhizas in reducing soil nutrient loss. *Elsevier Ltd.* 1360-1385. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2015.03.004>.

Ceballos, I., Michael, R., Fernandez, C., Peña, R., Rodriguez, A., Sanders, I. (2013). The in vitro mass-produced model mycorrhizal fungus, *Rhizophagus irregularis*, significantly increases yields of the globally important food security crop cassava. *Plos One*, 2013, v. 8, n. 8, 2013, e70633.

Ceballos, I., Mateus, I., Peña, R., Peña-Quemba, D., Robbins, C., Ordoñez, Y, Rocikiewicz, P., Rojas, E., Thuita, M., Mlay, D., Masso, C., Vanlawe, B., Ridríguez, A., Sanders, I. (2019). Using variation in arbuscular mycorrhizal fungi to drive the productivity of the food security crop cassava. *bioRxiv*. [Preprint]. doi: 10.1101/830547

Centro de investigación La Selva. (2009). Evaluación de tres variedades comerciales de papa criolla en sus características agroindustriales bajo el efecto del N-K en tres municipios del departamento de Antioquia. *Escuela campesina de agricultores*. Rionegro, Antioquia.

Chaturvedi A., Cruz, J., Robbins, C., Loha, A., Menin, L., Gasilova, N., Masclaux, F., Lee, S., Sanders I. (2021). The methylome of the model arbuscular mycorrhizal fungus, *Rhizophagus irregularis*, shares characteristics with early diverging fungi and *Dikarya*. (2021) 4:901

Chung, H., Li, X., Kalinga, D., Lim, S., Yada, R., Liu, Q. (2014). Physicochemical properties of dry matter and isolated starch from potatoes grown in different locations in Canada. *Food Res. Int.* 57, 89–94.

Cordell, D., Rosemarin, A., Schroder, J., Smit, A., (2011). Towards global phosphorus security: a systems framework for phosphorus recovery and reuse options. *Chemosphere* 84, 747–758.

Covacevich, F., Echeverria, H. (2010). Indicadores para seleccionar inóculos de hongos micorrícicos arbusculares eficientes en suelos moderadamente ácidos. *Cl. Suelo Argentina* 28(1): 9-22, 2010.

Cruz, A., Ishii, T. (2012). Arbuscular mycorrhizal fungal spores host bacteria that affect nutrient biodynamics and biocontrol of soil-borne plant pathogens. *Biol. Open* 1, 52–57. doi: 10.1242/bio.2011014

Danhorn, T. y Fuqua C. (2007). Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 1: 401-22

Elser, J., Bennett, E., (2011). Phosphorus cycle: a broken biogeochemical cycle. *Nature* 478, 29–31.

Emmett, B., Lévesque, V., Harrison, M. (2021). Conserved and reproducible bacterial communities associate with extraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *The ISME Journal* 15:2276–2288 <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00920-2>

Etesami, H., Jeong, B., Glick B. (2021) Contribution of Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Phosphate–Solubilizing Bacteria, and Silicon to P Uptake by Plant. *Front. Plant Sci.* 12:699618. doi: 10.3389/fpls.2021.699618

FAO. (2008). International year of the potato. Why Potato? <https://www.fao.org/potato-2008/en/aboutiyp/index.html>. 29.01.2022

FAO, IFAD, UNICEF, WFP, WHO. (2021). The State of Food Security and Nutrition in the World. Transforming food systems for food security, improved nutrition and affordable healthy diets for all. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cb4474en>

FAO. 2019. World fertilizer trends and outlook to 2022. Rome.

FAOSTAT. (2020). Food and agriculture data. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCinfo>

Fiske, C., Subbarow, Y. (1925). The Colorimetric determination of phosphorus. *Biochemical Laboratory*, Harvard Medical School, Bost. Tomado de <http://www.jbc.org/>

Fortin, J.A, Bécard, G., Declerck, S., Dalpé, Y., St-Arnaud, M., Coughlan, A.P., Piché, Y. (2002). "Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures." *Can. J. Bot.* 80: 1-20.

Frey-Klett, P., Garbaye, J., Tarkka, M. (2007). The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist* (2007) 176: 22–36

Fuquen, A., Siaucho, J. (2009). Evaluación del efecto *Pseudomonas fluorescens* y micorrizas arbusculares sobre el rendimiento en papa criolla (*Solanum phureja*) con fertilización fosfórica en Sibate (Cundinamarca). *Tesis de grado, facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia*.

Gamalero, E., Trotta A., Massa, N., Copetta, A., Martinotti, M., Berta, G. (2004). Impact of two fluorescent pseudomonads and an arbuscular mycorrhizal fungus on tomato plant growth, root architecture and P acquisition. *Mycorrhiza* 14: 185–192.

Gebhardt, C. (2013). Bridging the gap between genome analysis and precision breeding in Potato. *Trends in Genetics* 29(4), 248-256.

Ghorchiani, M., Etesami, H., (2018). Improvement of growth and yield of maize under water stress by co-inoculating an arbuscular mycorrhizal fungus and a plant growth promoting rhizobacterium together with phosphate fertilizers. *Agri. Eco and Envi.*

Vol 258, 59–70. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.02.016>

Gómez, M. (2013). Requerimientos nutricionales y manejo de la fertilización en el cultivo de papa. Curso de actualización en nutrición manejo integrado del cultivo de la papa. C./ Tibaitatá Corpoica.

Gómez, M. (2018). Acumulación y distribución de macronutrientes minerales en dos cultivares de *Solanum tuberosum* L. en diferentes ambientes del altiplano Cundi-boyacense. Tesis de doctorado, Universidad Nacional de Colombia.

Gómez, M., Castro, H. (2013). Fertilidad de suelos y fertilizantes, Capítulo IV. *Ciencia del Suelo principios básicos*.

Gherna, R. (1994). "Methods for general and molecular bacteriology". In Gerhardt, Murray, Wood and Krieg (ed.). American society for microbiology. pp. 278-292.

Hamon, M., Lazazzera B. (2001). The sporulation transcription factor SpoOA is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 42: 1119-1209.

Hettiarachchi, R., Dharmakeerthi, R., Seneviratne, G., Jayakody, A., De Silva, K., Gunathilake, T., Thewarapperuma, A., (2016). Determination of desirable properties of bacteria, fungi and their biofilm associated with rubber rhizosphere. *Trop. Agric. Res.* 27, 399. <https://doi.org/10.4038/tar.v27i4.8216>.

Herrera, MT. (2004). El papel del biofilm en el proceso infeccioso y la resistencia. *NOVA*. 2:71- 80.

Higo, M., Azuma, M., Kamiyoshihara, Y., Kanda, A., Tatewaki, Y., Isobe, K. (2020). Impact of phosphorus fertilization on tomato growth and arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Microorganisms* 8:178. doi: 10.3390/microorganisms8020178

Hinsa, S., O'Toole G., (2006). Biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365: a role for LapD. *Microbiology*, 152, 1375–1383

Hussain, M., Qayum, A., Xiuxiu, Z., Liu, L., Hussain, K., Yue, P., Marwa, Y., Koko, Y., Hussain, A., Li, X. (2021). Potato protein: An emerging source of high quality and allergy free protein, and its possible future based products, *Food Research International*, Volume 148, 2021, 110583, ISSN 0963-9969, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110583>.

Inculet, C., Mihalache, G., Sellitto, M., Hlihor, R., Stoleru, V. (2019). The Effects of a Microorganisms-Based Commercial Product on the Morphological, Biochemical and Yield of Tomato Plants under Two Different Water Regimes. *Microorganisms*, 7, 706; doi:10.3390/microorganisms7120706

IFASTAT, 2021. <http://ifadata.fertilizer.org/ucSearch.aspx>. (Consultado en junio 07 de 2022).

Iffis, B., St-Arnaud, M., Hijri, M. (2016). Petroleum hydrocarbon contamination, plant identity and arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) community determine assemblages of the AMF spore-associated microbes. *Environ. Microbiol.* 18, 2689–2704. doi: 10.1111/1462-2920.13438

Jara, J., Alarcón, F., Monnappa, A., Santos, J., Bianco, V., Nie, P., Ciamarra, M., Canales, Á., Dinis, L., López, I., Valeriani, C., Orgaz, B. (2021). Self-Adaptation of *Pseudomonas fluorescens* Biofilms to Hydrodynamic Stress. *Front. Microbiol.* 11:588884. doi: 10.3389/fmicb.2020.588884

Jayasinghearachchi, H., Seneviratne, G. (2006). Fungal solubilization of rock phosphate is enhanced by forming fungal- rhizobia biofilm. *Soil Biol. Biochem.* 38, 405-408.

Johansson, J., Paul, L., Finlay R. (2004). Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbial Ecology*, 48(1):1–13.

Johri, A., Oelmüller, R., Dua, M., Yadav, V., Kumar, M., Tuteja, N., Varma, A., Bonfante, P., Persson, B. Stroud, R. (2015). Fungal association and utilization of phosphate by plants: success, limitations, and future prospects. *Front. Microbiol.* 6:984. doi:10.3389/fmicb.2015.00984

Kauwenbergh, J. (2010). World phosphorus rock reserves and resources. *International Fertilizer Development Center, Muscle Shoals*

Keymer, A., Pimprikar, P., Wewer, V., Huber, C., Brands, M., Bucerius, S., Delaux, P., Klingl, V., Röpenack-Lahaye, E., Wang, T., Eisenreich, W., Dörmann, P., Parniske, M., Gutjahr, C. (2017). Lipid transfer from plants to arbuscular mycorrhiza fungi eLife 6:e29107. <https://doi.org/10.7554/eLife.29107>

King, A. (2011). Nutrient Losses in Agriculture: the Role of Biochar and Fungal. *The Journal of Undergraduate Research*, 11, 16-22.

Kumar, C., Prakash, S., Prashantha, G., Kumar, M., Lohith, S., Chikkaramappa, T. (2013). Dry matter production and yield of potato as influenced by different sources and time of fertilizer application and soil chemical properties under rainfed conditions. *Res. J. Agric. Sci.* 4, 55-159.

Lara, S. (2007). Determinación del potencial agronómico de aislamientos nativos de *Pseudomonas fluorescens* en términos de su capacidad solubilizadora de fosfatos y antagonista contra *Rhizoctia solani*. *Instituto de Biotecnología*. Bogota., Universidad Nacional de Colombia.

Lecomte, J., Arnaud, M. (2011). Isolation and identification of soil bacteria growing at the expense of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Lett.* Apr;317(1):43-51. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02209.x.

Leonel, M., Carmo, E., Fernandez, A., Franco, C., Soratto, R. (2016). Physicochemical properties of starches isolated from potato cultivars grown in soils with different phosphorus availability. *J. Sci. Food Agric.* 96, 1900–1905.

Y., P., Lu, X., Gatto M. (2021). The Status and Challenges of Sustainable Intensification of Rice-Potato Systems in Southern China. *American Journal of Potato Research*, 98:361–373.

Marulanda, A. (2006). Estudio de los mecanismos implicados en la resistencia de las plantas a estrés osmótico inducidos por microorganismos autóctos promotores del crecimiento vegetal (Hongos micorrícicos arbusculares y bacterias). *Tesis doctoral microbiología. Universidad de Granada.*

McCarter, L., Morabe, M., (2019). *Swimming and Swarming Motility*. Encyclopedia of Microbiology, 4e. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.90742-8.

McGill, C., Kurilich, A., Davignon, J. (2013). The role of potatoes and potato components in cardiometabolic health: A review. *Annals of Medicines*, 1–7.

Miranda, J., Harris, P. (1994). The effect of soil phosphorus on the external mycelium growth of arbuscular mycorrhizal fungi during the early stages of mycorrhiza formation. *Plant. Soil*. 166, 271–280. doi: 10.1007/BF00008340

Mogollon, J., Beusen, A., Grinsven, H., Westhoek, H., Bouwman, A. (2018). Future agricultural phosphorus demand according to the shared socioeconomic pathways. *Glob Environ Chang*, 50:149–163.

Mosse, B. (1973). Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza IV. In soil given additional phosphate. *New Phytol.* 72, 127–136. doi: 10.1111/j.1469-8137.1973.tb02017.x

Murphy, J., Riley, J. (1962). A modified single solution method for determination of phosphate in natural water. *Anal. Chim. Acta* 27(31-36).

Nazir, R., Warmink, J., Boersma, H., Elsas, J. (2009). Mechanisms that promote bacterial fitness in fungal-affected soil microhabitats. *FEMS Microbial Ecology*, 71:161–8.

Novinscak, A., Fillion, M. (2018). Enhancing total lipid and stearidonic acid yields in *Buglossoides arvensis* through PGPR inoculation. *J. Appl. Microbiol.* 125, 203–215.

Nuccio, E., Hodge, A., Pett, J., Herman, D., Weber, P., Fireste, M. (2013). An arbuscular mycorrhizal fungus significantly modifies the soil bacterial community and nitrogen cycling during litter decomposition. *Environmental Microbiology*.

Ñústez, C., Santos, M., Navia, S., Cotes, J. (2006). Evaluación de la fertilización fosfórica foliar y edáfica sobre el rendimiento de la variedad de papa 'Diacol Capiro' (*Solanum tuberosum L.*). *Agronomía Colombiana*, 24(1): 111-121, 2006.

Ordoñez, M. (2009). Interacción sinérgica entre hongos formadores de micorrizas arbusculares- *Pseudomonas fluorescens* y su relación en la nutrición vegetal de fósforo. *Tesis de maestría en microbiología. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia*.

Ordoñez, Y., Fernández, B., Lara, L., Rodríguez, A., Uribe, D., Sanders, I. (2016). Bacteria with phosphate solubilizing capacity alter mycorrhizal fungal growth both inside and outside the root and in the presence of native microbial communities. *PLOS ONE* doi: 10.1371/journal.pone.0154438

O'Toole, G., Kolter, R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol*. May;28(3):449-61. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00797. x.

O'Toole, G., Kaplan, HB., Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*. 2000; 54:49-79. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.49. PMID: 11018124.

O'Toole, G., Pratt, L., Watnick, P., Newman, D., Weaber, V., Kolter, R. (1999). Genetic approaches to the study of biofilms. *Methods Enzymol* 310: 91-109.

Owen, D., Williams, A., Griffith, G., Withers, P. (2015). Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition. *Applied Soil Ecology*, 86:41–54.

Pandit, A., Adholeya, A., Cahill, D., Brau, L., Kochar, M. (2020), Microbial biofilms in nature: unlocking their potential for agricultural applications. *J Appl Microbiol*, 129: 199-211. <https://doi.org/10.1111/jam.14609>

Pedraza. (2013). Manejo de la fertilización en el cultivo de Papa, a partir del análisis de suelo. Curso de actualización en nutrición manejo integrado del cultivo de la papa. C./ *Tibaitatá Corpoica*.

Peña, C., Cardona G. (2010). *Dinámica de los suelos amazónicos: Procesos de degradación y alternativas para su recuperación*. Leticia. *Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas - Sinchi*.

Peña, V., Lee, S., Thuita, M., Mlay, D., Masso, C., Vanlauwe, B., Rodriguez, A., Sanders, I. (2021). The phosphate inhibition paradigm: host and fungal genotypes determine arbuscular mycorrhizal fungal colonization and responsiveness to inoculation in cassava with increasing phosphorus supply. *Front. Plant Sci.* 12:693037. doi: 10.3389/fpls.2021.693037

Pérez, J., Luna, L., Burbano, O. (2018). Acumulación de biomasa en yuca (*Manihot esculenta* C.) ante la respuesta a la aplicación de fertilizantes NPK y biofertilizantes en condiciones de invernadero en dos tipos de suelo. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*. Vol. 12 - No. 2 - pp. 456-463, 2018

Pérez, W., Villareal, H. (2019). Cadena de la papa. Indicadores e instrumentos. *Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural*. <https://sioc.minagricultura.gov.co/>

Phillips, J. y Hayman, D. (1970). Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesiculararbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55(159-161).

Quinde, B. (2022). Colombia mira a los fosfatos como un mineral de interés estratégico. 2021. <https://camiper.com/tiempominero>. Consulta el 5 de febrero de 2022

Raklami, A., Bechtaoui, N., Tahiri, A., Anli, M., Meddich, A., Oufdou, K. (2019). Use of Rhizobacteria and Mycorrhizae Consortium in the Open Field as a Strategy for Improving Crop Nutrition, Productivity and Soil Fertility. *Front. Microbiol.* 10:1106. doi: 10.3389/fmicb.2019.01106

Ramsey, M., Whiteley, M. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* attachment and biofilm development in dynamic environments. *Molecular Microbiology* (2004) 53(4), 1075 – 1087. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04181.x.

Rana, K., Kour, D., Yadav, A., Yadav, N., Saxena A. (2020). Agriculturally important microbial biofilms: Biodiversity, ecological significances, and biotechnological applications. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Biofilms, Elsevier, Pages 221-265.*

Rizzardi, M. (2017). Efectos de la inoculación con hongos micorrícicos (*Glomus intraradices*) y bacterias BPCV (*Pseudomonas fluorescens*) sobre el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en vivero y en cultivo bajo invernadero. *Universidad Nacional Del Litoral Facultad De Ciencias Agrarias.*

Rodríguez, G., Caravaca, F., Fernández, A., Alguacil, M., Fernández, M., Roldán, A. (2017). Arbuscular mycorrhizal fungi inoculation mediated changes in rhizosphere bacterial community structure while promoting revegetation in a semiarid ecosystem. *Elsevier B.V.*

Rodriguez, A., Sanders, I. (2015). The role of community and population ecology in applying mycorrhizal fungi for improved food security. *ISME Journal*, 9:1053–61. doi: 10.1038/ismej.2014.207 PMID: 25350159

Saini, I., Kaushik, P., Huqail, A., Khan, F., Siddiqui, M. (2021). Effect of the diverse combinations of useful microbes and chemical fertilizers on important traits of potato. *Saudi Journal of Biological Sciences*, Volume 28, Issue 5, 2021, Pages 2641-2648, ISSN 1319-562X, <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.02.070>.

Salvioli di Fossalunga, A., Novero, M. (2019). To trade in the field: the molecular determinants of arbuscular mycorrhiza nutrient exchange. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 6:12. doi: 10.1186/s40538-019-0150-7

Santillana N. (2006). Producción de biofertilizantes utilizando *Pseudomonas* sp. *Ecología Aplicada*, 5(1,2), 2006. ISSN 1726-2216

Showkat, S., Murtaza, I., Laila, O., Ali, A. (2012). Biological Control of *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus* sp. by *Pseudomonas fluorescens* Isolated From Wheat Rhizosphere Soil of Kashmir. *J Pharm Biol Sci*, 1(4):24-32.

Sattari, S., Bouwman, A., Giller, K., Ittersum, M. (2012). Residual soil phosphorus as the missing piece in the global phosphorus crisis puzzle. *PNAS* 109, 6348–6353.

Scheublin, T., Sanders, I., Keel, C., Meer, J. (2010). Characterisation of microbial communities colonising the hyphal surfaces of arbuscular mycorrhizal fungi. *The ISME Journal* 4, 752–763

Schilling, G., Eißner, H., Schmidt, L., Peiter, E. (2016). Yield formation of five crop species under water shortage and differential potassium supply. *J. Plant Nut. Soil Sci.* 179(2), 234-243.

Sharma, S., Compant, S., Ballhausen, M., Ruppel, S., Franken, P. (2020). The interaction between *Rhizoglyphus irregularis* and hyphae attached phosphate solubilizing bacteria increases plant biomass of *Solanum lycopersicum*. *Microbiological Research* 240 126556.

Shinde, S., Zerbs, S., Collart, F., Cumming, J. (2019). *Pseudomonas fluorescens* increases mycorrhization and modulates expression of antifungal defense response genes in roots of aspen seedlings. *BMC Plant Biol.* 19, 4. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1610-0>.

Simões, M., Simoes, L., Pereira, M., Vieira, M. (2008). Antagonism between *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* in planktic systems and in biofilms. *Biofouling*, 24(5):339-49. doi: 10.1080/08927010802239154.

Singh, M., Singh, D., Gupta, A., Pandey, K., Singh, P., Kumar A. (2019). Chapter Three - Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Application in Biofertilizers and Biocontrol of Phytopathogen. *PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture, Woodhead Publishing*, 2019, Pages 41-66, ISBN 9780128158791, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815879-1.00003-3>.

SIRIAGRO. Sistema de Reporte de Información de Insumos Agropecuarios de Minagricultura. Boletín de precios de insumos agropecuarios no. 1 de 2021. Tomado de: <https://sioc.minagricultura.gov.co/Boletines/BOLET%C3%8DN%20DE%20PRECIOS%20DE%20INSUMOS%20AGROPECUARIOS%20No.1%20de%202021.pdf>

Smith, S., Read, D. (2008). The mycorrhizal symbiosis. San Diego, USA: *Academic Press*.

Spatafora, J., Chang, Y., Benny, G., Lazarus, K., Smith, M., Berbee, M., Bonito, G., Corradi, N., Grigoriev, I., Gryganskyi, A., James, T., O'Donnell, K, Roberson, R., Taylor, T., Uehling, J., Vilgalys, R., White, M., Stajich, J. (2017). Phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *ISSN: 0027-5514 1557-2536*

St-Arnaud, M., Hamel, C., Fortin, J. (1996). Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an in vitro system in the absence of host roots. *Mycological Research*. 100 (3): 328 – 332.

Suárez, Z., Caballero, J., Venturi, V. (2008). The new group of non-pathogenic plant-associated nitrogen-fixing Burkholderia spp. shares a conserved quorum-sensing system, which is tightly regulated by the RsaL repressor. *Microbiology*, 154:2048–59.

Sugiura, Y., Akiyama, R., Tanaka, S., Yano, K., Kameoka, H, Kawaguchi, M., Akiyama, K., Saito, K. (2019). Myristate as a carbon and energy source for the asymbiotic growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *International license CC-BY-NC-ND 4.0*

Tennant, D. (1975). A test of a modified line intersect method of estimating root length. *Journal of Ecology* 63: 995-1001.

Thomson, B., Robson, A., Abbott, L. (1986). Effects of phosphorus on the formation of mycorrhizas by *Gigaspora calospora* and *Glomus fasciculatum* in relation to root carbohydrates. *New Phytol.* 103, 751–765. doi: 10.1111/j.1469-8137.1990.tb00393.x

Tisserant, B., Gianinazzi, V., Gianinazzi, S., Gollotte, A. (1993). In planta histochemical staining of fungal alkaline phosphatase activity for analysis of efficient arbuscular mycorrhizal infections. *Mycological Research* 97: 245-250.

Tisserant, E., Malbreil, M., Kuo, A., Martin F. (2013). Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 20117–20122

Toljander, J., Artursson, V., Paul, L., Jansson, J., Finlay, R. (2006). Attachment of different soil bacteria to arbuscular mycorrhizal fungal extraradical hyphae is determined by hyphal vitality and fungal species. *FEMS Microbiol Lett.* 254 34–40.

Toljander, J., Lindahl, B., Paul, L., Elfstrand, M., Finlay, R. (2007). Influence of arbuscular mycorrhizal mycelial exudates on soil bacterial growth and community structure. *FEMS Microbial Ecology*, 61:295– 304.

Toro, M., Azcon, R., Barea, J. (1997). Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate-solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability (P-32) and nutrient cycling. *Appl Environ Microbiol.* 63(11):4408–12.

Trouvelot, A., Kough, J., Gianinazzi, V. (1986). Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*. Paris: INRA, 217–221.

Ude, S., Arnold, D., Moon, C., Timms, T., Spiers, A. (2006). Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas* isolates. *Environ. Microbiol.* 8:1997–2011

Uribe, D., Sanchez, J., Vanegas, J. (2010). Role of microbial biofertilizers in the development of a sustainable agriculture in the tropics. *Soil biology and agriculture in the tropics. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag*, p. 235–50.

Sohrt, J., Lang, F., Weiler, M. (2017). Quantifying components of the phosphorus cycle in temperate forests. *Wiley Interdiscip Rev Water* 4: e1243

Uzcudun, I. (2004). Biofilms bacterianos. *Instituto de Agrobiotecnología y Recursos Naturales y Departamento de Producción Agraria*. 37:14

Van Aarle, I., Rouhier, H., Saito, M. (2002). Phosphatase activities of arbuscular mycorrhizal intraradical and extraradical mycelium, and their relation to phosphorus availability. *Mycological Research*, 106(10), 1224-1229. doi:10.1017/S0953756202006470

Verstraeten, N., Braeken, K., Debkumari, B., Fauvart, M., Fransaer, J., Vermant, J., Michiels, J. (2008). Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends in Microbiology*, 16 (10), 496-506. doi.org/10.1016/j.tim.2008.07.004.

Vilain, S., Brozel, V. (2006). Multivariate approach to comparing whole-cell proteomes of bacillus cereus indicate a biofilm-specific proteome. *J. Proteome Re.* 5, 1924 - 1930.

Viollet, A., Pivato, B., Mougel, C., Cleyet, J., Gubry, C., Lemanceau, P., Mazurier, S. (2017) Pseudomonas fluorescens C7R12 type III secretion system impacts mycorrhization of Medicago truncatula and associated microbial communities. *Mycorrhiza*. Jan;27(1):23-33. doi: 10.1007/s00572-016-0730-3.

Wang, F., Shi, N., Jiang, R., Zhang, F., Feng, G. (2016). In situ stable isotope probing of phosphate-solubilizing bacteria in the hyphosphere. *J. Exp. Botany* 67, 1689–1701. doi: 10.1093/jxb/erv561

Withers, P., Sylvester, R., Jones, D., Healey, J., Talboys, P. (2014). Feed the crop not the soil: rethinking phosphorus management in the food chain. *Environ. Sci. Technol* doi:http://dx.doi.org/10.1021/es501670j.

Ying, M., Zhang, J., Lu, P., Liang, J., Peng, S. (2009). Evaluation of Biological Characteristics of Bacteria Contributing to Biofilm Formation. *Pedosphere*. Vol. 9, No. 5, 554-561. doi.org/10.1016/S1002-0160(09)60149-1

Zhang, L., Xu, M., Liu, Y., Zhang, F., Hodge, A., Feng, G. (2016). Carbon and phosphorus exchange may enable cooperation between an arbuscular mycorrhizal fungus and a phosphate-solubilizing bacterium. *New Phytologist*. doi: 10.1111/nph.13838

Zhang, L., Zhou, J., George, T., Limpens, E., Feng, G. (2022). Arbuscular mycorrhizal fungi conducting the hyphosphere bacterial orchestra. *Trends in Plant Science*, April 2022, Vol. 27, No. 4.