

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

**CONTROL BIOLÓGICO DE MANCHA BACTERIANA (*Xanthomonas vesicatoria*) Y CÁNCER BACTERIANO (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) EN JITOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)
MEDIADO POR *Pseudomonas* FLUORESCENTES**

MARIA ISABEL RIVERA CONDE

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2015

La presente tesis titulada: Control biológico de mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*) y cáncer bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) en jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) mediado por *Pseudomonas fluorescentes* realizada por la alumna: María Isabel Rivera Conde bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Sergio Aranda Ocampo

DIRECTOR



Dr. Guillermo Carrillo Castañeda

ASESOR



Dra. Graciela Margarita Bueno Aguilar

ASESOR



Dra. Adriana Rosalía Gijón Hernández

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Julio de 2015

**CONTROL BIOLÓGICO DE MANCHA BACTERIANA (*Xanthomonas vesicatoria*)
Y CÁNCER BACTERIANO (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)
EN JITOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) MEDIADO POR *Pseudomonas*
FLUORESCENTES**

María Isabel Rivera Conde, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2015

RESUMEN

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* y *Xanthomonas vesicatoria* son de los patógenos bacterianos de mayor importancia económica del cultivo de jitomate. El objetivo de esta investigación fue identificar cepas de *Pseudomonas* fluorescentes para el control eficiente de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* y *X. vesicatoria*, determinar el sustrato de cultivo más adecuado para la óptima expresión de antagonismo *in vitro*, así como su efecto promotor del crecimiento en la germinación de semillas y vigor en plántulas de jitomate. Se evaluaron 152 aislamientos bacterianos fluorescentes obtenidos de diferentes nichos ecológicos para determinar su capacidad para inhibir el crecimiento de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* y/o *X. vesicatoria*. De ensayos de confrontación dual en medios de cultivo: B de King, Agar Nutritivo y Waksman Agar, se seleccionaron 20 aislamientos bacterianos fluorescentes con el mayor grado de antagonismo contra una o ambas bacterias fitopatógenas. El sustrato de cultivo más eficiente para la óptima expresión del antagonismo fue el medio Waksman Agar. La secuenciación parcial del gen 16S rRNA con los iniciadores FD1 y RD1 identificó los aislamientos bacterianos como *Pseudomonas* sp. (65%), *P. putida* (25%) y *P. fluorescens* (10%). La caracterización en la producción de metabolitos potencialmente involucrados en la actividad antagónica, mostró que el 100% de las cepas antagonistas producen sideróforos. La inoculación de semillas de jitomate con las *Pseudomonas* fluorescentes, indicó que el 95% de las cepas aumentaron la velocidad de germinación (T_{50}) e incrementaron la producción de la biomasa seca de las raíces de las plántulas, probablemente porque el 65% de ellas produjo ácido indol acético.

Palabras clave: *Pseudomonas* fluorescentes, biocontrol, *Xanthomonas vesicatoria*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Solanum lycopersicum*.

BIOLOGICAL CONTROL OF BACTERIAL SPOT (*Xanthomonas vesicatoria*) AND BACTERIAL CANKER (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) ON TOMATO (*Solanum lycopersicum* L.) MEDIATED BY FLUORESCENT *Pseudomonas*

María Isabel Rivera Conde, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015

ABSTRACT

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* and *Xanthomonas vesicatoria* are among bacterial pathogens of major economic importance in tomato crops. The objectives of this research were to identify efficient fluorescent *Pseudomonas* strains to control *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* and *X. vesicatoria*, determine the most suitable culture substrate for optimal expression of *in vitro* antagonism as well as their effect as growth promoters in seed germination and vigor of tomato seedlings. A total of 152 fluorescent bacterial isolates obtained from different ecological niches were evaluated to determine their ability to inhibit growth of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* and *X. vesicatoria*. Qualitative tests of dual confrontation in different culture media (King's B medium, Nutrient Agar and Waksman Agar) resulted in the selection of 20 fluorescent bacterial isolates with the highest degree of antagonism against one or both plant pathogenic bacteria; the most efficient culture substrate for the optimal expression of *in vitro* antagonism was the Waksman agar medium. Partial sequencing of 16S rRNA gene with primers FD1 and RD1, identified bacterial isolates as *Pseudomonas* sp. (65%), *Pseudomonas putida* (25%) and *Pseudomonas fluorescens* (10%). The characterization in the production of metabolites potentially involved in antagonistic activity showed that 100% of antagonistic strains produced siderophores. Inoculation of fluorescent *Pseudomonas* on tomato seeds indicated that 95% of the strains increased the germination speed (T_{50}) and increased the production of dry biomass in seedling's roots, potentially due to the production of indole acetic acid in 65% of the strains.

Key words: Fluorescent *Pseudomonas*, biocontrol, *Xanthomonas vesicatoria*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Solanum lycopersicum*.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Colegio de Postgraduados, por las facilidades brindadas y por el financiamiento de mis estudios de maestría.

Al Dr. Sergio Aranda Ocampo, por el apoyo y sugerencias brindados durante la realización de esta investigación.

Al Dr. Guillermo Carrillo Castañeda, por la dirección de esta investigación, el apoyo y paciencia que ha tenido durante la realización de la misma.

A la Dra. Adriana R. Gijón Hernández, por su amistad, apoyo y consejos durante la realización de esta investigación.

A la Dra. Graciela M. Bueno Aguilar, por el apoyo, disponibilidad y paciencia durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

A Don Carlos, por su apoyo para la realización de este trabajo, sus consejos y amistad durante mi estancia en esta institución.

A la Sra. Alejandra y Don Roberto por su apoyo durante la realización de la tesis.

A Paty, Velén, Yuri, Isaura, Isaac, Ale, Are, Erika, Susy, Rebeca, Beatriz, Pati y Eduardo por todo el apoyo brindado durante este ciclo, por todo lo que he aprendido con ellos y sobre todo por su amistad.

A todas aquellas personas que de una u otra forma me han ayudado en la formación tanto personal como académica.

DEDICATORIA

A mi familia, especialmente a mi madre por todo su apoyo, confianza y por enseñarme la fortaleza de una gran mujer.

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
1.- INTRODUCCION	1
1.1 Enfermedades del jitomate	2
1.2 Importancia de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Smith) Davis, Gillaspies, Vidaver & Harris	2
1.3 Importancia de <i>Xanthomonas vesicatoria</i> (ex Doidge) Vauterin <i>et al.</i>	4
1.4 Importancia de <i>Pseudomonas fluorescences</i>	5
1.5 Identificación de bacterias mediante PCR.....	7
2.- OBJETIVOS.....	9
2.1 Objetivo general.....	9
2.2 Objetivos específicos	9
3.- HIPÓTESIS.....	9
4.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
4.1 Material biológico	10
4.2 Aislamiento de <i>Pseudomonas fluorescences</i> de la rizósfera de jitomate	10
4.3 <i>Pseudomonas fluorescences</i> de la micósfera de <i>Claviceps gigantea</i> y rizósfera de jamaica	11
4.4 Antagonismo <i>in vitro</i> en medio B de King de cepas bacterianas fluorescentes contra <i>Xanthomonas vesicatoria</i> y <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	11
4.5 Antagonismo <i>in vitro</i> en medio Agar Nutritivo, B de King y Waksman agar de cepas fluorescentes contra <i>Xanthomonas vesicatoria</i> y <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	12
4.6 Detección de sideróforos	13
4.7 Prueba de germinación	13
4.8 Vigor de las plántulas.....	15
4.9 Producción de ácido indol acético	15

4.10 Caracterización molecular.....	16
4.11 Preservación de las cepas bacterianas.....	17
5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
5.1 Aislamiento de cepas bacterianas de la rizósfera de jitomate	18
5.1.1 Evaluación de antagonismo <i>in vitro</i>	19
5.2 Antagonismo <i>in vitro</i> en medio B de King de aislamientos bacterianos fluorescentes y no fluorescentes contra <i>Xanthomonas vesicatoria</i> y <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	19
5.3 Antagonismo <i>in vitro</i> en medio Agar Nutritivo, B de King y Waksman agar de cepas fluorescentes contra <i>Xanthomonas vesicatoria</i> y <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	21
5.3.1 Resultados del antagonismo <i>in vitro</i> de cepas fluorescentes contra <i>Xanthomonas vesicatoria</i>	21
5.3.2 Resultados del antagonismo <i>in vitro</i> de cepas fluorescentes contra <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	23
5.4 Antagonismo <i>in vitro</i> en medio Agar Nutritivo, B de King y Waksman agar de cepas no fluorescentes contra <i>Xanthomonas vesicatoria</i> y <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	24
5.4.1 Resultados del antagonismo <i>in vitro</i> de cepas no fluorescentes contra <i>Xanthomonas vesicatoria</i>	24
5.4.2 Resultados del antagonismo <i>in vitro</i> de cepas no fluorescentes contra <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	25
5.5 Detección de sideróforos	28
5.6 Pruebas de germinación de las semillas	30
5.7 Vigor de las plántulas.....	32
5.8 Producción de ácido indol acético.....	33
5.9 Caracterización molecular.....	34
6.- CONCLUSIONES	38
7.- LITERATURA CITADA.....	39

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Resultados para el cierre de producción de jitomate (SIAP, 2013).	1
Cuadro 2. Datos de germinación (%) y T_{50} en comparación con el testigo. *** indican las comparaciones importantes del nivel 0.05	31
Cuadro 3. Comparación de medias del peso de biomasa seca comparadas con el testigo. Las comparaciones importantes del nivel 0.05 están indicadas por ***	33
Cuadro 4. Identificación de las cepas mediante el gen 16S rRNA.....	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Microplaca de 96 pocillos con medio líquido B de King inoculado con bacterias	12
Figura 2. Inoculador multipunto de 96 puntas sobre el medio de cultivo B de King previamente inoculado con las bacterias fitopatógenas.	12
Figura 3. Aislamiento de colonias bacterianas fluorescentes	19
Figura 4. Aspecto del crecimiento bacteriano de cepas fluorescentes en medio BK a las 48 h.	19
Figura 5. Halos de inhibición en medio B de King, a las 72 h de incubación. a) contra <i>Xv</i> , b) contra <i>Cmm</i>	20
Figura 6. Aspecto de los tipos de halo de inhibición (A, B y C) en medio B de King a las 48 h de incubación a 28±2°C.	20
Figura 7. Medición de la banda de inhibición	20
Figura 8. Comparación del tamaño de halo obtenido en AN y W contra <i>Xv</i> respecto al obtenido en BK (100%)	22
Figura 9. Comparación del tamaño de halo obtenido en AN y W contra <i>Cmm</i> respecto al obtenido en BK (100%).	23
Figura 10. Halos de inhibición en medio W a las 48 h de incubación a) contra <i>Xv</i> , b) contra <i>Cmm</i>	24
Figura 11. Comparación del tamaño de halo obtenido en AN y W contra <i>Xv</i> respecto al obtenido en BK (100%).	25
Figura 12. Comparación del tamaño de halo obtenido en AN y W respecto al obtenido en BK (100%)......	25
Figura 13. Producción de sideróforos en medio CAS a las 72 h de incubación.	29
Figura 14. Relación de generación de halos en el medio Waksman y la producción de sideróforos en el medio CAS.....	30
Figura 15. Vigor de las plántulas comparadas con el testigo: a) testigo, b) 14.1 JiF, c) 66 JaF, d) 64 JaF, e) 122 JaF, f) 79 JaF, g) Ccl	32

Figura 16. Coloración roja (++) mayor producción de ácido indol acético. Coloración rosa (+) menor producción de ácido indol acético. Pocillos incoloros (-) producción de ácido indol acético negativa.34

Figura 17. Gel de electroforesis al 1%, cepas purificadas35

1.- INTRODUCCION

El jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) es uno de los vegetales más populares y ampliamente consumidos en todo el mundo, pertenece a la familia de las solanáceas, es originaria de la región andina de Sur América (Perú, Ecuador, Bolivia y Chile) y domesticada en Centro América (México). Es la especie hortícola más cultivada tanto a cielo abierto como en la agricultura protegida, se considera como uno de los cultivos más rentables y con un alto potencial de rendimiento y consumo per cápita. Este cultivo es muy importante no sólo por su consumo, sino que además ha sido ampliamente utilizado como material de investigación en diversas áreas; Peralta y Spooner (2005), mencionan que el clado *Lycopersicon* además de contener al jitomate domesticado, incluye 12 variedades silvestres, las cuales son importantes para mejorar algunas características del cultivo así como útil en estudios evolutivos. Actualmente se cultivan cientos de variedades de este cultivo alrededor del mundo, existen variedades de crecimiento determinado y otras de crecimiento indeterminado, las más conocidas son saladette, bola y cherry. En México se produce durante todo el año, se considera el principal producto hortícola de exportación tanto en fruto fresco como por sus derivados y constituye el sostén principal de la estructura productiva y comercial de este sector. Los principales productores de jitomate en el mundo son China, India y Estados Unidos. México ocupa el décimo lugar (FAO, 2013) y exporta alrededor de 1.5 millones de toneladas anuales de jitomate fresco principalmente hacia Estados Unidos, siendo uno de los principales países exportadores (Muñoz *et al.*, 1995; Kimura y Sinha, 2008; SAGARPA, 2010; ICAMEX, 2011; Ercolano *et al.*, 2012; Financiera Rural, 2014; EnsemblPlants, 2015).

La producción de esta hortaliza en México para el año 2013 se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Resultados para el cierre de producción de jitomate (SIAP, 2013).

Sup. Sembrada (Ha)	Sup. Cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	PMR (\$/Ton)	Valor Producción (Miles de Pesos)
48,234.01	47,099.36	2,694,358.19	57.21	5,584.08	15,045,508.72

A nivel nacional, los principales estados productores son Sinaloa, cuya producción representó el 36% del total nacional, seguido por Baja California con 7%, mientras que Zacatecas, San Luis Potosí y Jalisco representaron el 5% respectivamente (SIAP, 2013); sin embargo, la producción de jitomate se distribuye regionalmente a todo lo largo del territorio nacional (SAGARPA, 2010).

1.1 Enfermedades del jitomate

El cultivo de jitomate presenta diversas limitantes fitosanitarias, tanto en los sistemas de producción de agricultura abierta como protegida, que impactan en el rendimiento de cultivo; entre estas se encuentran patógenos como: hongos, bacterias, virus, viroides, fitoplasmas, nematodos e insectos. Entre las enfermedades bacterianas destacan el cáncer bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*), marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*), mancha negra del tomate (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*), entre otras, causando pérdidas económicas considerables (Blancard, 1990; Jones *et al.*, 1991; Productores de hortalizas, 2006; Ramírez *et al.*, 2009).

1.2 Importancia de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis, Gillaspies, Vidaver & Harris

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (*Cmm*), es el agente causal de la marchitez bacteriana y cancro del jitomate, aunque también puede infectar otras solanáceas; tiene una amplia distribución alrededor del mundo en todas las áreas donde se cultiva el jitomate. En México se ha citado presente en diversos sistemas de producción en los Estados de Sinaloa, Jalisco, San Luis Potosí, Baja California Sur, Baja California Norte, Sonora, Zacatecas, Querétaro, Michoacán, Morelos, Hidalgo, Guanajuato y Estado de México (Holguín *et al.*, 2006; Tlapal, 2008; Borboa *et al.*, 2009; Ramírez *et al.*, 2009). Se considera una de las enfermedades bacterianas más importantes de este cultivo debido a las pérdidas económicas que causa, y a que la planta es susceptible en cualquier etapa de su desarrollo; sin

embargo, se ha observado que las plántulas son las más susceptibles. Los síntomas que se manifiestan en este estado fenológico (plántula) son marchitez y muerte rápida después del trasplante, aunque si llegan a desarrollarse, estas son regularmente plantas raquílicas con bajo rendimiento y frutos pequeños, que pueden caer o madurar desigualmente; en estas pocas veces pueden aparecer las manchas en el fruto conocidas como “ojo de pájaro”, síntoma que es comúnmente asociado a esta enfermedad y que en una etapa avanzada pueden aparecer canchales en los tallos (Strider, 1969 citado por Vansteekelenburg, 1985 y Hadas *et al.*, 2005; CABI-EPPO, 1997; Hausbeck *et al.*, 2000; Jacques *et al.*, 2012; CABI, 2015). Epidemias causadas por *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* pueden ocasionar pérdidas en rendimiento entre el 50% al 100%. Las semillas infectadas son consideradas la fuente de inóculo primario y principal forma de diseminación a grandes distancias, la transmisión por esta vía varía de 0,25% a 81%; también puede propagarse por lluvia, riego por aspersión y especialmente por heridas producidas con las labores culturales como la poda. La bacteria sobrevive durante mucho tiempo en restos de plantas, herramientas y equipos de suelo y en las estructuras del invernadero (Strider, 1969 citado por Tsiantos, 1987; Thyr, 1969 citado por Hadas *et al.*, 2005; Blancard, 1990, CABI-EPPO, 1997; EPPO-2005; Jacques *et al.*, 2012; EFSA, 2014). Las estrategias de manejo y control están enfocadas fundamentalmente en medidas preventivas, como el uso de semillas de jitomate certificadas libres del patógeno, realizar prácticas culturales como erradicar las plantas enfermas en el cultivo. En el contexto de control químico, se han utilizado en la mayoría de los casos productos a base de cobre; sin embargo, resultados en diversos estudios, muestran que estos solo funcionan como preventivos. Asimismo, no se han desarrollado estrategias efectivas de control biológico, aunado a la falta de variedades completamente resistentes. Por lo anterior, este patógeno se encuentra en la lista de cuarentena A2 de la EPPO y en la lista de plagas reglamentadas en México y en otros países (Gleason *et al.*, 1993; Hausbeck *et al.*, 2000; EPPO, 2005; Eichenlaub y Gartemann, 2011; Jacques *et al.*, 2012; SENASICA-SAGARPA, 2013; EFSA, 2014).

1.3 Importancia de *Xanthomonas vesicatoria* (ex Doidge) Vauterin *et al.*

Xanthomonas vesicatoria (Xv) es un miembro del complejo de especies asociadas con la enfermedad conocida como “mancha bacteriana del tomate y chile”. Actualmente se reconocen cuatro especies como agentes causantes de dicha enfermedad: *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans* y *X. gardneri* (Jones *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2013; Beran *et al.*, 2013). La mancha bacteriana es una enfermedad que se encuentra en todas las zonas donde se produce jitomate y chile alrededor del mundo; especialmente en zonas de clima templado y tropical. En México, se tienen reportes de esta enfermedad en los Estados de Sinaloa y Sonora (Bouzar *et al.*, 1996; Carrillo-Fasio *et al.*, 2001), infectando principalmente frutos, tallos y follaje; en las hojas causa manchas irregulares acuosas tornándose de verde a marrón y cuando estas coalescen son rodeadas por halos cloróticos que puede verse como un tizón; el tallo y peciolos se necrosan y pueden observarse fracturas tipo cáncer. En el fruto, las lesiones son de color marrón corchosas, similares a una costra, rodeada por un halo acuoso que en conjunto causa pérdidas considerables en productividad y calidad del fruto y consecuentemente graves pérdidas económicas (Jones *et al.*, 1991; Ritchie, 2000; CABI-EPPO, 2013; EPPO, 2013); Sharma *et al.*, 2011; Quezado-Soares *et al.*, 1998 citado por Nascimento *et al.*, 2013 y EFSA, 2014 indican que la enfermedad puede causar pérdidas entre el 30% y 52% en la producción de jitomate. La enfermedad se transmite principalmente por semilla sobre todo a grandes distancias; en ellas puede sobrevivir por mucho tiempo incluso años, las plántulas también son consideradas fuentes de infección, puede multiplicarse epifíticamente en plantas jóvenes asintomáticas y permanecer en restos vegetales. En el suelo también puede permanecer pero por menos tiempo; la dispersión secundaria es por salpicaduras de la lluvia, el agua de riego y por las prácticas de cultivo como la poda (Blancard, 1990; Ritchie, 2000; CABI-EPPO, 2013; EFSA, 2014). Conover y Gerhold (1981), indican que es probablemente el patógeno más difícil de controlar de todas las enfermedades que afectan al jitomate; ya que al establecerse la enfermedad, si las condiciones ambientales son favorables para el desarrollo y la propagación del patógeno, las estrategias de manejo sólo son

parcialmente eficaces. Por lo anterior, el control se basa principalmente en la prevención y exclusión principalmente por el uso de semillas y trasplantes sanos, rotación de cultivos, eliminación de residuos vegetales infectados; se han utilizado productos a base de cobre con resultados favorables al disminuir la incidencia y severidad de la enfermedad, así como estrategias basadas en el uso de agentes microbianos de biocontrol y biofertilización; sin embargo, el número de agentes biológicos disponibles comercialmente para el control de enfermedades bacterianas aún es limitado. Hasta la fecha existen pocas variedades resistentes que protejan contra todas las razas de este complejo de especies; también se menciona que el uso del activador de las plantas acibenzolar-S-methyl (ASM) combinado con un bacteriófago es efectivo contra este patógeno, proporcionando un mejor control de la enfermedad. La enfermedad “mancha bacteriana del tomate y chile” se encuentra en la lista de plagas de importancia cuarentenaria A2 de la EPPO y la lista de plagas reglamentadas en México (Wilson, 2002; Al-Dahmani *et al.*, 2003; Obradovic *et al.*, 2004; El-Hendawy *et al.*, 2005; Byrne *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2011; SENASICA-SAGARPA, 2013; CABI-EPPO, 2013; EFSA, 2014).

1.4 Importancia de *Pseudomonas fluorescentes*

El género *Pseudomonas* pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, son Gram negativas, la célula es de forma bacilar con uno o más flagelos polares, no forman esporas, generalmente viven en condiciones aeróbicas y puede utilizar casi cualquier fuente de carbono, las especies fluorescentes se caracterizan por la producción de pigmentos fluorescentes visibles bajo luz ultravioleta (UV). Es uno de los géneros más diversos, cosmopolitas y las especies de este grupo han sido aisladas de todo tipo de ambientes ecológicos, por ejemplo de diversos nichos ecológicos en plantas y particularmente de la rizósfera, hongos, suelo, entre otros. (Peix *et al.*, 2009; Palleroni, 2010).

Cada vez es más frecuente el estudio del metabolismo de microorganismos con potencial como agentes de biocontrol de enfermedades y/o promotores de

crecimiento que colonizan el suelo, rizósfera, endósfera y otros nichos ecológicos en las plantas. Lo anterior ante la necesidad de buscar y generar alternativas de manejo que permitan disminuir el uso de plaguicidas químicos (Kang *et al.*, 1998; Pal and McSpadden Gardener, 2006). Diversas investigaciones han abordado el estudio de poblaciones de *Pseudomonas* fluorescentes como un componente importante entre las poblaciones microbianas con potencial para su uso como agentes de biocontrol y/o promotores del crecimiento (Kloepper y Schroth 1978; Ganeshan y Kumar, 2006; Höfte y Altier, 2010; Uribe *et al.*, 2012) y en las cuales se ha destacado que estas poblaciones incluyen cepas de interés para estos propósitos. Dentro del grupo de *Pseudomonas* fluorescentes se encuentran agentes de control biológico muy eficaces que pueden promover el crecimiento de las plantas, conocidos como bacterias promotoras de crecimiento en plantas (PGPB: Plant growth-promoting bacteria o PGPR: Plant growth-promoting rhizobacteria, por sus siglas en inglés) incluso algunas pueden aumentar el rendimiento de algunos cultivos; y mejorar la salud de las plantas al reducir la severidad de diversas enfermedades. Entre las poblaciones más ampliamente estudiadas se encuentran *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas chlororaphis* (*Pseudomonas aureofaciens*) (Burr *et al.*, 1978, Schroth and Hancock 1982 citados por Weller, 1988), aunque Janisiewicz y Marchi (1992) y Audenaert *et al.* (2002) reportan algunos aislados de *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas syringae* como agentes de control. Dentro de los mecanismos que expresan las poblaciones de *Pseudomonas* fluorescentes para el biocontrol de patógenos de plantas, está la producción de antibióticos, sideróforos, bacteriocinas, enzimas líticas, además de alta capacidad de competencia por espacio y nutrientes, entre otros (Chet *et al.*, 1990; Peixoto, 1997; Pérez, 2004; Pal y McSpadden Gardener, 2006; De-Bashan *et al.*, 2007; Lanna *et al.*, 2010); resaltando la ventaja de que la actividad de estos agentes de biocontrol no está limitada a un solo mecanismo de antagonismo, sino que puede utilizar una combinación de la expresión de varios de estos. La mayoría de los estudios destacan la oportunidad del uso de estas poblaciones como agentes de biocontrol y/o biofertilizantes como estrategia para su integración en sistemas de manejo de las enfermedades en diversos cultivos agrícolas. Uno de los mecanismos de

antagonismo más ampliamente estudiados en poblaciones de *Pseudomonas* fluorescentes, es la producción de metabolitos secundarios involucrados en la adquisición y absorción de nutrientes, virulencia y defensa contra competidores y depredadores que se encuentren en su hábitat natural (Bashan y Holguin, 1998; De-Bashan *et al.*, 2007; Gross y Loper, 2009; Kapoor *et al.*, 2012; Bouizgarne, 2013; Ahemad y Kibret, 2014). La mayoría del conocimiento sobre lo anterior, se basa en estudios con *Pseudomonas* fluorescentes por su capacidad de adaptación a la rizósfera y producir una amplia variedad de metabolitos secundarios que incluyen antibióticos y sideróforos, como las pyoverdinas las cuales hacen disponible la adquisición de iones de Fe del medio ambiente y son exclusivas de *Pseudomonas* spp (Raaijmakers *et al.*, 2002; Weller *et al.*, 2002; De Souza *et al.*, 2003; Pérez, 2004; Gross y Loper, 2009). Además, son de gran interés los mecanismos involucrados en la promoción del crecimiento de las plantas como son: producción de fitohormonas (auxinas, citoquininas y giberelinas), solubilización de fosforo, fijación de nitrógeno y desnitrificación, entre otras (Spaepen *et al.*, 2007; Nadeem *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2002; Pradhan and Sukla, 2005; Glick, 2012; Correa *et al.*, 2004. Citados por Iqbal y Hasnain, 2013) y mediante la síntesis de ácido indol acético (AIA) la cual es la principal característica de estas bacterias que estimulan el crecimiento de las plantas y que induce la formación de pelos radiculares y raíces laterales, así como la estimulación en la germinación de las semillas y tubérculos (Pallai *et al.*, 2012; Glick, 2012; Kapoor *et al.*, 2012; Mohite, 2013; Reetha *et al.*, 2014). Más aún Khalid *et al.* (2004), demostraron que la caracterización de estas poblaciones fluorescentes en la biosíntesis de auxinas, puede constituirse como una excelente herramienta para la selección de cepas como PGPR.

1.5 Identificación de bacterias mediante PCR

En la actualidad, la comparación de la secuencia del gen 16S rRNA se ha convertido en una técnica muy útil en la identificación de microorganismos procariontes (Srinivasa *et al.*, 2012; Matsumoto y Sugano, 2013). El gen 16S rRNA es la macromolécula más utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas y, es codificado por el 16S

rDNA. La secuenciación del 16S rDNA constituye un método rápido y eficaz de identificación bacteriana (Rodicio y Mendoza 2004). La secuenciación de este gen ha servido como una herramienta importante para determinar la relación filogenética entre las bacterias debido a que es conservada en todas las especies, y actualmente existen amplias bases de datos (Weisburg *et al.*, 1991; Patel, 2001; Rodicio y Mendoza, 2004).

La importancia e impacto que tienen las enfermedades causadas por *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* y *X. vesicatoria* en los diferentes sistemas de producción de tomate y chile; la poca disponibilidad de ingredientes activos en el mercado como bactericidas para su control, resalta la necesidad de generar estrategias alternativas para el óptimo manejo de estas enfermedades. Una de estas estrategias puede ser el uso de agentes microbianos de biocontrol y/o promotores de crecimiento; dentro de este contexto, las poblaciones de *Pseudomonas* fluorescentes se han considerado excelentes candidatos para su uso como agentes de control biológico en diversos sistemas de producción. Por lo anterior, la presente tesis de investigación se enfocó en la identificación de cepas de *Pseudomonas* fluorescentes antagonistas a *X. vesicatoria* y *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* y su efecto en la germinación de semillas de tomate.

2.- OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- Identificar cepas de *Pseudomonas* fluorescentes para el control eficiente de *Xanthomonas vesicatoria* y/o *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en jitomate (*Solanum lycopersicum* L.)

2.2 Objetivos específicos

- Evaluar el potencial antagonista *in vitro* de *Pseudomonas* fluorescentes contra *X. vesicatoria* y *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*.
- Determinar el sustrato de cultivo más adecuado para la óptima expresión de antagonismo *in vitro* de cepas de *Pseudomonas* fluorescentes contra *X. vesicatoria* y *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*.
- Determinar el efecto de las cepas de *Pseudomonas* fluorescentes antagonistas en la germinación de las semillas de jitomate.
- Identificar mediante la secuenciación del gen 16S rRNA las cepas bacterianas con mayor actividad antagonista contra *X. vesicatoria* y *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*.

3.- HIPÓTESIS

Pseudomonas fluorescentes de diferente origen ecológico, expresan diferentes niveles de antagonismo *in vitro* contra *X. vesicatoria* y *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* y actúan como promotores de crecimiento en la germinación de semillas de tomate.

4.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material biológico

Se utilizó una colección de 282 cepas de *Pseudomonas* fluorescentes aislados de diferente origen ecológico: 272 cepas aisladas de la rizósfera de plantas de jamaica (1 Ja - 272 Ja) y 10 de la micósfera del patógeno de maíz *Claviceps gigantea* (A - J). Una cepa previamente identificada de *Xanthomonas vesicatoria* (ex Doidge) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings y una cepa de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis, Gillaspies, Vidaver & Harris, del laboratorio de bacteriología del Instituto de Fitosanidad, Colegio de postgraduados y raíces de plantas de jitomate colectadas en el poblado de Tlacotepec, Morelos, donde se han presentado síntomas causados por *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*.

4.2 Aislamiento de *Pseudomonas* fluorescentes de la rizósfera de jitomate

Se aislaron poblaciones de *Pseudomonas* fluorescentes a partir de la rizósfera de jitomate var. Cid. Las plantas se colectaron en un invernadero en etapa de producción plantadas directamente en el suelo; se colectaron las raíces de 6 plantas sanas seleccionadas al azar; de cada muestra de raíces se cortaron y pesaron 1g, se colocaron en 10 mL de agua destilada estéril, se mantuvieron en agitación 10 min y se realizaron diluciones en serie (10^{-5}). A partir de las diluciones 10^{-3} a 10^{-5} , se inocularon 100 μ L de la suspensión en placas Petri con medio B de King (g L^{-1}): Polipeptona 20.0, K_2HPO_4 1.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5, glicerol 15.0 ml, agar 15.0 (Schaad *et al.*, 2001), y se distribuyó sobre la superficie del medio con una varilla de vidrio estéril e incubadas a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 72 h. Las poblaciones de *Pseudomonas* fluorescentes se obtuvieron mediante la determinación de fluorescencia con una lámpara de luz UV (268nm) cada 24 h (Figura 3); las colonias bacterianas fluorescentes se separaron y preservaron en tubos de ensaye con medio B de King inclinado.

4.3 *Pseudomonas* fluorescentes de la micósfera de *Claviceps gigantea* y rizósfera de jamaica

La colección de cepas fluorescentes obtenidas a partir de la micósfera de *Claviceps gigantea* y la rizósfera de jamaica se estriaron en medio B de King, posteriormente se incubaron a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 72 h, y cada 24 h se observaron bajo una lámpara de luz UV (268nm), para verificar la producción de pigmento fluorescente.

4.4 Antagonismo *in vitro* en medio B de King de cepas bacterianas fluorescentes contra *Xanthomonas vesicatoria* y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Se evaluaron 356 cepas en total para el antagonismo *in vitro* contra *X. vesicatoria* y *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Se realizó una selección inicial de estas cepas con la finalidad de identificar los aislamientos bacterianos capaces de inhibir *in vitro* el desarrollo de *X. vesicatoria* y/o *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, así como determinar el tiempo óptimo requerido para observar los halos de inhibición. Para lo anterior, las cepas fluorescentes se inocularon en microplacas de 96 pocillos con 200 μL de medio líquido B de King; posteriormente se incubaron a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 h (Figura 1). Para la confrontación *in vitro* se preparó una suspensión acuosa con *X. vesicatoria* y *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* a una densidad de 3×10^8 UFC mL^{-1} ; 500 μL de cada suspensión se inocularon y distribuyeron con una varilla de vidrio estéril en una placa Petri cuadrada (12 cm X 12 cm) con medio de cultivo B de King manteniendo durante 1 h a temperatura ambiente hasta la completa absorción en el medio de la suspensión acuosa inoculada. El potencial de antagonismo de las bacterias fluorescentes se determinó por la inoculación simultánea de estas mediante un inoculador multipunto "BOEKEL" de 96 puntas; el multipunto se colocó durante 10 segundos en la microplaca de 96 pocillos con el medio B de King previamente inoculado con las bacterias aisladas y posteriormente se colocó durante 10 segundos sobre la placa Petri inoculada con el patógeno (Figura 2); la placa se incubó a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 120 h. El antagonismo *in vitro* se

determinó mediante la observación de halos de inhibición realizando observaciones cada 24 h.

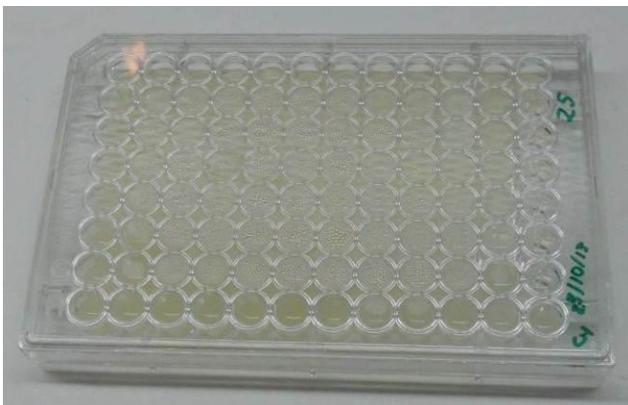


Figura 1. Microplaca de 96 pocillos con medio líquido B de King inoculado con bacterias

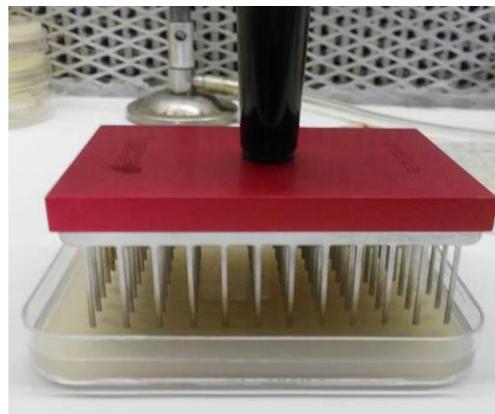


Figura 2. Inoculador multipunto de 96 puntas sobre el medio de cultivo B de King previamente inoculado con las bacterias fitopatógenas.

4.5 Antagonismo *in vitro* en medio Agar Nutritivo, B de King y Waksman agar de cepas fluorescentes contra *Xanthomonas vesicatoria* y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Con la finalidad de evaluar y determinar las diferencias y el efecto del sustrato de cultivo para la óptima expresión de antagonismo *in vitro* de las cepas bacterianas fluorescentes; con los aislamientos bacterianos que produjeron halo de inhibición *in vitro* en medio B de King a partir de la selección inicial, se realizaron pruebas de confrontación dual *in vitro* en los medios B de King (BK), Agar Nutritivo (AN): 23 g L⁻¹ de agua destilada (Instrucciones del fabricante) y Waksman agar (W) (g L⁻¹): Polipeptona 5.0, glucosa 10, extracto de carne 3.0, NaCl 5.0, agar 20, pH 6.8 (Berg, 1996 citado por Berg *et al.*, 2002). Se utilizó el protocolo anteriormente descrito con las siguientes modificaciones: Las placas Petri cuadradas (12 cm X 12 cm) se dividieron en 25 cuadrantes iguales, y se inocularon con 500 µL (para *X. vesicatoria*) y 600 µL (para *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*) de la suspensión del patógeno bacteriano; posteriormente, se colocó por punción una gota de una suspensión con 48 h de incubación en medio BK de las cepas fluorescentes

antagonistas a evaluar en el centro de cada cuadrante, se incubó a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 72 h. Para los resultados de antagonismo, se establecieron rangos de acuerdo al ancho del halo de inhibición (Figura 8): 0 (-), 0.1- 2mm (+), 2.1 - 4mm (++) , 4.1 - 6mm (+++), 6.1 - 8mm (++++), > 8.1mm (+++++).

4.6 Detección de sideróforos

Los aislamientos fluorescentes antagonistas contra *X. vesicatoria* y/o *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, se evaluaron para la producción de sideróforos en el medio universal CAS agar descrito por Schwyn y Neilands (1987). Los aislamientos bacterianos se colocaron por punción en una placa Petri cuadrada (12 cm X 12 cm) con medio CAS, a una distancia de 2.3 cm y se incubó a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 120 h, se realizaron observaciones cada 24 h; se midió el ancho del anillo que cambió de color el medio de azul a rojo-amarillo, lo que indica la producción de sideróforos.

4.7 Prueba de germinación

El bio-priming consiste en el recubrimiento de semillas con un agente bacteriano de biocontrol; por ejemplo, *Pseudomonas* spp, junto con un proceso de hidratación antes de la siembra. Este tratamiento a las semillas junto con un agente de cubierta puede servir como un medio importante para el manejo de muchas enfermedades del suelo y transmitidas por semillas (Callan *et al.*, 1990; Rao *et al.*, 2009).

Se evaluaron 33 aislamientos que mostraron antagonismo *in vitro* contra uno o ambos patógenos bacterianos, los cuales formaron un halo de inhibición *in vitro* $\geq 5\text{mm}$; la prueba de germinación de semilla de jitomate se realizó mediante el método descrito por Artola *et al.* (2003) con algunas modificaciones. Inicialmente, se realizó la imbibición de las semillas de jitomate en agua con la finalidad de mejorar la velocidad y uniformidad de germinación, así como mejorar el vigor de las plántulas (Corbineau y Come, 2006); para lo anterior, se utilizaron semillas de jitomate tipo

Saladette variedad Rio Grande de la casa Caloro, con un 85% de germinación (se realizó una prueba de germinación previa con 3 repeticiones con 100 semillas cada una). Para el experimento, se utilizaron lotes de 33 semillas colocándolas dentro de una malla cerrada con ligas (3 repeticiones por cada cepa bacteriana antagonista), cada lote se colocó dentro de un frasco con 1 L de agua destilada, la cual fue aireada con una bomba de pecera por un período de 24 h; las semillas se distribuyeron en placas Petri de plástico de 60mm de diámetro y se eliminó el agua de la superficie de las mismas mediante aireación con 2 ventiladores por un período de 3 h en condiciones de laboratorio; posteriormente, las semillas se cubrieron durante 2 h con 0.4 mL de una suspensión bacteriana ajustada a una densidad celular de 3×10^8 ufc mL⁻¹, (absorbancia de 0.9 en un espectrofotómetro COLEMAN JUNIOR® II 620, a una longitud de onda de 660 nm); después, cada repetición se colocó en cajas Petri de plástico de 90mm de diámetro con papel filtro estéril y se agregaron 3.5 mL de agua destilada y se colocaron en una cámara de germinación a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 12 días (ISTA, 1996 citado por Karrfalt, 2008; ISU, 2015). Se realizaron recuentos diarios de semillas germinadas con radículas ≥ 1 mm. La germinación total se expresó en porcentaje, considerando como 100% el número de semillas por caja; el porcentaje de germinación total se determinó a los 12 días. Con los resultados obtenidos por cada cepa utilizada, se determinó el tiempo (h) en que germinó el 50% de las semillas (T_{50}), el cual se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación (Genmedoc, 2006; Salehzade *et al.*, 2009):

$$T_{50} = t_i + [(N/2 - n_i)(t_j - t_i)] / (n_j - n_i)$$

Donde:

N= número final de germinación

n_j, n_i = número acumulado de semillas germinadas por conteo adyacente al momento en que $n_i < N/2 < n_j$

t_i = número de días que corresponden a n_i

t_j = número de días que corresponden a n_j

Para analizar los datos de germinación se realizó un análisis de varianza de acuerdo al procedimiento ANOVA de SAS. Las diferencias entre las medias de los tratamientos se estimaron utilizando la prueba de Dunnet para comparar cada tratamiento con el control (Narbona *et al.*, 2003).

4.8 Vigor de las plántulas

Para evaluar el vigor, se seleccionaron y utilizaron los primeros 20 tratamientos en germinar; para lo anterior, se tomaron 20 semillas germinadas por cada repetición y se colocaron en charolas con peat moss esterilizado a 121°C durante 1.50 h (Ormeño-Orrillo y Zuñiga-Dávila, 1999), las cuales se mantuvieron en invernadero durante 45 días. Posteriormente, se extrajeron 10 plántulas por repetición a las cuales se lavaron las raíces con agua, en total se utilizaron 30 plántulas por tratamiento. Las plántulas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 72 h; posteriormente se colocaron en una estufa a 42°C durante 48 h y finalmente se trasladaron a una estufa con una temperatura constante de 60°C durante 24 h (De la roza-Delgado *et al.*, 2002 modificado; Petruzzi *et al.*, 2005). El peso de la biomasa seca se obtuvo pesando por separado la raíz y el tallo junto con el follaje en una balanza analítica ES 120A. Se realizó un análisis de varianza de acuerdo al procedimiento ANOVA de SAS. Las diferencias entre las medias de los tratamientos se estimaron utilizando la prueba de Dunnet para comparar cada tratamiento con el control (Narbona *et al.*, 2003).

4.9 Producción de ácido indol acético

Se seleccionaron 20 cepas que se observó promovieron una germinación más rápida con relación al testigo y se evaluaron para la producción de ácido indol acético, mediante el método colorimétrico descrito por Sarwar y Kremer, (1995 modificado): se inoculó masa bacteriana directamente dentro del pozo de la microplaca con ayuda de un palillo estéril, se incubó a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 72 h y posteriormente se agregó

directamente el reactivo de Salkowski. Un cambio de coloración a rojo, indicó la producción de ácido indol acético.

4.10 Caracterización molecular

Para la amplificación del gen 16S rRNA, a partir de un cultivo bacteriano puro se realizó un Bio-PCR con los iniciadores universales para Eubacterias FD1 (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') y RD1 (5' AAGGAGGTGATCCAGCC 3') que amplifican un fragmento de aproximadamente 1500 pb (Rodrigues *et al.*, 2003, modificado). Se preparó una suspensión bacteriana acuosa en 100µL de agua para PCR (Promega Nucleasa-Free water). La reacción se realizó en un volumen final de 25 µL utilizando 1 µL de los iniciadores a una concentración de 10 µM, buffer para PCR a una concentración final de 1X, MgCL₂ a 1.5 mM, dNTP's a 200 µM, 2U de taq polimerasa (todos los reactivos son de Promega) y 2 µL de la suspensión bacteriana (DNA). Las condiciones del PCR consistieron de una desnaturalización inicial de un ciclo de 95°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos con 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 30 segundos y 72°C por 2 minutos y una extensión final de 72°C durante 7 minutos. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador "Prime Thermal Cycler". Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% a 95 V por 45 minutos en buffer TBE 1X; se utilizó un marcador molecular 1Kb (Promega). El gel se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó en un fotodocumentador "INFINITY VILBER LOURMAT" (INFINITY 5T-5). Una vez obtenido el producto de PCR, se purificó con el protocolo de Wizard (Promega Corporation, 1999). El producto purificado (Figura 17) se secuenció en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM junto con el iniciador FD1. Una vez obtenidas las secuencias se compararon con la base de datos del GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando el BLAST (Basic Local Aligment Search Tool).

4.11 Preservación de las cepas bacterianas

Una vez que las bacteria fueron identificadas, se preservaron en cultivo criogénico en agar nutritivo y glicerol al 40% (1:1 v/v) a -20°C.

5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Aislamiento de cepas bacterianas de la rizósfera de jitomate

De la rizósfera de jitomate se obtuvieron 74 aislados bacterianos fluorescentes en medio B de King (Figura 4).

La rizósfera es un ambiente dinámico en el que ocurren diversos procesos creando un nicho único y activo, en el cual intervienen diversos factores que afectan las comunidades microbianas alrededor de esta, por lo tanto el número de aislamientos bacterianos es variable. Minz *et al.* (2013), mencionan que los procesos químicos implican deposición pasiva y activa de muchos compuestos, entre los que se encuentran: aminoácidos, proteínas, hidratos de carbono, azúcares, entre otros, los cuales son la fuerza motriz para las alteraciones en la actividad, función, abundancia, composición y estructura de la comunidad microbiana del suelo. Los exudados de la raíz influyen selectivamente en el crecimiento de bacterias y hongos que colonizan la rizósfera mediante la alteración de la química del suelo en las proximidades de las raíces de las plantas; en base a esto las comunidades microbianas de la rizósfera, pueden variar en estructura y composición de especies en diferentes lugares de la raíz o en relación al tipo de suelo y otros factores ambientales (Yang y Crowley, 2000). Existen diversos factores que se han asociado que tienen efecto en la densidad de ciertas comunidades microbianas en la rizósfera de diversas especies de plantas; de acuerdo con Smalla *et al.* (2001); y Houlden *et al.* (2008), la abundancia y distribución de bacterias en el suelo y la rizósfera puede variar de acuerdo a la planta hospedante, el estado de crecimiento de la planta, las prácticas de cultivo, entre otros. El grupo de *Pseudomonas* fluorescentes se ha reportado como uno de los grupos más abundantes en la rizósfera de las plantas y algunas pueden ser benéficas ya sea por la estimulación directa del crecimiento de las plantas o mediante el antagonismo hacia patógenos de plantas transmitidas por el suelo (Weller, 1988; Anjaiah, 2004); por lo tanto, se consideran con potencial de biocontrol de enfermedades principalmente de las raíces de las plantas.

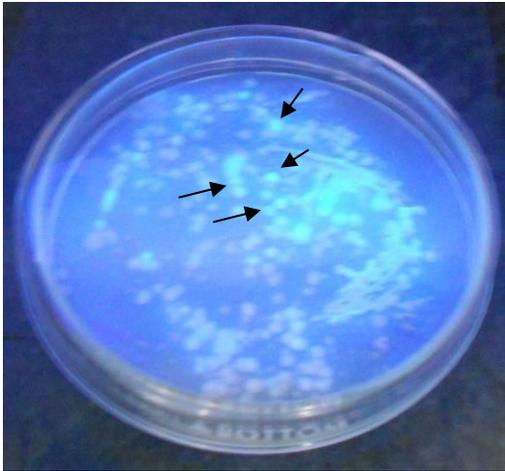


Figura 3. Aislamiento de colonias bacterianas fluorescentes

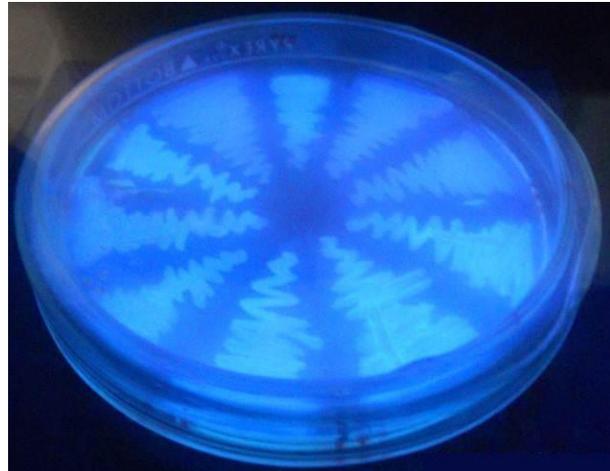


Figura 4. Aspecto del crecimiento bacteriano de cepas fluorescentes en medio BK a las 48 h.

5.1.1 Evaluación de antagonismo *in vitro*

Se evaluaron un total de 356 aislamientos bacterianos de los cuales 152 son fluorescentes (43%) y 204 (57%) no fluorescentes. De la micósfera de esclerocios de *Claviceps gigantea*, de 10 aislamientos, el 100% fueron fluorescentes; de la rizósfera de jamaica; 68 aislamientos (25%) fueron fluorescentes y 204 (75%) no fluorescentes y 74 (100%) de la rizósfera de jitomate.

5.2 Antagonismo *in vitro* en medio B de King de aislamientos bacterianos fluorescentes y no fluorescentes contra *Xanthomonas vesicatoria* y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

En la selección previa realizada se observaron cepas fluorescentes y no fluorescentes con antagonismo *in vitro* contra *X. vesicatoria*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* o ambos. Se observaron halos de inhibición a partir de las 48 h de incubación ($28 \pm 2^\circ\text{C}$). Posteriormente, algunos halos se presentaron más definidos a las 72 h (Figura 5); sin embargo, en esta investigación se determinó estandarizar y realizar las evaluaciones de inhibición solamente a las 48 h de incubación.

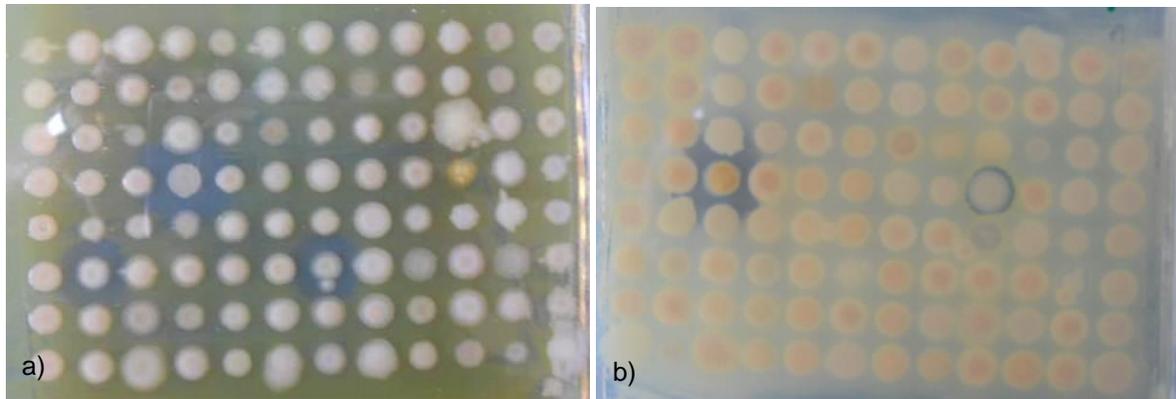


Figura 5. Halos de inhibición en medio B de King, a las 72 h de incubación. a) contra *Xv*, b) contra *Cmm*

En nuestros resultados de antagonismo, se identificó el desarrollo de tres tipos de halos: (A) halos translúcidos; (B) halos con cierta turbidez por presentar crecimiento bacteriano, y (C) halos translúcidos en torno a la zona de crecimiento bacteriano con un borde periférico con cierto crecimiento bacteriano (Figura 6), lo cual podría indicar que las bacterias pueden tener acción bactericida o bacteriostática contra otros grupos de microorganismos. La banda de inhibición se midió con un escalímetro (0-30 cm) en la escala de 1:100 (Figura 7).

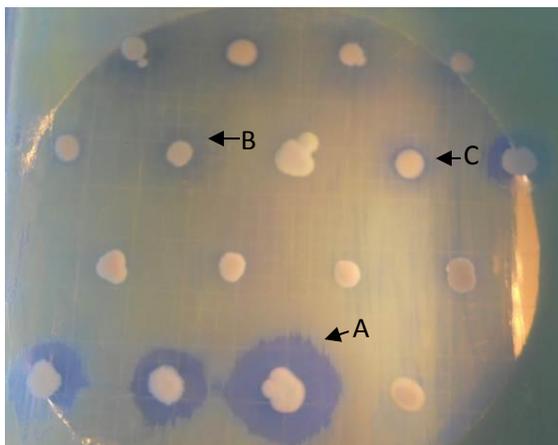


Figura 6. Aspecto de los tipos de halo de inhibición (A, B y C) en medio B de King a las 48 h de incubación a $28 \pm 2^\circ\text{C}$.

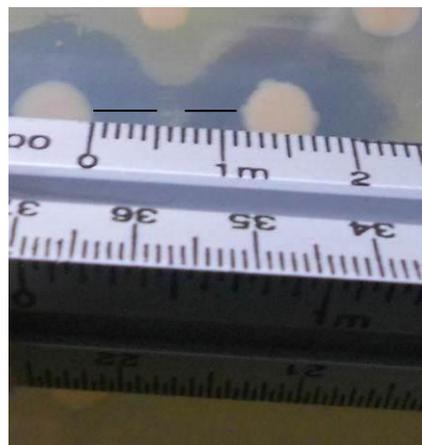


Figura 7. Medición de la banda de inhibición

De 152 aislamientos bacterianos fluorescentes, se consideraron 54 cepas (35%) para una siguiente fase de evaluación de antagonismo en los medios Agar Nutritivo, B de King y Waksman, contra *X. vesicatoria* de las cuales 4 fueron obtenidas de la micósfera de *Claviceps gigantea*, 45 de la rizósfera de plantas de jamaica y 5 de la rizósfera de jitomate; mientras que contra *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* se consideraron 12 cepas fluorescentes (8%). De entre éstas, 2 cepas fueron aisladas de la micósfera de *Claviceps gigantea* y 10 de la rizósfera de plantas de jamaica.

5.3 Antagonismo *in vitro* en medio Agar Nutritivo, B de King y Waksman agar de cepas fluorescentes contra *Xanthomonas vesicatoria* y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

En esta investigación se determinó realizar la evaluación del antagonismo *in vitro* de las poblaciones bacterianas fluorescentes, así como aquellas no fluorescentes en diferentes medios de cultivo: Agar nutritivo (AN) y Waksman agar (W), para determinar el efecto que tienen diferentes sustratos en la expresión de antagonismo *in vitro* contra dos patógenos bacterianos de jitomate (*X. vesicatoria* y *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*). Para la evaluación anterior, se consideró la primera determinación de antagonismo *in vitro* realizado en medio BK, cuyos resultados en la formación del halo de inhibición por cada cepa evaluada se consideró como referencia del 100% y así poder estimar diferencias en la expresión de antagonismo *in vitro* por una misma cepa bacteriana fluorescente y no fluorescente en diferentes sustratos.

5.3.1 Resultados del antagonismo *in vitro* de cepas fluorescentes contra *Xanthomonas vesicatoria*.

Los resultados de antagonismo *in vitro* de cepas bacterianas fluorescentes contra *X. vesicatoria* en el medio de cultivo Agar Nutritivo y el medio Waksman se muestran en la Figura 8.

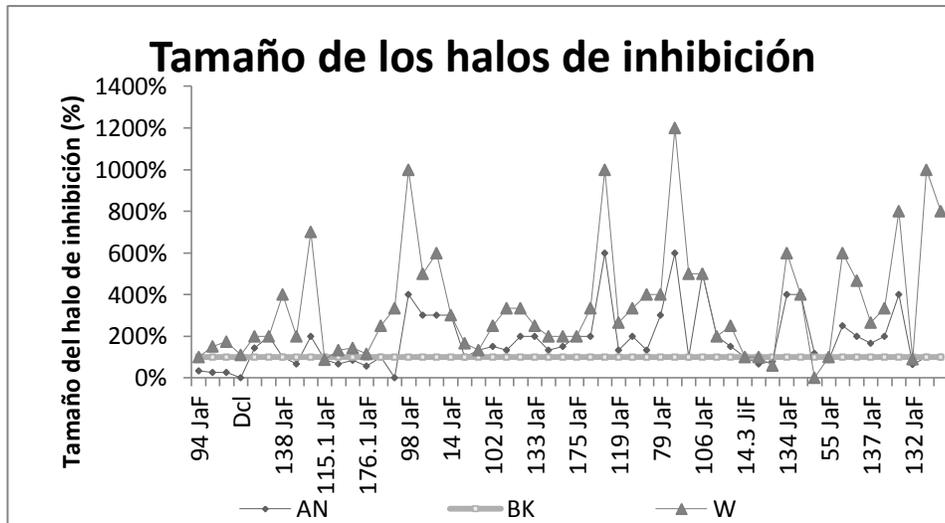


Figura 8. Comparación del tamaño de halo obtenido en AN y W contra *Xv* respecto al obtenido en BK (100%)

cl: Cepas obtenidas de la micósfera de *Claviceps gigantea*. JaF: Cepas Fluorescentes obtenidas de la rizósfera de Jamaica. JIF: Cepas Fluorescentes obtenidas de la rizósfera de jitomate.

El medio Waksman agar, es el medio en que las cepas bacterianas fluorescentes expresaron una mayor actividad antagonista, ya que el promedio (mm) de los halos fue mayor que el promedio del halo producido tanto en Agar Nutritivo como en B de King, lo anterior probablemente se debe a la composición diferencial entre los medios de cultivo utilizados que pudieran permitir la expresión en mayor o menor grado de metabolitos involucrados en el antagonismo *in vitro*, incluso la expresión de metabolitos específicos en función de alguna molécula o componente del medio que actúe como señal para la producción de estos metabolitos específicos en un medio de cultivo determinado y no en otros. Por lo anterior, nuestros resultados mostraron que la composición de tres medios diferentes, influye en la expresión de la actividad antagonista *in vitro* de microorganismos bacterianos (Lukic *et al.*, 1972; Berg *et al.*, 2002).

5.3.2 Resultados del antagonismo *in vitro* de cepas fluorescentes contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Los resultados de antagonismo *in vitro* de cepas bacterianas fluorescentes contra *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en los medios de cultivo Agar Nutritivo y Waksman se muestran en la Figura 9.

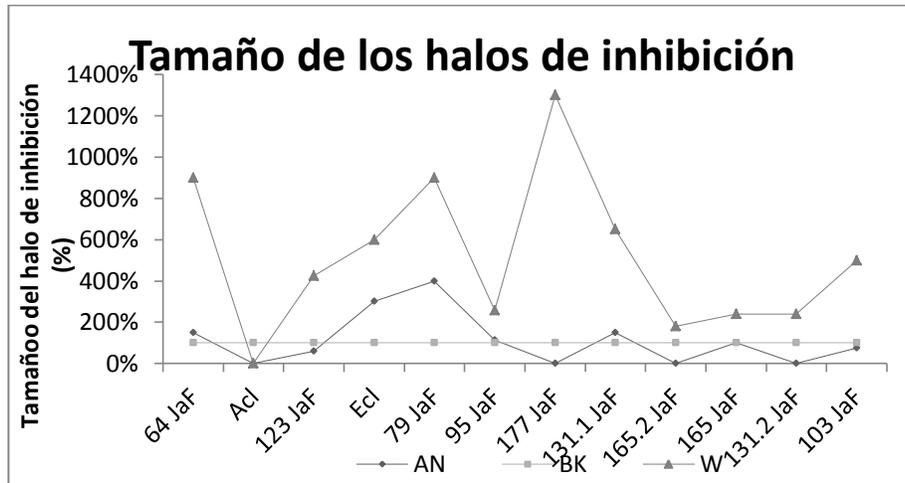


Figura 9. Comparación del tamaño de halo obtenido en AN y W contra *Cmm* respecto al obtenido en BK (100%).

cl: Cepas obtenidas de la micósfera de *Claviceps gigantea*. JaF: Cepas Fluorescentes obtenidas de la rizósfera de Jamaica

Se observaron resultados parecidos a los obtenidos contra *X. vesicatoria*. El medio Waksman es el medio en que las cepas bacterianas fluorescentes expresaron una mayor actividad antagonista, seguido del Agar Nutritivo y finalmente el B de King.

De acuerdo a los resultados de inhibición obtenidos en el medio Waksman, las cepas se clasificaron en 6 grupos de acuerdo al tamaño del ancho de la banda de inhibición, en base a la escala siguiente: 0 (-), 0.1- 2mm (+), 2.1 - 4mm (++), 4.1 - 6mm (+++), 6.1 - 8mm (++++), > 8.1mm (+++++); la mayoría de los aislamientos evaluados, expresó un ancho del halo de 4.1 a 6 mm (Grupo +++) (Figura 10).

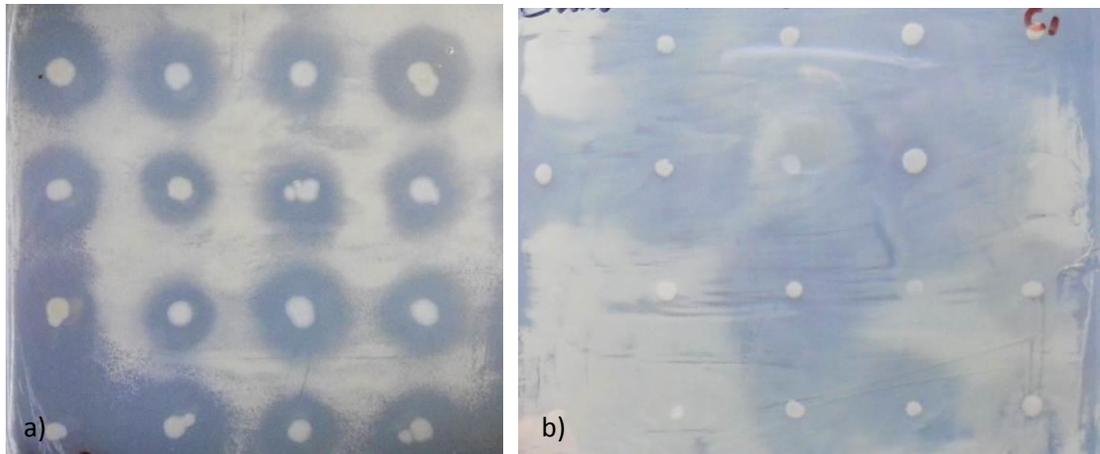


Figura 10. Halos de inhibición en medio W a las 48 h de incubación a) contra *Xv*, b) contra *Cmm*

5.4 Antagonismo *in vitro* en medio Agar Nutritivo, B de King y Waksman agar de cepas no fluorescentes contra *Xanthomonas vesicatoria* y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Esto se llevó a cabo para observar si cepas no fluorescentes también expresaban algún efecto de antagonismo contra las bacterias patógenas evaluadas (*X. vesicatoria* y *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*), ya que hay información de ciertas bacterias como *Bacillus* spp. que tienen efecto de inhibición en hongos; con lo cual se pudieran tener más alternativas de control biológico.

De 204 cepas no fluorescentes, 14 cepas (7%) presentaron halo de inhibición contra *X. vesicatoria* y 5 cepas (2%) presentaron halo de inhibición contra *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*.

5.4.1 Resultados del antagonismo *in vitro* de cepas no fluorescentes contra *Xanthomonas vesicatoria*.

La Figura 11, muestra las diferencias en tamaño del halo de inhibición *in vitro* contra *X. vesicatoria*, de las cepas no fluorescentes aisladas de la rizósfera de jamaica en el medio Agar Nutritivo y Waksman agar, comparado con el promedio de estas obtenido en B de King.

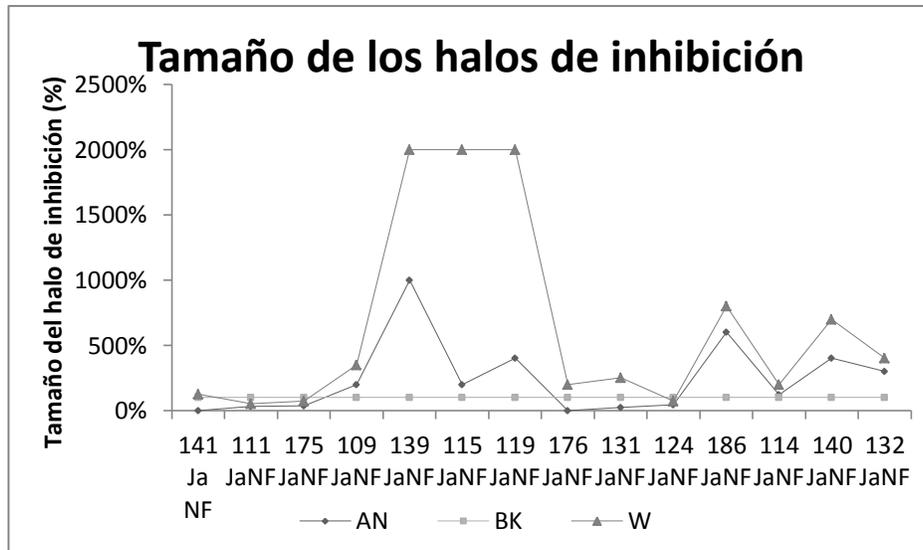


Figura 11. Comparación del tamaño de halo obtenido en AN y W contra Xv respecto al obtenido en BK (100%).

JaNF: Cepas no fluorescentes, obtenidas de la rizósfera de jamaica.

5.4.2 Resultados del antagonismo *in vitro* de cepas no fluorescentes contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Los resultados de antagonismo *in vitro* de cepas bacterianas no fluorescentes contra *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en los medios de cultivo Agar Nutritivo y Waksman se muestran en la figura 12.

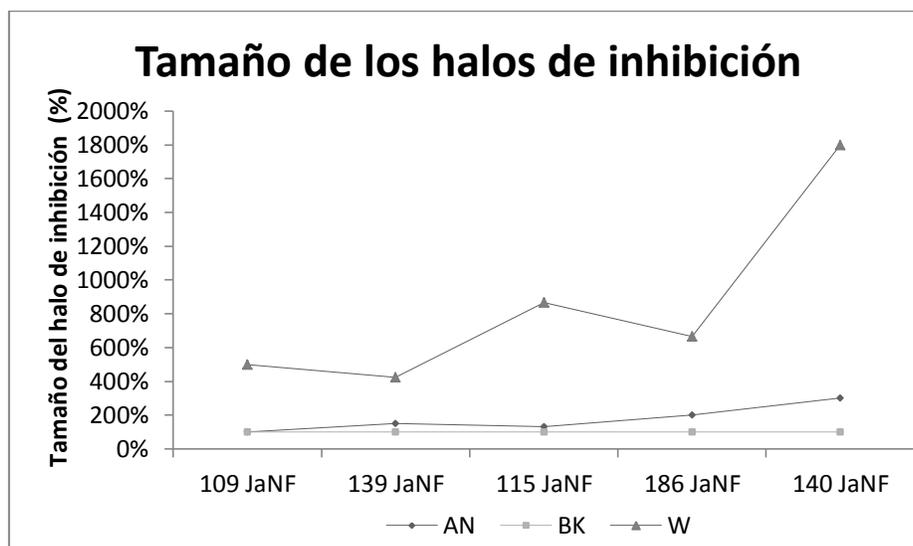


Figura 12. Comparación del tamaño de halo obtenido en AN y W respecto al obtenido en BK (100%).

JaNF: Cepas no fluorescentes, obtenidas de la rizósfera de jamaica

En este caso, la mayoría de los aislamientos evaluados expresó un ancho del halo >8.1 mm (Grupo +++++), por lo tanto se les dio continuidad para las pruebas de germinación, con la finalidad de observar si mejoraban la germinación de las semillas de jitomate.

Con base en los resultados obtenidos se determinó que el medio Waksman agar, es el medio en el que los aislamientos bacterianos tanto de las poblaciones fluorescentes como de las no fluorescentes, expresaron una mayor actividad antagonista, ya que el promedio (mm) de los halos fue mayor que el promedio del halo producido tanto en Agar Nutritivo como en B de King. De igual forma, el medio Agar Nutritivo fue mejor sustrato para la expresión de antagonismo *in vitro* que el medio B de King.

Los resultados mostraron un mayor número de cepas bacterianas fluorescentes con capacidad de inhibición contra *X. vesicatoria* y/o *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, en contraste con las no fluorescentes; lo anterior coincide con los resultados de otras investigaciones que han documentado la capacidad de poblaciones bacterianas fluorescentes en la producción de diversos metabolitos involucrados en el antagonismo, tanto en laboratorio como en condiciones de campo contra diversos fitopatógenos tanto de etiología fungosa como bacteriana; por tal razón diversas poblaciones fluorescentes han sido modelos de estudios en su actividad como inoculantes microbianos y agentes de biocontrol (Thomashow, 1996; Walsh *et al.*, 2001; Haas y Keel, 2003; Haas y Défago, 2005; Weller, 2007). Tal es el caso de *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida*, las cuales han sido ampliamente utilizadas en diversos ensayos con resultados favorables tanto para el control biológico de patógenos como para mejorar el crecimiento y rendimiento de las plantas, estas se han reportado en diversos cultivos, como cereales, hortalizas, algodón, entre otros (Scher, 1986; Clarkson y Lucas, 1997; Shah-Smith y Burns, 1997; Park *et al.*, 2011; Arumugam *et al.*, 2013).

Una mayor proporción de los aislamientos bacterianos con origen en la rizósfera de Jamaica, mostraron actividad antagonista *in vitro* contra *X. vesicatoria*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* o ambos; sin embargo, hay una mayor proporción de ellas antagonistas a *X. vesicatoria* que a *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Lo anterior podría ser atribuido a las características diferenciales en la estructura y composición de la pared celular en ambos patógenos; *X. vesicatoria* es una Gram negativa, mientras que *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* es Gram positiva. Estas diferencias en la pared celular podrían influir en la resistencia o susceptibilidad a un rango de metabolitos producidos en la interacción antagonista *in vitro*; muchos estudios han destacado que tanto las bacterias Gram negativas como las Gram positivas presentan una susceptibilidad diferencial debido a que los agentes antimicrobianos expresan diferentes modos de acción, actúan en diferentes sitios específicos y que estos pueden interferir con la síntesis de la pared celular, inhibir la síntesis de proteínas, interferir con la síntesis de ácido nucleico o inhibir una vía metabólica. En el caso de la resistencia, las bacterias pueden ser resistentes de manera natural; pero principalmente se presenta la resistencia adquirida, la cual se origina por selección a partir de una población bacteriana sensible; en estas, las poblaciones resistentes proliferan y se extienden bajo la presión selectiva de uso del agente antimicrobiano, llegando a convertirse en la población dominante. La resistencia adquirida puede ser cromosómica en la cual ocurre una alteración natural del DNA cromosómico (mutación) o extracromosómica en la que ocurre una adquisición de DNA extracromosómico. Los diversos mecanismos de resistencia empleados son: adquisición de genes que codifican enzimas que destruyen o inactivan al agente antibacteriano antes de que pueda tener un efecto por ejemplo las B-lactamasas; adquisición de bombas de eflujo, mediante el cual permite eliminar el agente antibacteriano de la célula antes de que pueda llegar al sitio diana y ejercer su efecto; disminución de la permeabilidad celular, en la cual las paredes celulares bacterianas alteradas ya no contienen el sitio de unión del agente antimicrobiano o a través de la modificación de las porinas limitando el acceso de agentes antimicrobianos en el sitio diana intracelular (Cavaliere *et al.*, 2005; Tenover, 2006; Wachsman y Degrossi, 2015). Por lo tanto, debido a la capacidad de las bacterias

para desarrollar resistencia a los agentes microbianos, el manejo de las enfermedades es cada vez más complicado. En esta investigación, las bacterias Gram negativas mostraron más susceptibilidad al antagonismo *in vitro* que las Gram positivas, ya que de 152 cepas bacterianas fluorescentes evaluadas, (54) mostraron antagonismo e inhibición del crecimiento *in vitro* contra *X. vesicatoria* (Gram negativa) en contraste, (12) expresaron antagonismo contra *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Gram positiva).

5.5 Detección de sideróforos

El grupo de las *Pseudomonas* fluorescentes es de los más utilizados para estimular y promover el crecimiento de las plantas debido a que produce una diversidad de metabolitos secundarios como fitohormonas, compuestos volátiles, y sideróforos.

Los sideróforos están involucrados en el antagonismo, colonización y competencia por nutrientes; por esta razón han sido ampliamente estudiados como un mecanismo de control biológico, identificándose su potencial en el control biológico de hongos y bacterias fitopatógenos (Díaz de Villegas *et al.*, 2002; Saber *et al.*, 2015).

De 54 aislamientos fluorescentes, todos ellos (100%) produjeron sideróforos. Los datos se tomaron a las 72 h después de incubación (Figura 13). La formación de halos amarillo-naranja alrededor de las colonias bacterianas en el medio CAS, indicaron la producción de sideróforos, lo que indica que uno de los mecanismos de antagonismo que utilizan es la competencia por nutrientes



Figura 13. Producción de sideróforos en medio CAS a las 72 h de incubación.

Las *Pseudomonas* fluorescentes expresan diversos mecanismos de acción contra fitopatógenos, uno de ellos es la producción de sideróforos, los cuales sirven como quelantes de hierro (Schwyn y Neilands, 1987); mediante la síntesis de estos puede limitar la cantidad de hierro disponible para el crecimiento de los patógenos, con lo cual suprimen el crecimiento de estos; además de participar en la promoción del crecimiento vegetal. El uso de sideróforos producidos por cepas de *Pseudomonas* como constituyentes de productos biológicos es de gran interés por las posibilidades de sustituir los productos químicos que dañan al ambiente y la salud humana (Loper and Lindow, 1987 citado por Díaz de Villegas 2002; Kloepper *et al.*, 1980 citado por Weller, 2007).

En este estudio se analizó si existía una relación entre el tamaño del halo de inhibición *in vitro* obtenido en el medio W y la producción de sideróforos en el medio CAS (Figura 14).

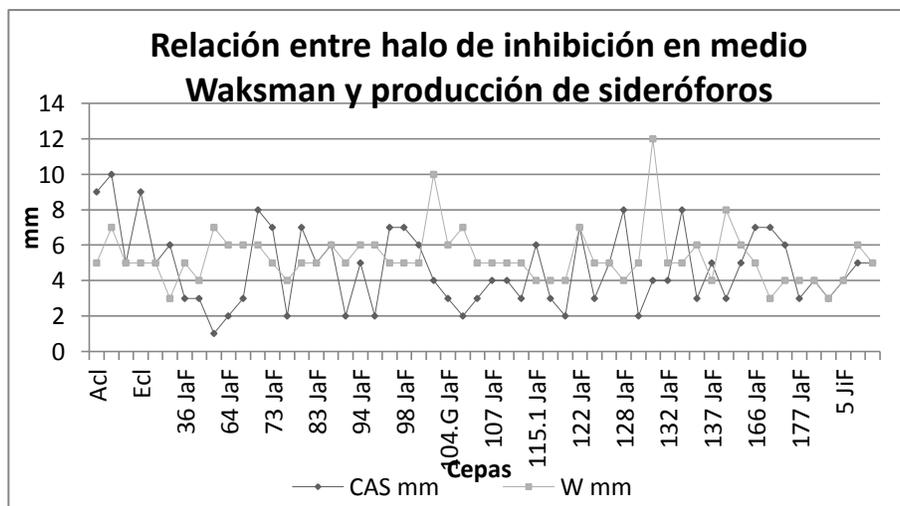


Figura 14. Relación de generación de halos en el medio Waksman y la producción de sideróforos en el medio CAS.

En los aislamientos que se citan a continuación: (14 JaF, 36 JaF, 55 JaF, 63 JaF, 64 JaF, 66 JaF, 79 JaF, 93 JaF, 95 JaF, 103 JaF, 104.G JaF, 104.H JaF, 106 JaF, 107 JaF, 109.1 JaF, 114.1 JaF, 115.1 JaF, 117 JaF, 119 JaF, 123 JaF, 128 JaF, 129 JaF, 131.2 JaF, 132 JaF, 134 JaF, 137 JaF, 138 JaF, 175 JaF, 176.1 JaF, 177 JaF, 4 JiF, 4.2 JiF, 5 JiF, 14.1 JiF, 14.3 JiF) no hay relación entre la producción de sideróforos y un mayor tamaño del halo de inhibición; lo anterior sugiere que el mecanismo de antagonismo que se expresa en condiciones *in vitro*, no depende únicamente de la producción de sideróforos y que uno o más metabolitos están involucrados en la expresión final de inhibición *in vitro* contra estos dos patógenos bacterianos.

5.6 Pruebas de germinación de las semillas

La inoculación de las semillas con especies de *Pseudomonas* fluorescentes puede inducir resistencia contra diversos patógenos, principalmente hongos de la raíz, además disminuir la severidad de la enfermedad, promover el crecimiento y rendimiento de las plantas. Por ejemplo, *Pseudomonas fluorescens* ha mostrado aumentar la germinación, vigor de las plántulas, altura de la planta, área foliar, entre otros (Vidhyasekaran y Muthamilan, 1995; Niranjan-Raj *et al.*, 2004).

Para la inoculación de las semillas se utilizaron suspensiones bacterianas de 33 aislamientos, de los cuales el ancho de la banda de inhibición *in vitro* expresado fue mayor a 5 mm; entre estos, 22 cepas fueron fluorescentes y 11 no fluorescentes. El testigo fue cubierto con agua destilada estéril. Los efectos del tratamiento de inoculación en la germinación y T_{50} , se presentan en el cuadro 2. (Los datos no presentaron una distribución normal; por lo tanto, fueron transformados a arco seno en el programa de Microsoft Excel 2010) y posteriormente se realizó el análisis de varianza (ANOVA; $P \leq 0.05$).

Cuadro 2. Datos de germinación (%) y T_{50} en comparación con el testigo. *** indican las comparaciones importantes del nivel 0.05

Cepa	Germinación (%)	T_{50} (h)	Cepa	Germinación (%)	T_{50} (h)
Testigo	83.8	70	131.2JaF	91.9	38***
Ccl	91.9	37***	134JaF	88.8	37***
Ecl	91.9	37***	138JaF	84.8	37***
63JaF	81.8	37***	165JaF	87.7	36***
64JaF	91.9	38***	177JaF	93.9	39***
66JaF	88.8	33***	109JaNF	53.5***	154***
71JaF	91.9	36***	111JaNF	92.9	40***
79JaF	95.9	38***	115JaNF	85.8	118***
85JaF	88.8	36***	119JaNF	81.8	59
94JaF	87.8	39***	124JaNF	88.8	44
95JaF	88.8	46	131JaNF	81.8	38***
103JaF	84.8	36***	132JaNF	80.8	88
104.HJaF	91.9	39***	139JaNF	71.7	141***
107JaF	80.8	35***	140JaNF	55***	198***
114Ja	92.9	36***	141JaNF	85.8	46
122JaF	86.8	38***	186JaNF	92.9	37***
123JaF	93.9	38***	14.1JiF	94.9	32***

En relación con el % de germinación, de los 33 tratamientos, 2 cepas mostraron diferencias con el testigo, las cuales disminuyeron el porcentaje de germinación (109 JaNF disminuyó un 30.3% y 140 JaNF disminuyó un 28.8%), mientras que de acuerdo con el T_{50} la mayoría de las cepas presentó diferencias a excepción de (132 JaNF, 119JaNF, 141JaNF, 95 JaF y 124 JaNF) las cuales indican que el tiempo en que germinan el 50% de las semillas es igual al obtenido por el testigo. Se presentaron incrementos significativos ($P < 0.05$) en la velocidad de germinación (T_{50}), lo que significa que por lo menos una cepa aumenta la velocidad de germinación; por lo tanto, esta cepa puede ser empleada para el proceso de inoculación de las semillas de jitomate y con ello es probable que la plántula aumente su crecimiento al ser colonizada más

rápidamente por la cepa bacteriana que por algún patógeno que se encuentre en la raíz. Con base en nuestros resultados, se concluye que las *Pseudomonas* fluorescentes utilizadas funcionan como promotoras del crecimiento al reducir el T_{50} de germinación con respecto al testigo.

A partir de lo anterior, 20 cepas fluorescentes fueron seleccionadas para las siguientes pruebas, a las cepas no fluorescentes ya no se les dio seguimiento debido a que no mejoraron, e incluso algunas disminuyeron la germinación de las semillas con respecto al testigo.

5.7 Vigor de las plántulas

De las 20 cepas bacterianas utilizadas para la inoculación, se observaron diferencias en el crecimiento de raíces y tallos con respecto al testigo como se observa en la Figura 15.



Figura 15. Vigor de las plántulas comparadas con el testigo: a) testigo, b) 14.1 JiF, c) 66 JaF, d) 64 JaF, e) 122 JaF, f) 79 JaF, g) Ccl .

De igual forma, al analizar los datos mediante la prueba de Dunnet se obtuvieron los resultados mostrados en el cuadro 3.

Cuadro 3. Comparación de medias del peso de biomasa seca comparadas con el testigo. Las comparaciones importantes del nivel 0.05 están indicadas por ***

Cepa	Medias peso de biomasa seca raíz (g)	Medias peso seco parte aérea(g)	Cepa	Medias peso de biomasa seca raíz (g)	Medias peso seco parte aérea(g)
103JaF	0.14007***	0.27643	177JaF	0.13733***	0.28183
104.HJaF	0.12570	0.33823	64JaF	0.12500	0.27050
107JaF	0.12497	0.35983	66JaF	0.13313***	0.26990
114JaF	0.13923***	0.30367	71JaF	0.15113***	0.32043
122JaF	0.13507***	0.27470	79JaF	0.12170	0.26153
123JaF	0.15267***	0.31317	85JaF	0.14960***	0.31073
134JaF	0.13697***	0.37457	94JaF	0.16757***	0.35030
138JaF	0.15447***	0.30493	95JaF	0.13600***	0.27483
14.1JiF	0.14737***	0.33687	Ccl	0.12297	0.26447
165JaF	0.14307***	0.28313	Ecl	0.17073***	0.34713
T	0.09603	0.22237			

Las plántulas de jitomate inoculadas con las bacterias mostraron un aumento en germinación, velocidad de germinación y en vigor en comparación con el testigo; lo anterior sugiere un efecto de estimulación de la adquisición de nutrientes y la producción de fitohormonas. El incremento del peso de biomasa seca como respuesta a las bacterias inoculadas, muestran el rol benéfico de las bacterias rizosféricas utilizadas, lo que podría representar una herramienta útil para seleccionar bacterias potencialmente eficientes como promotoras del crecimiento.

Niranja-Raj *et al.* (2004) mencionan resultados similares al inocular semillas de mijo con *Pseudomonas fluorescens*.

5.8 Producción de ácido indol acético

Las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas basan su habilidad en la producción de ácido indol acético, sideróforos y antibióticos (Saber *et al.*, 2015). El ácido indol acético bacteriano juega un papel importante en el desarrollo radicular de la planta huésped (Patten y Glick, 2002; Karnwal, 2009).

De las 20 cepas evaluadas, la mayoría mostró en diferente grado la producción de ácido indol acético, tal como se observa en la Figura 16. Con estos resultados podemos mencionar que las cepas utilizadas para la inoculación de las semillas, pueden funcionar como promotoras de crecimiento.

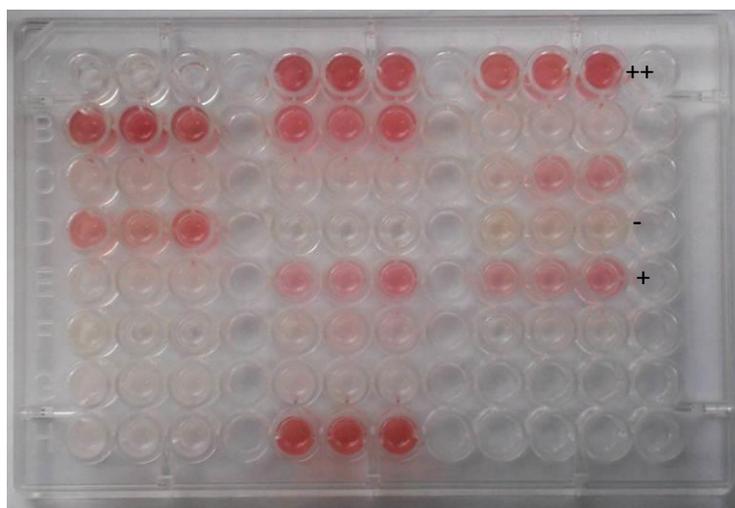


Figura 16. Coloración roja (++) mayor producción de ácido indol acético. Coloración rosa (+) menor producción de ácido indol acético. Pocillos incoloros (-) producción de ácido indol acético negativa. Cepas de jamaica, producción de AIA (-): 107JaF, 114JaF, 122JaF, 138JaF, 165JaF, 85JaF; Cepa de jitomate, producción de AIA (-): 14.1JiF; Cepas de jamaica, producción de AIA (+): 134JaF, 64JaF, 66JaF, 71JaF, 94JaF, 95JaF; Cepas de jamaica producción de AIA (++) : 103JaF, 104.HJaF, 123JaF, 177JaF, 79JaF; Cepas de *Claviceps gigantea*, producción de AIA (++) : Ccl, Ecl.

El ácido indol acético es una auxina que entre otras funciones estimula la germinación de las semillas y promueve el desarrollo de raíces laterales mediante las cuales facilita la absorción de nutrientes, por tal motivo está asociado al crecimiento de las plantas. (Glick *et al.*, 1995, citados por Patten y Glick, 2002) mencionan que la promoción del crecimiento de las raíces es una de las principales características por las cuales se mide el efecto benéfico de las bacterias promotoras del crecimiento; se han reportado varias especies de *Pseudomonas* dentro del grupo fluorescente como productoras de esta fitohormona, por ejemplo *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida*.

5.9 Caracterización molecular

Mediante la amplificación del gen 16S rRNA, las 20 cepas bacterianas generaron amplicones de aproximadamente 1500 pb (Figura 17) como resultado de la PCR con los iniciadores FD1 y RD1, lo que corresponde con el tamaño del amplicón esperado para el gen 16S rRNA (Weisburg *et al.*, 1991; Rodrigues *et al.*, 2003).

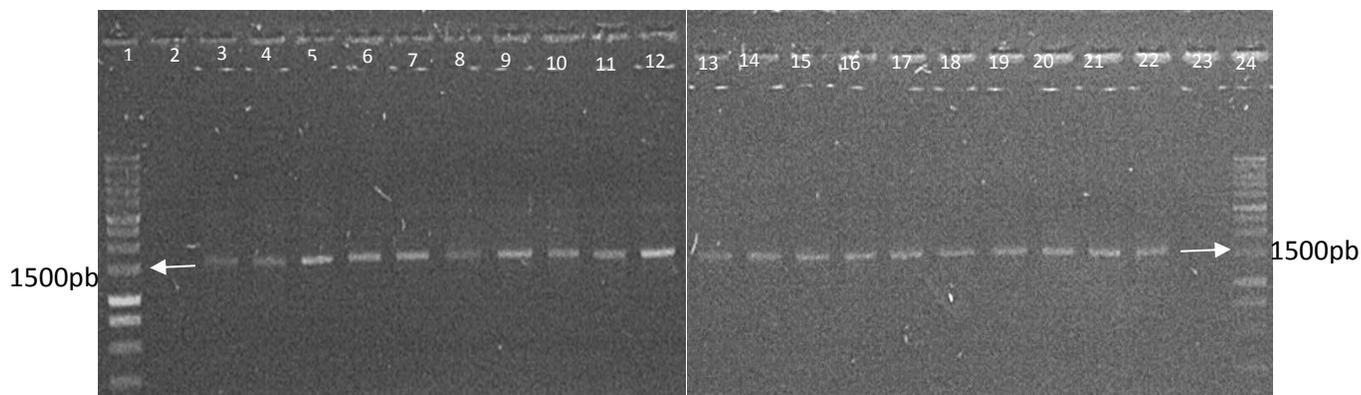


Figura 17. Gel de electroforesis al 1%, cepas purificadas
 Carril 1) Marcador 1Kb, 2) blanco, 3) 107 JaF, 4)14.1 JiF, 5) 71 JaF, 6) 123 JaF, 7) 104.H JaF, 8) 85 JaF, 9) 138 JaF, 10) 94 JaF, 11) Ecl, 12) 134 JaF, 13) 122 JaF, 14) 66 JaF, 15) 64 JaF, 16) Ccl, 17) 79 JaF, 18) 114 JaF, 19) 165JaF, 20) 177 JaF, 21) 103 JaF, 22) 95 JaF, 23) blanco, 24) Marcador 1Kb.

Las secuencias obtenidas coincidieron con una identidad mayor al 90% de acuerdo al alineamiento en el banco de genes del NCBI (Cuadro 4).

Cuadro 4. Identificación de las cepas mediante el gen 16S rRNA

CEPA	IDENTIFICACION	No. DE ACCESO	Antagonismo <i>in vitro</i>	
			<i>Cmm</i>	<i>Xv</i>
14.1 JiF	<i>Pseudomonas putida</i>	KJ534476.1	-	+
107 JaF	<i>Pseudomonas sp.</i>	AB269776.1	-	+
71 JaF	<i>Pseudomonas sp.</i>	GU990089.2	-	+
123 JaF	<i>Pseudomonas sp.</i>	GU990089.2	+	+
104.H JaF	<i>Pseudomonas putida</i>	KF030906.1	-	+
85 JaF	<i>Pseudomonas sp.</i>	GU990089.2	-	+
138 JaF	<i>Pseudomonas sp.</i>	GU990089.2	-	+
94 JaF	<i>Pseudomonas sp.</i>	GU990089.2	-	+
Ecl	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DQ095904.1	+	+
134 JaF	<i>Pseudomonas sp.</i>	GU990089.2	-	+
122 JaF	<i>Pseudomonas sp.</i>	GU990089.2	-	+
66 JaF	<i>Pseudomonas sp.</i>	GU990089.2	-	+
64 JaF	<i>Pseudomonas sp.</i>	GU990089.2	+	+
Ccl	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	KP050500.1	-	+
79 JaF	<i>Pseudomonas putida</i>	KF030906.1	+	+
114 JaF	<i>Pseudomonas sp.</i>	AM745260.1	-	+
165JaF	<i>Pseudomonas sp.</i>	GU990089.2	+	+
177 JaF	<i>Pseudomonas putida</i>	KF030909.1	+	+
103 JaF	<i>Pseudomonas sp.</i>	AM745260.1	+	+
95 JaF	<i>Pseudomonas putida</i>	KF030909.1	+	+

De las 20 cepas bacterianas antagonistas, 13 fueron identificadas como *Pseudomonas sp* (65%), 5 (25%) se identificaron como *Pseudomonas putida* y 2 (10%) como *Pseudomonas fluorescens*.

Pseudomonas fluorescens y *Pseudomonas putida* ejercen acción antagónica contra *X. vesicatoria*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* o ambas, por lo tanto se puede considerarlas como potenciales agentes de control biológico en campo.

Cepas de *Pseudomonas putida* han sido utilizadas en muchas aplicaciones incluyendo biorremediación y producción de enzimas como agentes de biocontrol en la protección de cultivos. Se ha reportado como un agente de control biológico moderadamente efectivo contra *X. vesicatoria* en condiciones de campo al reducir significativamente síntomas foliares (Byrne *et al.*, 2005; Campbell *et al.*, 1998 citado por El-Hendawy *et al.*, 2005; McSpadden Gardener, 2007); por otra parte, se ha considerado de importancia como control biológico por inducir resistencia adquirida en las plantas contra diversos patógenos, incluyendo patógenos bacterianos. Asimismo, Byrne *et al.* (2005) reportan a *Pseudomonas fluorescens* contra *X. vesicatoria* como moderadamente efectivo en invernadero, discutiendo la probabilidad de una pobre supervivencia de las poblaciones de *Pseudomonas fluorescens* comparada con el patógeno en el patosistema estudiado.

En esta investigación, algunos agentes de control biológico potencialmente eficaces pudieron haberse desechado, ya que únicamente se seleccionaron las cepas fluorescentes que no mostraron efecto negativo en la germinación de las semillas de jitomate, así como las cepas no fluorescentes en las que se observó esta misma situación; sin embargo, creemos que el enfoque utilizado en esta investigación involucra mayores elementos de selección de potenciales agentes de biocontrol, que aquellos en los que únicamente se fundamentan en la expresión de antibiosis *in vitro*. Aunque el potencial de control de *X. vesicatoria*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, o ambas obtenido *in vitro* mediante estas cepas bacterianas es prometedor, no es suficiente para justificar el uso exclusivo de *P. fluorescens* o *P. putida* en el campo para el manejo de las mismas, pero si como una estrategia que se incluya en un manejo integrado. Byrne *et al.* (2005) mencionan que el uso de un agente de control biológico combinado con un producto químico puede aumentar el nivel de control que al utilizar sólo el agente de control biológico. Sería recomendable

evaluar el potencial de *P. putida* y *P. fluorescens* a nivel de producción comercial para observar si la técnica de la inoculación de las semillas utilizado en este estudio con las suspensiones bacterianas utilizadas, promueve un efecto benéfico en el crecimiento de las plantas de jitomate y en la obtención de un mayor rendimiento; también consideramos importante y necesario evaluar la aplicación foliar de estas cepas, así como la aplicación directamente a la raíz, incluyendo el desarrollo y evaluación de un programa con aplicaciones periódicas. Finalmente un enfoque integrado puede mejorar la eficacia de los agentes de control biológico así como facilitar su aplicación. El aumento en el uso de *Pseudomonas* fluorescentes como agentes de control biológico depende en gran medida del conocimiento y comprensión de los mecanismos implicados en la interacción entre el antagonista, el patógeno y la planta. A pesar de que muchos microorganismos, entre ellos las *Pseudomonas* fluorescentes, producen sustancias antimicrobianas y el fenómeno de la antibiosis es demostrado *in vitro*, es muy difícil dilucidar el efecto de la antibiosis en una interacción agente de biocontrol-planta-patógeno en condiciones naturales de un patosistema (Dubos, 1987 citado por Pérez 2004). El hecho de que las cepas hayan mostrado efectividad *in vitro* contra *X. vesicatoria*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, o ambas, no significa que tengan el mismo comportamiento en campo, debido a que en condiciones naturales existen otros niveles de interacción con otros microorganismos que influyan en la expresión del antagonismo mostrado *in vitro*. Sin embargo, la presente investigación aporta elementos fundamentales en la selección de prototipos bacterianos con la mayor expresión de elementos de antagonismo y/o promotores de crecimiento de plantas de jitomate que pudieran ser considerados para su evaluación a una escala comercial en el cultivo de jitomate.

6.- CONCLUSIONES

- 1.- Las poblaciones de *Pseudomonas* fluorescentes expresan mayor antagonismo *in vitro* contra *X. vesicatoria* que contra *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*.
- 2.- El medio Waksman agar es el sustrato en donde se expresa más eficientemente la inhibición *in vitro*, contra *X. vesicatoria* y/o *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, seguido del Agar Nutritivo y B de King.
- 3.- La mayoría de las cepas de *Pseudomonas* fluorescentes disminuyen el T₅₀ de germinación de las semillas de jitomate, además de promover el crecimiento e incremento del peso de biomasa seca de las raíces.
- 4.- La velocidad de germinación de la semilla de jitomate, se relaciona con la producción de ácido indol acético y sideróforos por las *Pseudomonas* fluorescentes evaluadas.
- 5.- Independientemente del nicho ecológico del que fueron aisladas las *Pseudomonas* fluorescentes, estas producen metabolitos secundarios que inhiben a *X. vesicatoria* y *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, además de promover el crecimiento de las raíces de las plántulas de jitomate.
- 6.- Las 20 cepas de *Pseudomonas* fluorescentes antagonistas se identificaron como *Pseudomonas* sp. (65%), *Pseudomonas putida* (25%) y *Pseudomonas fluorescens* (10%).

7.- LITERATURA CITADA

- Ahemad, M., and M. Kibret. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. Review. J. King Saud Univ.- Sci. 26: 1-20.
- Al-Dahmani, J. H., P. A. Abbasi, S. A. Miller, and H. A. J. Hoitink. 2003. Suppression of bacterial spot of tomato with foliar sprays of compost extracts under greenhouse and field conditions. Plant Dis. 87: 913-919.
- Anjaiah, V. 2004. Biological control mechanisms of fluorescent *Pseudomonas* species involved in control of root diseases of vegetables/ fruits. In: Fruit and vegetable diseases. Disease Management of fruits and vegetables. (ed.) K. G. Mukerji. 453-500 pp.
- Araújo, E. R., M. A. S. V. Ferreira, and A. M. Quezado-Duval. 2013. Specific primers for *Xanthomonas vesicatoria*, a tomato bacterial spot causal agent. Eur. J. Plant. Pathol. 137: 5-9.
- Artola, A., G. Carrillo-Castañeda, and G. García de los Santos. 2003. Hydropriming: a strategy to increase *Lotus corniculatus* L. seed vigor. Seed Sci. & Technol. 31: 455-463.
- Arumugam, K., P. Ramalingam, and M. Appu. 2013. Isolation of *Trichoderma viridae* and *Pseudomonas fluorescens* organism from soil and their treatment against rice pathogens. J. Microbiol. Biotech. Res. 3: 77-81.
- Audenaert, K., T. Pattery, P. Cornelis, and M. Höfte. 2002. Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. Mol. Plant Microbe Interact. 15: 1147-1156.
- Bashan, Y., and G. Holguin. 1998. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-pgpb (plant growth-promoting bacteria) and pgpb. Soil Biol. Biochem. 30: 1225-1228.
- Beran, P., and I. Mráz. 2013. Species-specific PCR primers for detection of *Xanthomonas vesicatoria*. Crop protection. 43: 213-215.

- Berg, G., N. Roskot, A. Steidle, L. Eberl, A. Zock, and K. Smalla. 2002. Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3328-3338.
- Blancard, D. 1990. Enfermedades del tomate. Trad. I. A. Peña. Ed. Mundi-prensa. Madrid. 211 p.
- Borboa F. J., E. O. Rueda, P., E. Acedo, F., J. F. Ponce, M. Cruz, O. Grimaldo, J. y A. M. García, O. 2009. Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* en el tomate del Estado de Sonora, México. *Rev. Fitotec. Mex.* 32: 319-326.
- Bouizgarne, B. 2013. Bacteria for plant growth promotion and disease management. In: *Bacteria in Agrobiolgy: Disease Managment.* (ed.) D. K. Maheshwari. Ed. Springer. 15-47 pp
- Bouzar, H., J. B. Jones, G. C. Somodi, R. E. Stall, N. Daouzli, R. C. Lambe, R. Felix-Gastelum, and R. Trinidad-Correa. 1996. Diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato and pepper fields of Mexico. *Can. J. Plant Pathol.* 18: 75-77.
- Byrne, J. M., A. C. Dianese, P. Ji, H. L. Campbell, D. A. Cuppels, F. J. Louws, S. A. Miller, J. B. Jones, and M. Wilson. 2005. Biological control of bacterial spot of tomato under field conditions at several locations in North America. *Biol. Control.* 32: 408-418.
- CABI (CAB International). 2015. Datasheet. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (bacterial canker of tomato). <http://www.cabi.org/isc/datasheet/15338> consulta: Enero, 2015.
- CABI-EPPO (CAB International-European and Mediterranean Plant Protection Organization) 1997. EPPO quarantine pest. Data sheets on quarantine pests *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. [https://www.eppo.int/QUARANTINE/bacteria/Clavibacter m michiganensis/COR BMI ds.pdf](https://www.eppo.int/QUARANTINE/bacteria/Clavibacter_m_michiganensis/COR_BMI_ds.pdf) consulta: Enero, 2015
- CABI-EPPO (CAB International-European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2013. EPPO quarantine pest. Data sheets on quarantine pests *Xanthomonas vesicatoria*. [http://www.eppo.int/QUARANTINE/bacteria/Xanthomonas vesicatoria/XANTVE ds.pdf](http://www.eppo.int/QUARANTINE/bacteria/Xanthomonas_vesicatoria/XANTVE_ds.pdf) consulta: Enero, 2015

- Callan, N. W., D. E. Mathre, and J. B. Miller. 1990. Bio-priming seed treatment for biological control of *Pythium ultimum* preemergence damping-off in *sh2* Sweet Corn. *Plant Dis.* 74: 368-372.
- Carrillo-Fasio, J.A., L. Sánchez-Bautista, R.S. García-Estrada, R. Allende-Molar, e I. Márquez-Zequera. 2001. Razas de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye. presentes en el Estado de Sinaloa, México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 19: 248-250.
- Cavaleri, S. J., R. J. Harbeck, Y. S. McCarter, J. H. Ortez, I. D. Rankin, R. L. Sautter, S. E. Sharp, and C. A. Spiegel. 2005. Manual of antimicrobial susceptibility testing. (C. Ed.) Coyle, M. B. ASM. 236 p.
- Chet, I., A. Ordentlich, R. Shapira, and A. Oppenheim. 1990. Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by rhizobacteria. *Plant and soil.* 129: 85-92.
- Clarkson, J. P. and J. A. Lucas. 1997. The role of antibiotic production by strain of *Pseudomonas fluorescens* in the suppression of *Pseudocercospora herpotrichoides*, the causal agent of eyespot disease of cereals. *J. Appl. Microbiol.* 82: 499-506.
- Conover, R. A., and N. R. Gerhold. 1981. Mixtures of copper and maneb or mancozeb for control of bacterial spot of tomato and their compatibility for control of fungus diseases. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 94:154-156.
- Corbineau, F., and D. Come. 2006. Priming: a technique for improving seed quality. *Seed Testing International.* 132: 38-40.
- De-Bashan L., E., G. Holguin, B. R. Glick y Y. Bashan. 2007. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. In. *Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo.* (Eds.) Ferrera-Cerrato, R., y A. Alarcón. Ed. Trillas, México. 161-215 pp.
- De la roza-Delgado B., A. Martínez F., y A. Argamentería G. 2002. Determinación de materia seca en pastos y forrajes a partir de la temperatura de secado para análisis. *Pastos,* 32: 91-104.
- De Souza, J. T., Weller D. M., and Raaijmakers J. M. 2003. Frequency, diversity, and activity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in dutch take-all decline soils. *Phytopathology.* 93: 54-63.

- Díaz de Villegas, M. E., P. Villa, and A. Frías. 2002. Evaluation of the siderophores production by *Pseudomonas aeruginosa* PSS. Rev. Latinoam. Microbiol. 44: 112-117.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2014. Scientific opinion on the pest categorisation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al. EFSA Journal. 12: 3721. 29 p.
- Eichenlaub, R., and K-H. Gartemann. 2011. The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 49: 445-464.
- El-Hendawy H. H., M. E. Osman, and N. M. Sorour. 2005. Biological control of bacterial spot of tomato caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* by *Rahnella aquatilis*. Microbiol. Res. 160: 343-352
- EnsemblPlants: http://plants.ensembl.org/Solanum_lycopersicum/Info/Index consulta: Mayo, 2015.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2005. EPPO Standards Diagnostics PM 7/42 (1) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. EPPO Bulletin 35: 275-283.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2013. EPPO Standards Diagnostics. PM 7/110 (1). *Xanthomonas* spp. (*Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas vesicatoria*) causing bacterial spot of tomato and sweet pepper. EPPO Bulletin. 43: 7-20.
- Ercolano, M. R., W. Sanseveriano, P. Carli, F. Ferriello, L. Frusciante. 2012. Genetic and genomic approaches for R-gene mediated disease resistance in tomato: retrospects and prospects. Plant Cell. Rep. 31: 973-985.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). Países productores de tomates frescos. 2013. <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/S> consulta: Marzo, 2015.
- Financiera Rural (Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero. 2014. Panorama del jitomate. <http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Panorama%20jitomate%20%28abr%202014%29.pdf> consulta: Febrero, 2015

- Ganeshan, G. and A. M. Kumar. 2006. *Pseudomonas fluorescens*, a potential bacterial antagonist to control plant diseases. Review. J. Plant Interact. 1:123-134.
- Genmedoc (Banques de semences de la méditerranée). 2006. Prácticas de germinación en los bancos de semilla de la red. www.genmedoc.org consulta: Abril, 2015.
- Gleason, M. L., R. D. Gitaitis, and M. D. Ricker. 1993. Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in Eastern North America. Plant Dis. 77 (11): 1069-1076.
- Glick, B. R. 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. Review article. Scientifica. 15p.
- Gross, H., and J. E. Loper. 2009. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. Review. Nat prod. Rep. 26: 1408-1446.
- Haas, D., and C. Keel. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. Annu. Rev. Phytopathol. 41: 117-153.
- Haas, D., and G. Défago. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. Review. Nat. Rev. Microbiol. 3: 307-319.
- Hadas, R., G. Kritzman, F. Klietman, T. Gefen, and S. Manulis. 2005. Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in tomato seeds. Plant Pathol. 54: 643-649.
- Hausbeck, M. K., J. Bell, C. Medina-Mora, R. Podolsky, and D. W. Fulbright. 2000. Effect of bactericides on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomatoes in the greenhouse and on disease development and crop yield in the field. Phytopathology. 90: 38-44.
- Höfte, M., and N. Altier. 2010. Fluorescent pseudomonads as biocontrol agents for sustainable agricultural systems. Res. Microbiol. 161: 464-471.
- Holguín-Peña, R. J., R. C. Vázquez-Juárez, and E. O. Rueda-Puente. 2006. Bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato in the Baja California Peninsula of Mexico. Plant Dis. 90: 1550.

- Houlden, A., T. M. Timms-Wilson, M. J. Day, and M. J. Bailey. 2008. Influence of plant developmental stage on microbial community structure and activity in the rhizosphere of three field crops. *FEMS Microbiol. Ecol.* 65: 193-201.
- ICAMEX (Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria Acuícola y Forestal del Estado de México. Departamento de Investigación Hortícola). 2011. Cultivo de jitomate. http://portal2.edomex.gob.mx/icamex/investigacion_publicaciones/horticola/jitomate/index.htm consulta: Febrero, 2015
- Iqbal, A., and S. Hasnain. 2013. Auxin producing *Pseudomonas* strains: biological candidates to modulate the growth of *Triticum aestivum* beneficially. *Am. J. Plant Sci.* 4: 1693-1700.
- ISU (Iowa state university). 2015. Seed testing laboratory <http://www.seeds.iastate.edu/seedtest/testing.html> consulta: Enero, 2015.
- Jacques, M-A., K. Durand, G. Orgeur, S. Balidas, C. Fricot, S. Bonneau, A. Quillévére, C. Audusseau, V. Olivier, V. Grimault, and R. Mathis. 2012. Phylogenetic analysis and polyphasic characterization of *Clavibacter michiganensis* strains isolated from tomato seeds reveal that nonpathogenic strains are distinct from *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 8388-8402.
- Janisiewicz, W. J., and A. Marchi. 1992. Control of storage rots on various pear cultivars with a saprophytic strain of *Pseudomonas syringae*. *Plant. Dis.* 76: 555-560.
- Jones, J. B., G. H. Lacy, H. Bouzar, R. E. Stall, and N. W. Schaad. 2004. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Syst. Appl. Microbiol.* 27: 755-762.
- Jones, J. B., J. P. Jones, R. E. Stall, and T. A. Zitter. 1991. Compendium of tomato diseases. St. Paul, Minn. APS Press. 73 p.
- Kang, Y., R. Carlson, W. Tharpe, and M. A. Schell. 1998. Characterization of genes involved in biosynthesis of a novel antibiotic from *Burkholderia cepacia* BC11 and their role in biological control of *Rhizoctonia solani*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3939-3947.

- Kapoor, R., Ruchi, A. Kumar, A. Kumar, S. Patil, A. Pratush and M. Kaur. 2012. Indole acetic acid production by fluorescent *Pseudomonas* isolated from the rhizosferic soils of *Malus* and *Pyrus*. RRST. 4: 6-9.
- Karnwal, A. 2009. Production of indole acetic acid by fluorescent *Pseudomonas* in the presence of L-tryptophan and rice root exudates. J. Plant Pathol. 91: 61-63.
- Karrfalt, R. P. 2008. Seed testing. In: The Woody plant seed manual. USDA FS Agriculture Handbook. 97-116 pp.
- Khalid, A., M. Arshad, and Z. A. Zahir. 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. J. Appl. Microbiol. 96: 473-480.
- Kimura, S., and N. Sihna. 2008. Tomato (*Solanum lycopersicum*): A model fruit-bearing crop. Cold Spring Harb. Protoc; doi: 10.1101/pdb.emo105
- Kloepper, J. W., and M. N. Schroth. 1978. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. In Proc. 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, ed. Station de Pathologie Vegetal et Phytobacteriologie, 2: 879-882. Angers, France.
- Lanna, F. R., R. da S. Romeiro, and E. Alves. 2010. Bacterial spot and early blight biocontrol by epiphytic bacteria in tomato plants. Pesq. Agropec. Bras. 45: 1381-1387.
- Lukic, A., R. E. Welty, and G. B. Lucas. 1972. Antifungal spectra of Actinomycetes isolated from tobacco. Antimicrob. Agents Chemother. 1: 363-365.
- Matsumoto, T., and M. Sugano. 2013. 16S rRNA gene sequence analysis for bacterial identification in the clinical laboratory. Review. Rinsho Byori. 61:1107-1115.
- McSpadden Gardener, B. B. 2007. Diversity and ecology of biocontrol *Pseudomonas* spp. in agricultural systems. Phytopathology. 97: 221-226.
- Minz, D., M. Ofek, and Y. Hadar. 2013. 4. Plant rhizosphere microbial communities. In: The Prokaryotes. (eds.) E. Rosenberg *et al.* 57-84 pp.
- Mohite, B. 2013. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. J. Soil Sci. Plant Nutr. 13: 638-649.

- Muñoz R., M., J. R. Altamirano C., J. de D. Trujillo F., G. López C., J. Carmona M., y A. Cruz A. 1995. Desarrollo de ventajas competitivas en la agricultura: el caso del tomate rojo. Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial (CIESTAAM). Universidad Autónoma Chapingo. México. 15-19 pp.
- Narbona E., M. Arista y P. L. Ortiz. Germinación de las semillas del madroño (*Arbutus unedo* L. Ericaceae). 2003. Acta Bot. Malacit. 28:73-78.
- Nascimento, A. R., P. M. Fernandes, L. C. Borges, A. W. Moita, and A. M. Quezado-Duval. 2013. Controle químico da mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial em campo. Hort. Bras. 31: 15-24.
- Niranjan-Raj, S., N. P. Shetty, and H. S. Shetty. 2004. Seed bio-priming with *Pseudomonas fluorescens* isolates enhances growth of pearl millet plants and induces resistance against downy mildew. Int. J. Pest Manage. 50: 41-48.
- Obradovic, A., J. B. Jones, M. T. Momol, B. Balogh, and S. M., Olson, 2004. Management of tomato bacterial spot in the field by foliar applications of bacteriophages and SAR inducers. Plant Dis. 88: 736-740.
- Ormeño-Orrillo E., y D. Zuñiga-Dávila. 1999. Optimización del tiempo de esterilización de soportes basados en suelo y compost en la producción de inoculantes para leguminosas. Revista Peruana de Biología. 6: 181-184.
- Pal, K. K., and B. McSpadden Gardener. 2006. Biological control of plant pathogens. The Plant Health Instructor. APSnet. 25 p.
- Pallai, R., R. K. Hynes, B. Verma, and L. M. Nelson. 2012. Phytohormone production and colonization of canola (*Brassica napus* L.) roots by *Pseudomonas fluorescens* 6-8 under gnotobiotic conditions. Can. J. Microbiol. 58: 170-178.
- Palleroni, N. J. 2010. *Pseudomonas*. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. DOI: 10.1002/9780470688618.taw0062
- Park, J. Y., S. H. Han, J. H. Lee, Y. S. Han, Y. S. Lee, X. Rong, B. B. McSpadden Gardener, H-S. Park, and Y. Ch. Kim. 2011. Draft genome sequence of the biocontrol bacterium *Pseudomonas putida* B001, an oligotrophic bacterium that induces systemic resistance to plant diseases. J. Bacteriol. 193: 6795-6796.
- Patel, J. B. 2001. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. Mol. Diagn. 6(4): 313-321.

- Patten, C. L., and B. R. Glick. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3795-3801.
- Peix, A., M-H. Ramírez-Bahena, and E. Velázquez. 2009. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect. Genet. Evol.* 9: 1132-1147
- Peixoto, A. R. 1997. Controle biológico da murcha bacteriana do tomateiro, por *Pseudomonas* spp. fluorescentes. *Ciência Rural.* 27: 153-160
- Peralta, I. E., and D. M. Spooner. 2005. Morphological characterization and relationships of wild tomatoes (*Solanum* L. Sect. *Lycopersicon*). A Festschrift for William G. D'Arcy. T. B. Croat, V. C. Hollowell and R. C. Keating, Missouri Botanical Garden Press. 104: 227-257.
- Pérez C. N. 2004. Control biológico de patógenos vegetales en: Manejo Ecológico de plagas. CEDAR. Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural. La Habana, Cuba. 231-254 pp.
- Petruzzi H., J., N. P. Stritzler, C. M. Ferri, J. H. Pagella, y C. M. Rabotnikof. 2005. Determinación de materia seca por métodos indirectos: utilización del horno a microondas. *Boletín de divulgación Técnica.* No. 88. 4 p.
- Productores de hortalizas. 2006. Plagas y enfermedades del tomate. Guía de identificación y manejo. Suplemento especial. 23 p.
- Raaijmakers, J. M., M. Vlami, and J. T. De Souza. 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 81: 537-547.
- Ramírez R., S., F. J. Osuna C., J. M. P. Vázquez A., J. D. Bustamante O., J. Canul K. y T. Ocampo O. 2009. Plagas y enfermedades del jitomate cultivado en invernaderos y bioespacios del Estado de Morelos. Folleto técnico No. 37. INIFAP. 79 p.
- Rao, M. S. L., S. Kulkarni, S. Lingaraju, and H. L. Nadaf. 2009. Bio-priming of seeds: a potential tool in the integrated management of *Alternaria* blight of sunflower. *HELIA.* 32: 107-114.
- Reetha, S., G. Bhuvaneshwari, P. Thamizhiniyan, and T. R. Mycin. 2014. Isolation of indole acetic acid (IAA) producing rhizobacteria of *Pseudomonas fluorescens* and

- Bacillus subtilis* and enhance growth of onion (*Allium cepa* L.). Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 3: 568-574.
- Ritchie, D. F. 2000. Bacterial spot of pepper and tomato. The Plant Health Instructor. APS.
(<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/prokaryotes/Pages/Bacterialspt.aspx>) Marzo, 2015.
- Rodicio M., R. y M. C. Mendoza. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 22: 238-245.
- Rodrigues, J. L. M., M. E. Silva-Stenico, J. E. Gomes, J. R. S. Lopes, and S. M. Tsai. 2003. Detection and diversity assessment of *Xylella fastidiosa* in field-collected plant and insect samples by using 16S rRNA and *gyrB* secuencias. Appl. Environ. Microbiol. 69: 4249-4255.
- Saber, F. M. A., A. A. Abdelhafez, E. A. Hassan, and E. M. Ramadan. 2015. Characterization of fluorescent pseudomonads isolates and their efficiency on the growth promotion of tomato plant. Ann. Agric. Sci. Xxx:1-10.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2010. Monografía de cultivos. Jitomate. Subsecretaría de fomento a los agronegocios. 10 p.
- Salehzade, H., M. I. Shishvan, M. Ghiyasi, F. Forouzin and A. A. Siyahjani. 2009. Effect of seed priming on germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.) Res. J. Biol. Sci. 4: 629-631.
- Sarwar, M., and R. J. Kremer. 1995. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. Lett. Appl. Microbiol. 20: 282-285.
- Schaad, N.W., J. B. Jones, and W. Chun. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3^a Ed. St. Paul, Minn. APS Press. 773 p.
- Scher, F. M. 1986. Biological control of fusarium wilts by *Pseudomonas putida* and its enhancement by EDDHA. In: Iron, siderophores, and plant diseases. (ed.) T. R. Swinburne. Plenum Press, New York. 117: 109-117 pp.
- Schwyn, B., and J. B. Neilands. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal. Biochem. 160: 47-56.

- SENASICA-SAGARPA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria-Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2013. Lista de plagas reglamentadas en México y su sinonimia. 213 p.
- Shah-Smith, A., and R. G. Burns. 1997. Shelf-life of a biocontrol *Pseudomonas putida* applied to sugar beet seeds using commercial coatings. *Biocontrol Sci. Technol.* 7: 65-74.
- Sharma, D., S. K. Gupta, and K. Jarial. 2011. Studies on the inheritance pattern of bacterial spot (*Xanthomonas vesicatoria*) in tomato. *Indian Phytopath.* 64: 128-130.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). Cierre de la producción agrícola por estado. Tomate rojo (jitomate) Año 2013. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/> consulta: Marzo, 2015.
- Smalla, K., G. Wieland, A. Buchner, A. Zock, J. Parzy, S. Kaiser, N. Roskot, H. Heuer, and G. Berg. 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4742-4751.
- Srinivasa, C., U. Sharanaiah, and C. Shivamallu. 2012. Molecular detection of plant pathogenic bacteria using polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 44: 217-223.
- Tenover, F. C. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am. J. Med.* 119: S3 - S10.
- Thomashow, L. S. 1996. Biological control of plant root pathogens. *Environ. Biotechnology. Curr. Opin. Biotechnol.* 7: 343-347.
- Tlapal B., B. 2008. Enfermedades fungosas y bacterianas en el cultivo del tomate (*Solanum esculentum*). En: Jitomate: tecnología para su producción en invernadero. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México. México. 65-94 pp.
- Tsiantos, J. 1987. Transmission of bacterium *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* by seeds. *J. Phytopath.* 119:142-146.

- Uribe D., E. Ortiz, M. Portillo, G. Bautista y J. Cerón. 2012. Diversidad de pseudomonas fluorescentes en cultivos de papa de la region cundiboyacense y su actividad antagonista *in vitro* sobre *Rhizoctonia solani*. Revista Colombiana de Biotecnología. 2: 50-58.
- Vansteekelenburg, N. A. M. 1985. Resistance to *Corynebacterium michiganense* in tomato genotypes. Euphytica. 34: 245-250.
- Vidhyasekaran, P., and M. Muthamilan. 1995. Development of formulations of *Pseudomonas fluorescens* for control of chickpea wilt. Plant Dis.79: 782-786.
- Wachsman. M. B. y M. C. Degrossi. Problemas en el desarrollo de antimicrobianos: emergencia de mecanismos de resistencia disponible en. http://www.ub.edu.ar/revistas_digitales/Ciencias/Vol6Numero3/articulos.htm Mayo, 2015
- Walsh, U. F., J. P. Morrissey, and F. O'Gara. 2001. *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. Environ. Biotechnology. Curr. Opin. Biotechnol. 12: 289-295.
- Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol. 173: 697-703.
- Weller, D. M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 26:379-407.
- Weller, D. M. 2007. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. Symposium The nature and application of biocontrol microbes III: *Pseudomonas* spp. Phytopathology 97: 250-256.
- Weller, D. M., J. M. Raaijmakers, B. B. McSpadden Gardener, and L. S. Thomashow. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 40:309-348
- Wilson, M., H. L. Campbell, P. Ji, J. B. Jones, and D. A. Cuppels. 2002. Biological control of bacterial speck of tomato under field conditions at several locations in North America. Phytopathology. 92:1284–1292.
- Yang, Ch., and D. E. Crowley. 2000. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. Appl. Environ. Microbiol. 66: 345-351.