



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO DE FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA**

**POBLACIONES BACTERIANAS NATIVAS RIZOSFERICAS
DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.) CON POTENCIAL
ANTAGONISTA CONTRA *Phytophthora parasitica* AISLADAS
EN LA COMUNIDAD DE TECOANAPA, GUERRERO**

MAGNOLIA MELÉNDEZ MONROY

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2015

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

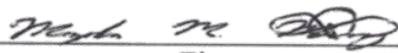
En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe MAGNOLIA MELÉNDEZ MONROY,

Alumno de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor SERGIO ARANDA OCAMPO, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis POBLACIONES BACTERIANAS NATIVAS RIZOSFERICAS DE JAMAICA (HIBISCUS SABDARIFFA L.) CON POTENCIAL

ANTAGONISTA CONTRA PHYTOPHTHORA PARASITICA AISLADAS EN LA COMUNIDAD DE TECOANAPA, GUERRERO

y de los producto de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre el colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 26 de MAYO de 2015


Firma


DR. SERGIO ARANDA OCAMPO
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **POBLACIONES BACTERIANAS NATIVAS RIZOSFERICAS DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.) CON POTENCIAL ANTAGONISTA CONTRA *Phytophthora parasitica* AISLADAS EN LA COMUNIDAD DE TECOANAPA, GUERRERO**, realizada por la alumna: **Magnolia Meléndez Monroy**, bajo la dirección del Consejo Particular indicada ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



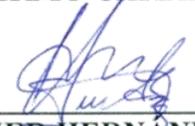
DR. SERGIO ARANDA OCAMPO

ASESOR:



DR. GUILLERMO CARRILLO CASTAÑEDA

ASESOR:



DR. JAVIER HERNÁNDEZ MORALES

ASESOR:



M.C. LUIS EMILIO CASTILLO MÁRQUEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Junio de 2015

**POBLACIONES BACTERIANAS NATIVAS RIZOSFERICAS DE
JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.) CON POTENCIAL ANTAGONISTA
CONTRA *Phytophthora parasitica* AISLADAS EN LA COMUNIDAD DE
TECOANAPA, GUERRERO**

**Magnolia Meléndez Monroy, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2015.**

RESUMEN

Las comunidades microbianas en la rizósfera son importantes en la nutrición y sanidad de las plantas. En esta investigación se estudiaron las poblaciones bacterianas cultivables nativas en la rizósfera de jamaica en los estados fenológicos de la planta: Crecimiento inicial, desarrollo de botones florales y floración, en cinco localidades del municipio de Tecoaapa, Guerrero, con el objetivo de caracterizar fenotípica y genotípicamente rizobacterias antagonistas *in vitro* contra *Phytophthora parasitica*. La densidad de población bacteriana total en la rizósfera estuvieron en intervalos de log 3.50 y 6.56 UFC g⁻¹ de raíz. El estudio comparativo de los cinco sitios mostró que el promedio de UFC·g⁻¹ de raíz en la etapa de Crecimiento inicial fue estadísticamente mayor ($p>0.05$) y que el Magnesio ($\rho=0.9293$) y el Fósforo en el suelo ($\rho=0.8089$) tienen una correlación significativa con los valores de UFC. El antagonismo *in vitro* de 450 aislados bacterianos se evaluó frente a *P. parasitica* mediante ensayos de confrontación dual y se seleccionaron las 18 cepas bacterianas con el mayor grado de antagonismo. La caracterización cualitativa de estas para la producción de metabolitos *in vitro* mostró que el 100% de ellas expresaron actividad lipolítica y proteolítica, el 88.88% produjeron sideróforos, el 44.4% produjeron ácido indol-3-acético y el 72.22% solubilizaron fosfatos, de las cuales 6 cepas expresaron las 5 actividades relacionadas con el antagonismo y/o promotores de crecimiento. Las cepas (n=18) se identificaron por PCR mediante la amplificación y secuenciación de la región 16S rADN con los iniciadores 27F y 1492R resultando dentro de los géneros *Serratia*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*. Se han caracterizado e identificado bacterias antagonistas *in vitro* a *P. parasitica* con alto potencial como agente de biocontrol y promotores del crecimiento y representa el primer estudio de las comunidades bacterianas cultivables nativas en la rizósfera de jamaica.

Palabras clave: *Hibiscus sabdariffa*, *Phytophthora parasitica*, rizobacterias antagonistas, caracterización *in vitro*.

NATIVE JAMAICAN (*Hibiscus sabdariffa* L.) RHYZOPHERIC BACTERIAL POPULATION WITH ANTAGONISTIC POTENTIAL TO *Phytophthora parasitica* AGAINST ISOLATED IN TECOANAPA, GUERRERO.

**Magnolia Meléndez Monroy, M.Sc.
Colegio de Postgraduados, 2015.**

SUMMARY

Microbial communities in the rhizosphere are important in the nutrition and plant health. In this research we studied the culturable native bacterial populations in the rhizosphere of jamaica in the growth state of plant: initial growth, development of flower and bloom buttons in five villages of the municipality of Tecoanapa, Guerrero, in order to characterize phenotypic and genotypic antagonist rhizobacteria *in vitro* against *Phytophthora parasitica*. The total bacterial population density in the rhizosphere intervals were 3.50 and 6.56 log CFU g⁻¹ root. The comparative study of the five sites showed that the average CFU ·g⁻¹ root at the stage of initial growth was statistically greater (p> 0.05), and Magnesium (p = 0.9293) and Phosphorus in the soil (p = 0.8089) have a significant correlation with the values of UFC. The *in vitro* antagonism of 450 bacterial isolates was evaluated against *P. parasitica* by dual confrontation tests, and 18 bacterial strains with the highest degree of antagonism were selected. The qualitative characterization of these, for the production of metabolites *in vitro* showed that 100% of them expressed lipolytic and proteolytic activity, 88.88% produced siderophores, 44.4% produced indol-3-acetic acid and 72.22% solubilized phosphates, including 6 strains that expressed the 5 activities related with antagonism and / or growth promoters. The strains (n = 18) were identified by PCR amplification and sequencing of 16S rDNA region with primers 27F and 1492R resulting within the genera *Serratia*, *Pseudomonas* and *Stenotrophomonas*. *In vitro* antagonistic bacteria against *P. parasitica* have been characterized and identified with high potential as a biocontrol agent and growth promoters. This represents the first study of native cultivable bacterial communities in the rhizosphere of jamaica.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa*, *Phytophthora parasitica*, antagonist rhizobacteria, *in vitro* characterization.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado para llevar a cabo mis estudios de Maestría en Ciencias en Fitosanidad- Fitopatología.

Al Colegio de Postgraduados (COLPOS) por brindarme su hospitalidad y los recursos necesarios para realizar el proyecto.

A los miembros de mi consejo particular por el tiempo dedicado a la revisión del trabajo, sus valiosas aportaciones y sugerencias.

Al Dr. Sergio Aranda Ocampo, por haber confiado en mí, por la paciencia y apoyo incondicional que me brindó en los momentos críticos, por otorgarme su valioso conocimiento y guiarme en el trabajo de investigación para cumplir con la meta.

Al Dr. Guillermo Carrillo Castañeda por sus valiosas aportaciones y ayuda en todo momento para cumplir con los objetivos de la investigación.

Al Dr. Javier Hernández Morales por su valioso apoyo y participación.

Al M.C. Luis Emilio Castillo Márquez por su colaboración y asesoramiento.

Al M.C. Lauro Soto Rojas por su valiosa aportación.

Al C. Carlos Martínez López por todo el apoyo brindado, los consejos y por su valiosa amistad.

Al M.C. Vicente Santacruz por sus consejos y por su gran apoyo brindado.

A mis amigos: Fabiola Esquivel, Berenice List, Lilia López, Mayra Guerrero, Martín Aquino, Malinalli Campos, Álvaro Martínez, Juan Sandoval, Omar Chávez, por su gran apoyo brindado y por estar siempre que los necesito.

A mis nuevos amigos con los que compartimos momentos agradables: Ana María Ayala, Miriam Mezo, Linda Luz Esparza, Lourdes Porfirio, Esmeralda Juárez, Christian Alvarado, René Robles, Hermelindo Pérez, Magdalena Cerón, Dulce Flores, Ángel Ríos, Ricardo E. Castro, Hanzel Barro, Héctor Ortiz, Santo Ángel, Fanny Hernández.

DEDICATORIAS

A Dios, por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida. Por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorarlo cada día más y agradecerle por la vida extraordinaria que me ha brindado.

A mi hijo Joshua Fernando, por llegar en el momento preciso y ser el motor para seguir adelante.

A mi mami Gloria Monroy Xolalpa, por apoyarme incondicionalmente durante mi trayecto estudiantil y ser el ejemplo para no desfallecer, ni rendirme ante nada.

A mi padre Edgar Meléndez Bonilla, por apoyarme para culminar esta etapa y darme palabras de aliento para alcanzar mis metas.

A mis hermanas Susy y Fanny por su apoyo incondicional, por estar en las buenas y las malas, por darme ánimos para seguir adelante, las quiero mucho.

A mis sobrinos: Ximena Alelí, Aitana Shaday, Fátima Lizet y Sebastián, con mucho amor y cariño les dedico este trabajo para que se motiven a seguir adelante.

A Rubén Cabello Martínez y Celia Tenorio Martínez, por ser un ejemplo para seguir adelante y por el apoyo que me brindaron siempre, los quiero mucho.

A mis tíos: Luis Espinoza, Teresa del Niño de Jesús, Guillermina Monroy, Rosa Meléndez, Mercedes Meléndez y Araceli Meléndez, por el apoyo y los consejos brindados.

A mi amigo Juan Sandoval López, por sus valiosos consejos en momentos oportunos, por compartir momentos de alegría, tristeza y demostrarme que siempre podré contar con él.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Pág.

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	3
2.1. Objetivo General.....	3
2.2. Objetivos específicos	3
2.3. Hipótesis.....	3
3. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
3.1 El cultivo de jamaica.....	4
3.1.1 Origen del cultivo de la jamaica.....	4
3.1.2 Descripción botánica.....	4
3.1.3 Requerimientos del cultivo.....	6
3.1.4 Composición química de la jamaica.....	6
3.1.5 Superficie del cultivo.....	7
3.1.6 Plagas y enfermedades del cultivo de la jamaica.....	8
3.1.6.1 <i>Phytophthora sp.</i>	9
3.1.6.2 <i>Phytophthora parasitica</i> Dauster como agente causal de pata prieta de la jamaica.....	10
3.1.6.3 Morfología y epidemiología de <i>Phytophthora parasitica</i> D.....	12
3.1.6.4 Ciclo de vida.....	13
3.1.6.5 Proceso de infección de <i>Phytophthora parasitica</i> y sistemas de defensa del cultivo de la jamaica.....	14
3.1.6.6 Estrategias de control de la pata prieta de la jamaica.....	15
3.2 Control Biológico.....	16
3.3 La rizósfera.....	17
3.3.1 Mecanismos de control biológico en la rizósfera de las plantas.....	17
4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
4.1 Muestreo de rizósfera del cultivo de jamaica.....	21
4.2 Aislamiento de bacterias y determinación de UFC.....	22
4.3 Antagonismo <i>in vitro</i> contra <i>P. parasitica</i>	23
4.4 Caracterización de metabolitos involucrados en el antagonismo <i>in vitro</i>	23

4.4.1	Producción de ácido indol-3-acético (AIA).....	23
4.4.2	Actividad lipolítica.....	24
4.4.3	Actividad proteolítica.....	24
4.4.4	Determinación de Producción de sideróforos.....	24
4.4.5	Solubilización de fosfato minera.....	25
4.4.6	Identificación de bacterias antagonicas a <i>P. parasitica</i>	25
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
5.1	Densidades de población de bacterias cultivables en la rizósfera de jamaica.....	25
5.2	Antagonismo <i>in vitro</i> contra <i>Phytophthora parasitica</i>	28
5.3	Identificación molecular de los aislamientos bacterianos antagonistas	30
5.4	Caracterización en la producción de metabolitos <i>in vitro</i> de bacterias de la rizósfera de jamaica contra <i>P. parasitica</i>	35
5.5	Producción de ácido indol-3- acético (AIA).....	36
5.6	Actividad lipolítica.....	37
5.7	Actividad proteolítica.....	38
5.8	Producción de sideróforos.....	38
5.9	Solubilización de fosfatos minerales.....	40
6	CONCLUSIONES.....	40
7	LITERATURA CITADA.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Síntomas de la enfermedad. Marchitez súbita de la planta (a), Caída prematura de hojas (b), Pudrición a la altura del cuello y parte subterránea del tallo (c).	11
Figura 2. Ciclo de vida de <i>P. parasitica</i>	13
Figura 3. Aislamiento de bacterias de la rizósfera. Obtención de raíces (a), Suspensión de rizósfera (b), Agitador orbital (c), Ultrasonido (d). Dilución de la suspensión (e), Siembra en medio R2A (f), Siembra en B de King ⁺⁺⁺ (g).....	22
Figura 4. Antagonismo <i>in vitro</i> de bacterias aisladas de la rizósfera de Jamaica. Testigo de <i>P. parasitica</i> en medio Waksman (a), Inhibición del crecimiento de <i>P. parasitica</i> ante bacterias antagonicas (b).....	23
Figura 5. UFC·g raíz ⁻¹ por etapa fenológica y sitio de muestreo. Valores con diferente letra son significativamente diferentes (Tukey's HSD; $p \leq 0.0001$).....	27
Figura 6. Producción de sideróforos (halos amarillentos).....	38

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Estados Productores (Superficie sembrada en ha y rendimiento ton/ha).....	7
Cuadro 2. Ubicación de las localidades de estudio en el Municipio de Tecoaapa, Guerrero.....	21
Cuadro 3. Características fisicoquímicas de los suelos de las cinco regiones muestreadas.....	28
Cuadro 4. Halo de inhibición <i>in vitro</i> de las 18 cepas bacterianas e identificación de bacterias fluorescentes.....	29
Cuadro 5. Identificación mediante secuenciación del gen 16s ADNr de las 18 bacterias antagónicas a <i>P. parasitica</i>	30
Cuadro 6. Distribución taxonómica de las 18 bacterias antagonistas contra <i>P. parasitica</i>	30
Cuadro 7. Caracterización en la producción de metabolitos de 18 cepas bacterianas antagonistas vs <i>P. parasitica</i> aisladas de rizósfera de jamaica.....	35

1. INTRODUCCIÓN

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es una planta perteneciente a la familia de las Malváceas, es nativa de África tropical desde Egipto y Sudán hasta Senegal, incluyendo a Malawi, Mozambique, Zambia y Zimbabwe (Rendón, 1992; Serrano, 2008). También es conocida como serenat, aleluya, flor de jamaica, agria de Guinea y rosella (Patiño, 1975). El potencial de este cultivo radica en su consumo en forma de bebida obtenida a partir de los cálices de esta planta y en diversas propiedades fitoquímicas, farmacológicas y nutricionales de especial interés en la salud y nutrición humana, además de diversas aplicaciones en la industria de alimentos (Ali *et al.*, 2005; Sayago-Ayerdi *et al.*, 2007). Debido a sus propiedades, sobre todo medicinales, se ha distribuido a otras partes tropicales del mundo como México, América Central, América del Sur, Sureste Asiático, incluyendo el sur de China, lugares en los que ha alcanzado gran importancia económica (Serrano, 2008). En México, fue introducida por los españoles a principios del siglo XVII y a finales del siglo XVIII. Actualmente se cultiva en regiones tropicales cálidas y semicálidas de los estados de Guerrero, Oaxaca, Nayarit, Campeche y otros de menor importancia (Rojas, 1999; Patiño, 1975).

México se encuentra entre los 10 principales países productores de jamaica; a nivel nacional los principales productores son los estados de Guerrero, Oaxaca, Nayarit, Michoacán, Campeche, Colima, Jalisco, Puebla y Veracruz (SIAP, 2010). En este contexto, Guerrero cuenta con una superficie de cultivo de aproximadamente 15 mil hectáreas bajo condiciones de temporal asociadas con maíz, ubicadas en la Costa Chica, constituyendo la zona de cultivo de jamaica de mayor importancia en el país; por lo anterior, este cultivo es conocido en esta zona como “Oro rojo” (Torral-Flores *et al.* 2005). En el estado de Guerrero, una de las limitantes fitosanitarias más importantes para el óptimo desarrollo del cultivo de jamaica es el patógeno de la raíz *Phytophthora parasitica* Dastur., agente causal de la enfermedad conocida como “pata prieta de la jamaica”. Crane (1943) citó que el patógeno *Phytophthora parasitica* es el causante de la enfermedad más importante que afecta el cultivo de jamaica, demeritando en mayor medida su calidad y rendimiento. En México, Hernández y Romero (1990) aislaron e identificaron a esta misma especie del patógeno en plantas de jamaica procedentes del estado de Guerrero; cuyos síntomas evidenciaron una pudrición basal negra, que gradualmente se une al tejido vivo por medio

de una zona no definida, extendiéndose hacia arriba a una altura de 30 a 35 cm, síntomas típicos de la enfermedad denominada “pata prieta”, previamente descritos por Crane (1943).

En la actualidad la única estrategia de manejo para controlar esta enfermedad es el uso de insumos químicos y variedades resistentes; sin embargo, en la actualidad no existen variedades de jamaica completamente resistentes a la enfermedad y/o fungicidas efectivos para su óptimo manejo, por lo que es necesario buscar nuevas estrategias eficientes y sostenibles que sean medioambientalmente respetuosas para el control de esta enfermedad. Una de estas estrategias puede ser el uso de antagonistas microbianos del patógeno como agentes de biocontrol, la cual puede ser considerada una alternativa o una vía complementaria para reducir el uso de productos químicos en la agricultura (Berg *et al.*, 2005; Paulin *et al.*, 2009). En investigaciones previas, se ha documentado que las plantas cultivadas han desarrollado una estrategia de estimular y promover el desarrollo de grupos específicos de microorganismos antagonistas autóctonos como primera línea de defensa contra patógenos del suelo (Landa *et al.*, 2006). Por lo tanto, el sistema radical de la planta es un importante nicho de microorganismos que pueden constituir un reservorio inexplorado de antagonistas contra patógenos de plantas. Particularmente, las bacterias asociadas a las plantas que muestran propiedades antagonistas pueden ser encontradas en la rizósfera de las mismas. Diversas investigaciones han demostrado que las comunidades bacterianas en la rizósfera de muchas especies de plantas producen un efecto benéfico en el crecimiento y sanidad de las mismas tanto directa como indirectamente, y que estas comunidades bacterianas están fuertemente influenciadas por la especie de la planta y viceversa (Ahn *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2005). Lo anterior demuestra que estas comunidades bacterianas autóctonas podrían ser consideradas una fuente importante de nuevos aislados microbianos tales como los involucrados en la fijación de nitrógeno, producción de fitohormonas y componentes antimicrobianos, promoción del crecimiento e inducción de resistencia sistémica en la planta, que podrían ser utilizados para futuras aplicaciones biotecnológicas como el desarrollo de agentes de control biológico de organismos fitopatógenos o para el aislamiento de nuevos compuestos bioactivos (Méndez *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2004).

Actualmente existen escasas investigaciones tanto a nivel regional como nacional que hayan abordado el estudio de las comunidades bacterianas en el sistema radical de la jamaica. Por lo anterior, esta investigación se centró en el estudio de las poblaciones bacterianas cultivables de la rizósfera del cultivo de jamaica en diferentes localidades del estado de Guerrero con potencial antagonista contra *P. parasitica*.

2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Objetivo General

Caracterizar e identificar mediante un enfoque polifásico poblaciones bacterianas nativas a partir de la rizósfera de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) con potencial como inoculante microbiano para el manejo de *Phytophthora parasitica*.

2.2 Objetivos específicos

- 1.- Examinar mediante un enfoque cultivo dependiente la estructura poblacional de bacterias nativas en la rizósfera del cultivo de jamaica en el municipio de Tecoaapa, Guerrero
- 2.- Evaluar el potencial antagonista *in vitro* contra *P. parasitica* de las poblaciones bacterianas obtenidas a partir de la rizósfera del cultivo de jamaica
- 3.- Caracterizar las poblaciones bacterianas mediante la producción de metabolitos secundarios *in vitro* involucrados en el antagonismo
- 4.- Conformar una colección de poblaciones bacterianas nativas de la rizósfera de jamaica con potencial como inoculantes microbianos para el manejo de *P. parasitica* en el municipio de Tecoaapa.

2.3 Hipótesis

En la rizósfera de jamaica, existen poblaciones bacterianas cultivables, nativas y bien adaptadas, con alto potencial como antagonistas e inoculantes microbianos contra *P. parasitica*, agente causal de la enfermedad pata prieta en el cultivo de jamaica.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 El cultivo de la jamaica

3.1.1 Origen del cultivo de la jamaica

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es una planta perteneciente a la familia de las Malváceas, su origen aún no ha sido definida con exactitud, sin embargo, Patiño (1975), reporta que es originaria de la India, mientras que Rendón (1992) y Serrano (2008) citan que es nativa de África tropical, desde Egipto y Sudán hasta Senegal, incluyendo a Malawi, Mozambique, Zambia y Zimbabwe. Esta planta también es conocida como serenat, aleluya, flor de jamaica, agria de Guinea y rosella (Patiño, 1975). Debido a sus propiedades, sobre todo medicinales, se ha distribuido a otras partes tropicales del mundo como México, América Central, América del Sur, Sureste Asiático, incluyendo el Sur de China, lugares en los que ha alcanzado gran importancia económica (Serrano, 2008).

En México, esta planta fue introducida por los españoles a principio del siglo XVII y a finales del siglo XVIII. Actualmente se cultiva en regiones tropicales cálidas y semicálidas de los estados de Guerrero, Oaxaca, Nayarit, Campeche y otros de menor importancia (Rojas, 1999; Patiño, 1975). El potencial de este cultivo radica en su consumo en forma de bebida, la cual es obtenida a partir de los cálices de esta planta, y en sus diversas propiedades fitoquímicas, farmacológicas y nutricionales; propiedades que son de especial interés en la salud y nutrición humana, y en diversas aplicaciones en la industria de alimentos (Ali *et al.*, 2005; Sayago-Ayerdi *et al.*, 2007). Los tallos son utilizados para producir pulpa para papel o fibra textil, también son importantes en la producción de un mucílago que se utiliza en la industria de los cosméticos y las hojas pueden usarse como verduras en forma directa (Contreras *et al.*, 2009). Los cálices de los frutos se utilizan para bebidas, ates, mermeladas, jaleas, dulces, jarabes, salsas. Las semillas son útiles para extracción de aceite o alimentos balanceados para animales ya que contienen un 20% de proteína (Contreras *et al.*, 2009).

3.1.2 Descripción botánica

La jamaica es una planta hermafrodita, anual o bianual, herbácea o subarborescente de 0.5 m a 3.0 m de altura, con tallos lisos y con frecuencia leñosos en su base, de color morado,

rojo brillante y verde. Las hojas son simples, alternas, deciduas; ovadas o lanceoladas-oblongas, no divididas o divididas en tres o cinco lóbulos, ápice truncado hasta cuneado, con márgenes dentados o serrados, de color verde en ambos lados; envés con una glándula característica en su base; pecíolos largos; estipulas deciduas.

Forma un cáliz con cinco lóbulos profundos, forma regular, de 1.2 cm a 4.0 cm de largo, adquiriendo características carnosas después de la anthesis y su nervadura central marcada, con una glándula característica en la base de cada lóbulo, pubescencia fina en el interior de los lóbulos; el epicáliz y el cáliz pueden ser de un rojo brillante, verde o casi blancos, dependiendo de la variedad; pedúnculo corto (Rendón, 1992).

Presenta flores solitarias, axilares, perfectas, zigomorfas; epicáliz con más de diez brácteas pequeñas, delgadas, fusionadas en su base con el tubo del cáliz. La corola con los pétalos adheridos al tubo estaminal recto; pétalos de color amarillo pálido, con el centro rojo oscuro cuando el tallo es rojo y un centro amarillo para la forma de tallo verde, ovados, carnosos en su base; la columna estaminal formada por cinco grupos de estambres unidos casi desde su base, de color morado; estilo delgado, con un estigma de cinco lóbulos, rodeado por los estambres, excediendo al androceo; ovario súpero con placentación axial.

Los frutos son capsulas ovoides, obtusos, ligeramente pilosos, con numerosas semillas, abriéndose en cinco partes cuando maduran. Hay de tres a cuatro semillas reniformes en cada celda.

De acuerdo con USDA-ARS (2013), la clasificación botánica de la jamaica es como se especifica a continuación:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Rosopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Malvales

Familia: Malvaceae

Subfamilia: Malvoideae

Tribu: Hibisceae

Género: *Hibiscus*

Especie: *sabdariffa*

3.1.3 Requerimientos del cultivo

La planta de jamaica se desarrolla en climas tropicales y subtropicales, normalmente se limita a las latitudes entre los 35°N y 25°S, a una altitud de 900 sobre el nivel del mar (msnm) (ecocrop.fao.org). Le favorece un clima cálido con temperatura óptima alrededor de 25°C, y una lluvia mínima de 400 a 500 mm distribuidos durante el período vegetativo de 4 a 5 meses. Debido a su sensibilidad al fotoperiodo, la jamaica se limita a regiones inferiores a 25° de latitud. Para la reproducción se requiere un período de oscuridad mínima de 11.5 horas, la inducción floral ocurre con 12.5 – 13.5 horas luz-día, al mismo tiempo termina el crecimiento apical; por su sensibilidad al fotoperiodo, la jamaica florea mejor cuando la longitud del período luminoso del día es menor de 12 horas; sin embargo, durante las etapas tempranas del período vegetativo se requiere 13 horas día de luminosidad para que no se produzca una floración prematura (Augstburger *et al.*, 2000; Talukdar, 1952).

La jamaica crece bien en la mayoría de los suelos con buen drenaje y tolera suelos con limitaciones físicas y químicas, prefiere suelos de textura media con una profundidad de 50-150 cm de capa arable, salinidad de menos de 4.0 mmhos/cm de conductividad eléctrica, nivel moderado de fertilidad natural y un rango de pH de 6.0 -7.8 (Contreras *et al.*, 2009).

3.1.4 Composición química de la jamaica

El análisis químico de la jamaica ha revelado la presencia de fitosteroles, flavonoides, saponinas, carbohidratos, ácido ascórbico y una mezcla de ácido cítrico y málico. Se han identificado diversos pigmentos extraídos de las flores entre los cuales se encuentran la gosipetrina, quercetina, mirecetina, hibiscetina, hibiscetrina y sabderitina; la hibiscetina y la gosipetrina se usan como base natural de jarabes y licores coloridos. Sin embargo, se consideran como los principales pigmentos de esta planta a las antocianinas: la cianidina-3-glucósido y la delfinidina-3-glucósido, que tienen propiedades antioxidantes y que no presenta actividad tóxica, ni mutagénica. Se ha demostrado que los compuestos fenólicos (como el ácido protocatecuico) aislados de la flor de esta planta tienen fuertes propiedades

antioxidantes (Carvajal *et al.*, 2006). El cáliz de la jamaica deshidratado contiene 4% de ácido cítrico, 1.5% de pigmentos, 6.9% de proteína y 9% de sólidos solubles a un pH de 2.7. La proporción de las antocianinas de esta planta son delfinidina (70.9%) y cianidina (29%) (Gassama-Dia *et al.*, 2004).

3.1.5 Superficie del cultivo

En la actualidad, el cultivo de la jamaica se ha desarrollado y adaptado principalmente en zonas tropicales y subtropicales en diversas partes del mundo. Los mayores productores de jamaica en el mundo son Tailandia, Sudan, China, México y en menor escala Egipto, Senegal, Tanzania, Malí y Jamaica (Contreras *et al.*, 2009).

México se encuentra entre los 10 principales países productores de jamaica con una superficie de 14,744 ha cultivadas. Los principales productores son los estados de Guerrero, Oaxaca, Nayarit, Michoacán, Campeche, Colima, Jalisco, Puebla y Veracruz (SIAP, 2010). Las variedades que predominan son: Jersey, Chiautla, Americana, Tempranilla, Sudan, China Negra, China Roja, Coneja, Vallarta, Colima y Guerrero (Fundación Produce Guerrero, 2004). En el estado de Guerrero, se estima que dependen aproximadamente 6 mil familias del cultivo de jamaica (Navarro, *et al.*, 2002). En este contexto, Guerrero cuenta con una superficie de cultivo de aproximadamente 15 mil hectáreas bajo condiciones de temporal asociadas con maíz, ubicadas en la Costa Chica, constituyendo la zona de cultivo de jamaica de mayor importancia, de ahí que se le conozca en esta zona como “Oro rojo” (Toral-Flores *et al.*, 2005).

La producción y rendimiento del cultivo de jamaica a nivel estatal en México se presenta en orden de importancia en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Estados Productores (Superficie sembrada en ha y rendimiento ton/ha)

Ubicación	Sup. Sembrada (Ha)	Sup. Cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	Precio del Medio Rural (PMR) (\$/Ton)	Valor Producción (Miles de Pesos)
GUERRERO	14,744.50	14,744.50	3,794.13	0.26	13,382.77	50,775.97
OAXACA	2,398.50	2,398.50	781.64	0.33	36,571.83	28,586.00
MICHOACAN	685	685	280.34	0.41	39,212.93	10,992.95
NAYARIT	510.5	510.5	277.36	0.54	53,866.82	14,940.50

PUEBLA	359	359	179.32	0.5	49,652.86	8,903.75
CAMPECHE	209	209	64.95	0.31	22,666.13	1,472.16
COLIMA	90	90	74.25	0.82	38,080.81	2,827.50
VERACRUZ	17	17	11.78	0.69	38,240.25	450.47
JALISCO	7	7	5.5	0.79	66,776.73	367.27
TOTAL	19,020.50	19,020.50	5,469.27	0.29	21,815.82	119,316.58

Fuente: SIAP, 2010

3.1.6 Plagas y enfermedades del cultivo de jamaica

Una de las limitantes para la producción del cultivo de la jamaica es el daño ocasionado por plagas y enfermedades. Entre las principales plagas que afectan al cultivo se encuentran las siguientes:

Hormiga arriera (*Atta* sp), es una hormiga de color café rojizo de 0.5 a 1.0 cm. de largo; durante el primer mes de su cultivo la jamaica es muy sensible al ataque de la hormiga arriera, la cual defolia las plántulas dejando solamente varetas. (Hernández y Romero, 1990; Contreras *et al.*, 2009). El ataque a plantas pequeñas causa hasta un 90% de pérdidas en rendimiento. En plantas grandes provoca severo daño foliar, repercutiendo en una baja producción de cálices (Navarro *et al.*, 2009).

Grillo (*Achaeta assimilis* Fabr.). Esta plaga ataca a la jamaica en estado de plántula durante los primeros 15 días después de la emergencia, cortándolas desde la base del tallo. En daños severos de esta plaga, llega a reducir la sobrevivencia de la plántula y en consecuencia se hace necesaria la resiembra (Contreras *et al.*, 2009).

Oruga espinosa del algodón (*Earias biplaza* Walker, *Earias insulana* Boisduval) causan bastante daño en frutos verdes. La larva de escarabajo voladores (*Podagrica* spp.) se alimenta de las raíces, los adultos dañan a los frutos y puntos de crecimiento. El manchador del algodón (*Dysdercus supersticiosus* Fabr.) succiona los cálices, causando manchas cafés. Daños de *Agrilus acutus* Thumb se caracterizan por lesiones en tallos de aproximadamente 5cm. de longitud, con los que se reduce el movimiento de los nutrientes (Serrano, 2008).

Las enfermedades de raíz y tallos son los principales problemas fitosanitarios en el cultivo de la jamaica, entre las que se encuentran aquellas ocasionadas por *Rhizoctonia solani*, *Pythium perniciosum*, *Fusarium* spp., *Phymatotrichum omnivorum*, *Sclerotium rolfsii* y *Phytophthora parasitica*; todas causando pudriciones en la base del tallo y raíz

(Ramos, citado por Crane, 1943 y Westcott, 1971). De estas enfermedades la más severa es la producida por *Phytophthora parasitica* debido a que es uno de los patógenos más importantes en el mundo. Adenji (1970) señala que en 1968 en Nigeria en pruebas de patogenicidad se mostró que este organismo fue la principal causa de pudrición de tallo y raíz en el cultivo de jamaica. De igual manera, Hadad (1976) y Visarathanonth (1976) señala a *Phytophthora parasitica* como uno de los patógenos más importantes de la jamaica en Indonesia.

Sin embargo, también causan pérdidas de importancia económica las enfermedades foliares como son el oídio, las manchas y pudrición de hojas causadas por *Oidium abelmoschii*, *Cercospora hibisci*, *Coniella musaiensis* var. *hibiscis*, *Microsphaera euphorbiae*, *Phoma sabdariffa*, *Phoma exigua*, *Fusarium nygamai*, *Fusarium camptoceras* y *Rhizoctonia solani* (Persad y Fortune, 1889; Horst, 2008; Eslaminejad y Zakaria, 2011).

Hernández *et al.*, (1987, 1990a, 1990b, 1990c) identificaron a *Meloidogyne arenaria* asociado al agallamiento de raíces de plantas de jamaica en el estado de Guerrero. En estudios histológicos realizados encontraron que el nematodo indujo la formación de células gigantes como consecuencia de la hipertrofia en células parenquimatosas del xilema.

3.1.6.1 *Phytophthora* sp.

El nombre del género *Phytophthora* se deriva de la palabra griega que significa literalmente *Phyto* (planta) y *phthora* (destructor) (Erwin y Ribeiro, 1996). Un gran número de enfermedades en cultivos agrícolas y en bosques son causadas a nivel mundial por el oomicete fitopatógeno *Phytophthora*. A pesar de los avances en el conocimiento de este patógeno, aún continúa causando importantes pérdidas económicas en la agricultura (Erwin y Ribeiro, 1996).

Phytophthora representa uno de los géneros fitopatógenos más devastadores y destructivos en todo el mundo. Es un patógeno del suelo que se encuentra tanto en regiones templadas como tropicales y subtropicales causando graves pérdidas en la producción en un amplio rango de cultivos. Las enfermedades causadas por este patógeno son difíciles de controlar en forma efectiva, por lo que una amplia variedad de métodos de control han sido

estudiadas para su manejo en diversos sistemas agrícolas, incluyendo en su mayoría estrategias de control químico y en el uso de resistencia genética que en muchos casos han resultado en controles poco efectivos. Por lo anterior, resalta la necesidad de explorar otros métodos de control que puedan ser integrados con la resistencia para el manejo de las enfermedades ocasionadas por este patógeno de una forma más eficiente.

3.1.6.2 *Phytophthora parasitica* Dauster como agente causal de pata prieta de la jamaica.

Phytophthora parasitica Dauster es un oomicete de la familia Pythiaceae con esporangios limoniformes y papilados, su micelio es cenocítico, con hifas sinuosas de grosos variables (Newhook *et al*, 1978). Ocasiona el ahogamiento, la pudrición de raíces y la gomosis de los cítricos, la pierna negra del tabaco, la necrosis de la vaina y de los granos del frijol, pudrición radical del ajonjolí, la jamaica y la fresa, la pudrición de frutos del tomate y la berenjena (Zamora y Casin, 1986). Esta especie fue descrita por primera vez por Dauster en 1913, obtenida de la plantas de ricino en la India (Romero, 1988).

Ubicación taxonómica (Alexopoulos *et al.*, 1996)

Reino: Stramenopila

Phylum: Oomycota

Clase: Oomycetes

Orden: Peronosporales

Familia: Pythiaceae

Género: *Phytophthora*

Especie: *P. parasitica* Dauster

Hasta esta fecha, la enfermedad conocida como pudrición basal negra causada por *P. parasitica* Dastur, es considerada de mayor importancia para el cultivo de jamaica (Hadam *et al.*, 1976; Adenji, 1970; Visarahanonth, 1976). Amusa *et al.*, (2005) mencionan a este patógeno como el agente causal de la marchitez vascular de la jamaica en el suroeste de Nigeria. Estos investigadores describen que las plantas afectadas mostraron marchitez

completa en los brotes, lesiones necróticas sobre el tallo, iniciando desde la base del suelo hacia arriba y afectando la mayoría de las ramas.

En México se reporta a *Phytophthora parasitica*, como el causante de la “pata prieta” en el cultivo de jamaica, provocando una pudrición a la altura del cuello y parte subterránea del tallo, que invade frecuentemente las raíces, produce una coloración negro purpúrea que sube al tallo 30 cm por arriba del suelo y ocasiona una marchitez súbita de la planta. La infección avanza hacia la parte superior y produce en ocasiones agrietamientos de la corteza. En el follaje se observa al principio una clorosis que invade todas las hojas ocasionando marchitez, caída prematura de hojas, y en daños severos muerte de planta. La enfermedad se presenta desde que la planta alcanza una altura de 20 cm hasta que está en producción (Hernández y Romero, 1990; Hernández, 1985; Hernández *et al.*, 1987) (Figura 1).

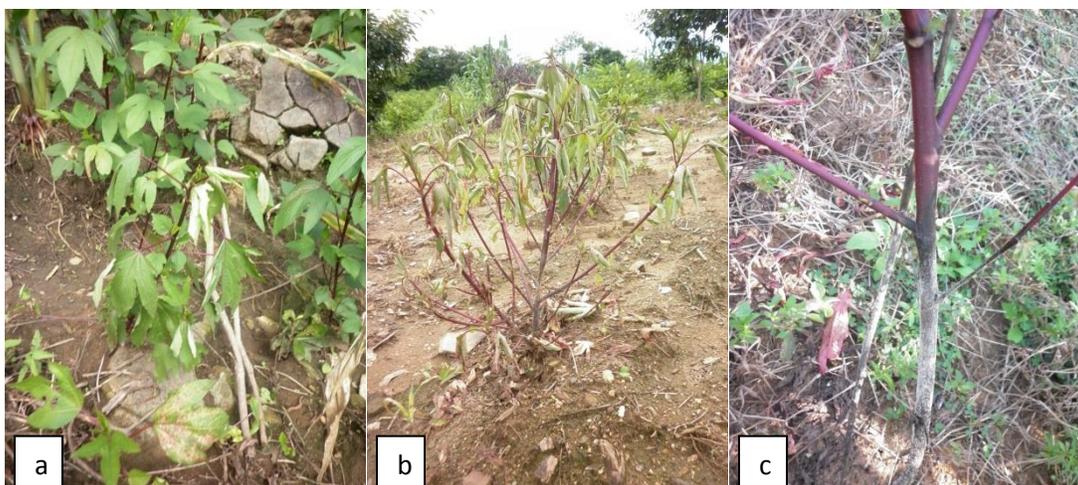


Figura 1. Síntomas de la enfermedad. Marchitez súbita de la planta (a), Caída prematura de hojas (b), Pudrición a la altura del cuello y parte subterránea del tallo (c).

Escalante (1995; 2001) evaluó la variabilidad patogénica del microorganismo en las principales zonas productoras del estado de Guerrero encontrando hasta 30 hospedantes de este patógeno, entre los que se encuentran: *Citrus sinensis*, *C. aurantifolia*, *C. nobilis*, *C. limonia*, *Sesamun indicum*, *Dianthus caryophyllus*, *Cucumis melo*, *Phaseolus lunatus*, *Solanum melongea*, *Lycopersicon esculentum*; *Ananas comusus*, entre otros.

En estudios recientes se ha asociado también al hongo *Fusarium oxysporum* como agente causal de la enfermedad pata prieta de la jamaica en el estado de Guerrero (González, 2008).

En Guerrero, se ha estimado que en terrenos con alta densidad del patógeno en el suelo y en años particularmente lluviosos, la enfermedad ‘pata prieta’ causa hasta 30 % de pérdidas en la producción (Hernández, 1987). En evaluaciones recientes realizadas en plantas comerciales de jamaica, se han calculado pérdidas que rebasan el 50%, por lo que se le ha considerado como la principal enfermedad del cultivo en la entidad. Este patógeno se ha encontrado también causando el mismo daño en los estados de Colima y Puebla (Hernández *et al.*, 2004).

3.1.6.3 Morfología y epidemiología de *Phytophthora parasitica* D.

Las características morfológicas de este patógeno se describen a continuación:

Micelio: es hialino de paredes paralelas o irregularmente calibradas con abundantes gotas oleaginosas. En cultivo *in vitro* es de aspecto denso, flocoso y su crecimiento marcadamente radiado o ligeramente estrellado y con los bordes de la colonia redondeados o sinuosos, previamente descritos por Waterhouse en 1956 citado por Erwin y Ribeiro (1996).

Esporangióforo: no se diferencia normalmente de las hifas, puede ser más ancho o delgado que estas, se ramifica en simpodios regulares con pedicelo largo (Frezzi, 1950).

Esporangio: es incoloro globoso, subgloboso insertado terminalmente en el esporangióforo y papilado en el ápice, difícilmente se desprende del esporangióforo de 25 a 85 X 17 a 38 μ en promedio 42.5 X 25 μ (Waterhouse, 1956).

Clamidiosporas: son de forma redondeada, con pared bien marcada y no engrosada, normalmente intercalada, aunque pueden ser terminales. Incoloras, hialinas de 17 a 63 μ de diámetro, promedio (Frezzi, 1950).

Zoosporas: son ovoides con dos flagelos (Frezzi, 1950).

Órganos sexuales: los oogonios se producen usualmente en cultivo simple son esféricos, terminales con pared delgada diámetro de 22 a 34 μ , pueden ser ligeramente amarillos. El anteridio es anfigino, redondeado y sus dimensiones son de 8 X 10.5 μ . Las oosporas son abundantes, esféricas, lisas, apleróticas de 12 a 33.5 μ ; poseen paredes gruesas, hialinas a ligeramente amarillentas (Tuset, 1977).

3.1.6.4 Ciclo de vida

Phytophthora parasitica puede invernar en forma de oosporas, clamidiosporas o micelio en el suelo o en las raíces que ha infectado. En la primavera, las oosporas y clamidiosporas germinan en forma de zoosporangio y esporangio respectivamente y liberan zoosporas. Estas últimas se conducen al flujo natural del agua en el suelo e infectan a las raíces de las planta de jamaica, colonizan las células de la jamaica y la planta empieza a marchitarse y posteriormente se observa el necrosamiento (Galiana, 2005; Agrios, 2005) (Fig. 2 tomada de Erwin y Ribeiro, 1996).

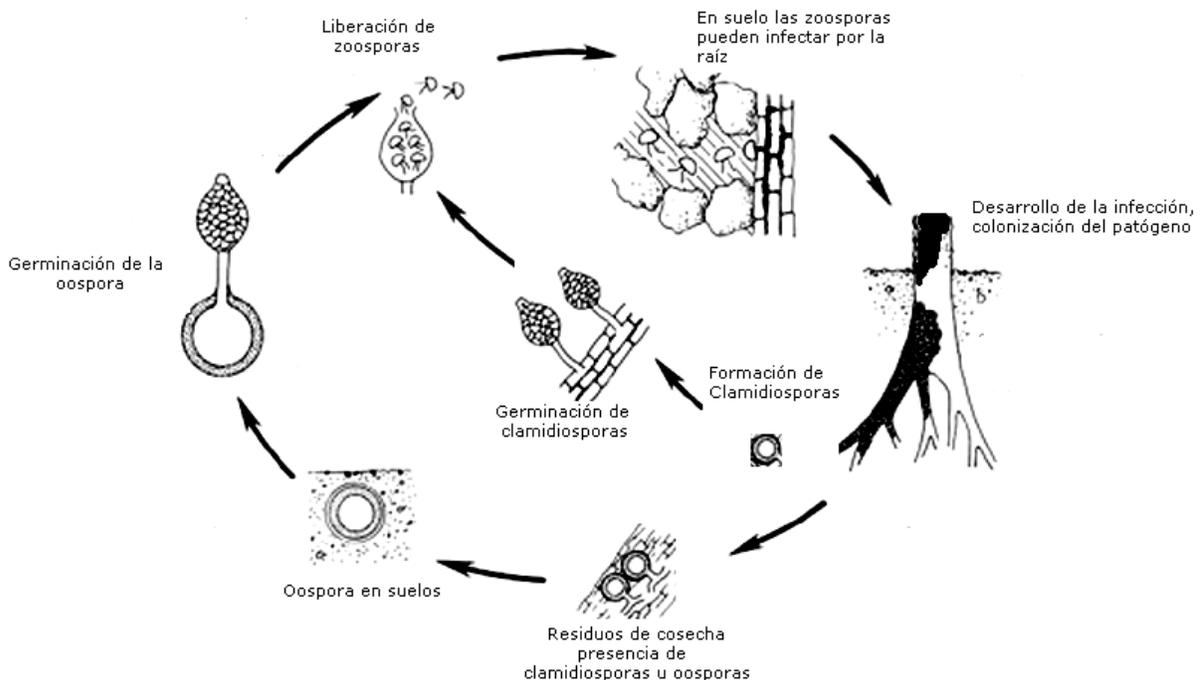


Figura 2. Ciclo de vida de *P.*

3.1.6.5 Proceso de infección de *Phytophthora parasitica* y sistemas de defensa del cultivo de la jamaica.

En plantas de *Hibiscus sabdariffa* se conocen dos sitios de infección, los síntomas inicialmente aparecen en la base del tallo o debajo de este; se desarrollan lesiones de color café sobre la raíz principal y raíces adventicias. En etapas avanzadas, todo el sistema radical llega a ser suave y húmedo. Una severa pudrición de la raíz ocasiona un marchitamiento general de la planta. Sobre el tallo, el patógeno ocasiona lesiones necróticas que gradualmente se unen para rodearlo. La infección progresa tanto hacia arriba como hacia abajo del tallo, finalmente hay un descortezamiento en la región del cuello (Erwin y Ribeiro, 1996). En etapas avanzadas de la enfermedad, el tallo se agrieta en varios lugares y un exudado gomoso sale de las mismas. Las plantas afectadas se marchitan y se caen en épocas de viento. El desarrollo de la enfermedad se incrementa con temperaturas arriba de 20°C y frecuentes lluvias (Erwin y Ribeiro, 1996).

Estas características coinciden con lo observado por Hernández (2004) en plantaciones comerciales en el estado de Guerrero, en años particularmente lluviosos y temperaturas arriba de 20°C se incrementa la presencia de esta enfermedad. Waterhouse (1956) menciona que las temperaturas para el desarrollo del patógeno son: mínima de 10°C, óptima de 30°C a 32°C y máxima de 37°C.

Las zoosporas secretan una proteína PcVcv1, que contienen Thrombospondin tipo 1, encontrado también en animales y parásitos pero no en plantas, algas verde o en los hongos verdaderos (Robolod y Hardham, 2005). Estas proteínas son parecidas a las glicoproteínas, identificadas en los estados iniciales de la pre-infección, las cuales se presume que sirven para dar adhesión a las zoosporas (Panabieres *et al.*, 2005).

Phytophthora parasitica regula y acumula prolina, que es un aminoácido, que en este caso se presume que está involucrado en la formación del apresorio (Panabieres *et al.*, 2005).

Las plantas tienen la habilidad de reconocer a sus patógenos potenciales e inducir varios mecanismos de defensa que le confieren resistencia. Las moléculas derivadas del patógeno que son reconocidas por las plantas y generan esta respuesta se denominan elicitores. Dentro de este grupo se encuentran las elicinas, proteínas generadas por los patógenos de

los géneros *Phytophthora* y *Pythium*. Las elicinas inducen en las plantas respuestas típicas de defensa tales como respuesta hipersensitiva (HR) con una consecuente muerte celular, producción de fitoalexinas y resistencia sistémica adquirida (SAR) a otros patógenos (Attard *et al.*, 2008). La inducción de HR y SAR mediada por elicinas de *Phytophthora* y *Pythium* se ha observado en la mayoría de las especies del género *Nicotiana*, algunos cultivares de *Brassica rapa* y *Raphanus sativus* (Colas *et al.*, 2001).

Después de las elicinas, se despliegan eventos característicos de resistencia a enfermedades. Estos incluyen inducción de influjos de Ca^{2+} , producción transiente de radicales libre y activación de cascadas de **MAPKs**. La principal regulación de HR y SAR contra otros patógenos mediada por las diferentes elicinas se encuentra a nivel de las diferencias en los influjos de Ca^{2+} y en la activación de las cascadas de MAPKs (Takemoto *et al.* 2005).

3.1.6.6 Estrategias de control de la pata prieta de la jamaica

Actualmente la única estrategia de manejo para controlar esta enfermedad es el uso de insumos químicos y utilización de variedades resistentes, sin embargo no existen variedades de jamaica completamente resistentes y/o fungicidas efectivos para el óptimo manejo de esta enfermedad; por lo anterior, es necesario buscar nuevas estrategias eficientes y sostenibles que sean medioambientalmente respetuosas para su control. Una de estas estrategias puede ser el uso de antagonistas microbianos del patógeno como agentes de biocontrol, la cual puede ser considerada una alternativa o una vía complementaria para reducir el uso de productos químicos en la agricultura (Berg *et al.*, 2005; Paulin *et al.*, 2009).

En investigaciones previas, se ha documentado que las plantas cultivadas han desarrollado una estrategia de estimular y promover el desarrollo de grupos específicos de microorganismos antagonistas autóctonos como primera línea de defensa contra patógenos del suelo (Landa *et al.*, 2006). Por lo tanto, el sistema radical de la planta es un importante nicho de microorganismos que pueden constituir un reservorio inexplorado de antagonistas contra patógenos de plantas. En particular, las bacterias asociadas a las plantas que muestran propiedades antagonistas pueden ser encontradas en la rizósfera de las mismas.

Investigaciones previas han demostrado que las comunidades bacterianas en la rizósfera de muchas especies de plantas producen un efecto benéfico en el crecimiento y sanidad de las mismas tanto directa como indirectamente, y que estas comunidades bacterianas están fuertemente influenciadas por la especie de la planta y viceversa (Ahn *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2005). Por lo tanto, las comunidades bacterianas autóctonas en la rizósfera de las plantas podrían ser consideradas una fuente importante de nuevos aislados microbianos tales como los involucrados en la fijación de nitrógeno, producción de fitohormonas y componentes antimicrobianos, promoción del crecimiento e inducción de resistencia sistémica en la planta que podrían ser utilizados para futuras aplicaciones biotecnológicas como el desarrollo de agentes de control biológico de organismos fitopatógenos o para el aislamiento de nuevos compuestos bioactivos (Méndez *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2004).

3.2 Control Biológico

En 1974, Baker y Cook definieron el control biológico como “la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades productoras de enfermedad de un patógeno o parásito en su estado de actividad o dormancia, mediante uno o más organismos, y lograda de forma natural mediante la manipulación del ambiente, el huésped, el antagonista, o por la introducción masiva de uno o más antagonistas”. Esta definición fue posteriormente abreviada como: “Control Biológico es la reducción de la cantidad de inóculo o de la actividad productora de enfermedad de un patógeno llevada a cabo por uno o más organismos diferentes al hombre” (Cook y Baker, 1983). La “actividad productora de enfermedad” incluye el crecimiento, infectividad, agresividad, virulencia, y otras características del patógeno, o de los procesos que determinan la infección, el desarrollo de síntomas y la reproducción.

La potencialidad de los microorganismos para actuar como agentes de control biológico (ACBs), ya sean nativos o introducidos, viene determinada por la mayor cantidad, crecimiento y actividad metabólica de éstos en la proximidad de las zonas de infección radical, a su vez fuertemente influidas por la cantidad y calidad de nutrientes orgánicos y minerales liberados por la raíz y disponibles en las rizósfera de la planta (efecto rizosférico) (Weller *et al.*, 2007). Los ACBs deben estar adaptados ecológicamente a sobrevivir en el

ambiente rizosférico donde deben actuar y llegar a establecerse en él, colonizando de forma efectiva (alcanzando poblaciones suficientemente altas y metabólicamente activas en el tiempo para controlar al patógeno diana) los nichos donde deben ejercer su acción, compitiendo de forma satisfactoria por los recursos limitantes existentes en el suelo y en la rizósfera (Weller *et al.*, 2007). Ello les permitirá realizar su función final de suprimir al patógeno diana dentro de las condiciones particulares del ecosistema donde se apliquen, interaccionando con todos los componentes de éste.

3.3 La rizósfera

La rizósfera ha sido definida por Hiltner (1904), como el volumen de suelo influenciado por la presencia de raíces de una planta viva, cuya extensión puede variar de acuerdo al tipo de suelo, la especie de planta, su edad y otros factores (Foster, 1998). Se sabe que en la rizósfera la interacción entre las bacterias y las raíces de las plantas puede ser beneficiosa; en este contexto se puede considerar la rizósfera como una zona de amortiguación microbiológica en donde la microbiota sirve de protección a la planta frente al ataque de patógenos (Krupa y Dommergues, 1981).

La rizósfera ofrece un microambiente complejo y dinámico donde los microorganismos, en asociación con las raíces, forman comunidades únicas que tienen considerable potencial (Blake *et al.*, 1993; Park, Keyhan, y Matin, 1999). Un gran número de microorganismos y actividades se observan típicamente en la rizósfera de la planta (Tate, 2000). La abundancia de bacterias en la rizósfera en comparación con otros microorganismos se puede deber a su rápido crecimiento y la habilidad de utilizar un amplio rango de sustratos como fuentes de carbono o nitrógeno (Glick, 1995). La cantidad de bacterias que se van a encontrar depende de muchos factores como son: la temporada, el tipo de suelo, la vegetación, el contenido de humedad, el tipo de labranza y fertilización (Killian *et al.*, 2001; Glick, 1995; Bending *et al.*, 1989).

3.3.1 Mecanismos de control biológico en la rizósfera de las plantas

Las rizobacterias son uno de los grupos más importantes entre los numerosos microorganismos que pueden actuar como ACBs contra hongos fitopatógenos residentes en el suelo. Son competidores muy eficaces en el suelo por su capacidad de superar en número

y cantidad a cualquier otro organismo edáfico, por su habilidad para utilizar diferentes formas de nutrientes bajo condiciones diversas, y por su facilidad para multiplicarse con rapidez como respuesta a los nutrientes.

El control biológico de un microorganismo puede ejercerse: I) De manera directa a través de múltiples mecanismos como la producción de compuestos microbianos (antibiosis) que inhiben el crecimiento de otros o los mata (Berg *et al.*, 2005), producción de fitohormonas, exoenzimas, competencia por nutrientes (competencia por iones de hierro, por la producción de sideróforos), competencia por nichos ecológicos, sitios de colonización en los tejidos de plantas, etc., o ya sea por la inhibición de factores que promueven la germinación del patógeno y el proceso de patogenicidad, y también por interferencia de señalización de las moléculas (Quorum Sensing de AHLs homoserine lactones) (Lugtemberg y Kamilova, 2009) y II) De manera indirecta mediante la inducción de un sistema de respuestas de defensa en la planta conocida como Resistencia Sistémica Inducida (ISR, siglas en inglés), y/o promoción del crecimiento en las plantas. Estas últimas relacionadas principalmente a un grupo de bacterias conocidas como rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR). Sin embargo, se considera que en la mayoría de los casos la supresión de una enfermedad resulta de la implementación simultánea de múltiples mecanismos por uno o varios ACBs (Beattie, 2006; Sorensen y Sessitch, 2007).

Existen varios metabolitos producidos por rizobacterias implicados en el control biológico. Estos metabolitos le confieren a las rizobacterias una ventaja competitiva y selectiva contra otros microorganismos, además de contribuir a su eficiencia competitiva por la colonización de sitios específicos de la raíz. Dentro de estos se encuentran:

Sideróforos: Los microorganismos que producen sideróforos para extraer en forma más eficiente los iones de hierro del medio ambiente que sus competidores, los hace antagonistas de éstos. Muchos aislados de *Pseudomonas* fluorescentes producen sideróforos tales como pyochelina, pyoverdina, pseudobactina y ferribactina los cuales han demostrado ser altamente eficientes para la adquisición de hierro el cual es un micro nutriente esencial para el desarrollo de los microorganismos y como consecuencia de esta interacción poder ejercer así su capacidad de control biológico contra una amplia gama de patógenos. Otros géneros como *Serratia* contienen especies bacterianas que se caracterizan

por producir enterobactina y aerobactina, ejerciendo una acción antagonista contra importantes patógenos del suelo como *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia sclerotiorum* (Raaijmakers *et al.*, 1995).

Exoenzimas líticas y Antibióticos: Los géneros *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia* y *Burkholderia* frecuentemente encontradas colonizando la rizósfera, contienen especies en las que comúnmente su antagonismo está asociado a la producción de enzimas que hidrolizan la pared celular como quitinasas, β -glucanasas, y celulasas, las cuales pueden antagonizar y reducir el crecimiento de los agentes fitopatógenos presentes en la rizósfera. Por otra parte, un amplia gama de bacterias, principalmente bacterias PGPR secretan antibióticos los cuales son particularmente relevantes para la colonización de la rizósfera y rizoplano, entre estas moléculas destacan: fenazinas, 2-4 diacetilfluoroglucinol (DAPG), cianuro de hidrógeno (HCN), oomycina A, pioluteorina, pirrolnitrina, thiotropicina, tropolone, etc., así como muchas otras como lipopéptidos cíclicos, rhamnolípidos, olygomicina A, kanosamine, zwittermicina A y xanthobaccina. Recientemente, se han encontrado bacterias que producen nuevos compuestos antibióticos como el ácido-D-glucónico y 2-hexyl-5-propyl-resorcinol y otros compuestos volátiles como el 2,3-butaneidol y lipopéptidos biosurfactantes (Compant *et al.*, 2009; Lugtemberg y Kamilova, 2009). Algunas bacterias pueden secretar uno o más de esos metabolitos permitiéndole ser más competitivas con la microflora natural residente en la rizósfera y rizoplano de la planta huésped (Compant *et al.*, 2009). Por ejemplo, la producción de lipopéptidos cíclicos, como la viscosinamida, recientemente ha llamado la atención como agentes humectantes para facilitar la colonización en *Pseudomonas fluorescens* en algunos cultivos y su papel en la reducción de la enfermedad (Sorensen y Sessitch, 2007).

Producción de fitohormonas: Muchas especies bacterianas utilizadas en el control biológico tienen la capacidad de producir fitohormonas ejemplo, ácido giberélico, citoquininas y ácido indolacético (IAA); esta última es una de las más comúnmente asociadas a muchas especies de bacterias de la rizósfera y endósfera pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia*, y *Azospirillum*. La producción del IAA se activa por mecanismos de señalización en los cuales están involucrados los exudados radicales de la planta (Sorensen y Sessitch, 2007).

Competencia: Ocurre cuando dos o más organismos requieren los mismos recursos para su actividad, y el uso de éstos por uno de los organismos reduce la cantidad disponible para el otro (Campbell, 1989; Lewis *et al.*, 1989). Existen varias formas de competencia por las que las rizobacterias pueden desarrollar su capacidad de control biológico.

Competencia por nutrientes, ocurre principalmente por nutrientes esenciales, como C y N, durante la colonización del tejido. En este lugar de colonización, el agente de control biológico puede utilizar un substrato de crecimiento esencial más eficientemente que el patógeno lo cual origina que este sea desplazado.

Competencia por espacio, se produce cuando un microorganismo excluye a otro de la ocupación de una superficie en el microhábitat nicho. Este fenómeno puede ser importante en el caso de patógenos que penetran por heridas, o que necesitan determinadas densidades de inóculo para iniciar el proceso de penetración. En este caso es de gran interés la velocidad de crecimiento de cada componente de la interacción, el agente de control biológico y el patógeno (Baker, 1968; Baker y Cook, 1974). Cuando un agente de control biológico introducido en el suelo o en la rizósfera de la planta alcanza niveles de población suficientemente grandes y ocupa un nicho ecológico que se solapa o abarca el del patógeno diana, esto puede dar lugar a una protección mediante la prevención del establecimiento del patógeno sobre la superficie de la raíz (Landa *et al.*, 2006; Weller *et al.*, 2007).

Hasta nuestro conocimiento, actualmente no existen investigaciones que hayan abordado el estudio de las comunidades bacterianas nativas en el sistema radical de la jamaica. Más aún, explorar el potencial de antagonismo mediante la caracterización de productos metabólicos que estas comunidades bacterianas pudieran expresar contra patógenos de importancia como es el caso de *P. parasítica* agente causal de la enfermedad conocida como “pata prieta”. Por lo anterior, la presente investigación se centró en el estudio de las poblaciones bacterianas cultivables en la rizósfera de jamaica en diferentes localidades del Estado de Guerrero, con potencial antagonista *in vitro* contra *Phytophthora parasitica* y la caracterización en la producción de metabolitos involucrados en el antagonismo.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Muestreo de la rizósfera del cultivo de jamaica

Se obtuvieron muestras de rizósfera de cinco localidades del municipio de Tecoaapa en el estado de Guerrero, Sur de México, ubicados en la zona económica Costa chica (Cuadro 2). El área de muestreo se determinó por un muestreo de expertos, no destructivo (Rendón, 1993). Las muestras de rizósfera se tomaron de plantas de jamaica en los estados fenológicos: 1) Crecimiento inicial (hasta 40 cm de altura), 2) Desarrollo de botones florales (40 a 120 cm) y 3) Floración (120 a 180 cm), durante el ciclo de cultivo 2012. Se colectaron raíces a una profundidad de 30 cm con tierra naturalmente adherida de 5 plantas sanas por parcela y por estado fenológico. Se obtuvo una muestra compuesta mediante la mezcla de raíces y suelo rizosférico de las cinco plantas por cada localidad muestreada y estado fenológico. Las muestras se colocaron en bolsas de plástico, rotuladas y se transportaron en una hielera al laboratorio para su análisis. Se realizó un análisis físico-químico al suelo rizosférico en el laboratorio de Área de Química de suelos, Programa de Edafología-IRENAT del Colegio de Postgraduados. Las propiedades físico - químicas analizadas del suelo de cada zona incluyeron: textura, pH, carbono orgánico, contenido de nitrógeno (N) y la capacidad de intercambio catiónico (CEC).

Cuadro 2. Ubicación de las localidades de estudio en el Municipio de Tecoaapa, Guerrero.

Comunidad	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)
Las Ánimas	16° 57.979´	099° 19.379´	687
Xalpatláhuac	17° 00.115´	099° 18.929´	661
Los Saucitos	16° 58.684´	099° 18.522´	624
Santa Rosa	16° 57.601´	099° 17.228´	556
Pueblo Largo	16° 59.598´	099° 15.152´	426

4.2 Aislamiento de bacterias y determinación de UFC.

Las comunidades bacterianas de la rizósfera se obtuvieron agitando vigorosamente 2.5 g de raíces en 20 ml de agua destilada estéril durante 10 min en un agitador orbital (Labnet, Orbit 1900). Después se sometió a ultrasonido (Ultrasons Cleaners, 8510 Branson) por 10 minutos para disgregar las partículas de suelo. Las suspensiones de la rizósfera fueron diluidas en serie (10^{-4}); se sembraron por triplicado 100 μ l en medio R2A agar y B de King suplementado con ampicilina, rifampicina y ciclohexitimida (KMB⁺⁺⁺) (Figura 3); las placas se incubaron a 28°C durante 48 h. El número de bacterias se expresó como log UFC g⁻¹. El log-transformado de los datos de las UFC fueron analizados por análisis de varianza. Por cada sitio de muestreo se seleccionaron 30 morfotipos bacterianos que fueron considerados representativos del total de bacterias presentes en las placas después de la observación visual y óptica mediante un microscopio estereoscópico (Spencer), identificando diferencias en color, textura, tamaño de las colonias. De estas, se obtuvieron 150 bacterias por sitio de muestreo. Se registró el número de colonias fluorescentes bajo luz UV (380nm) pertenecientes al grupo de *Pseudomonas*. Todas las bacterias seleccionadas se preservaron por congelación (-20 °C) en caldo nutritivo (500 μ l) y glicerol (solución acuosa 40%) (500 μ l).

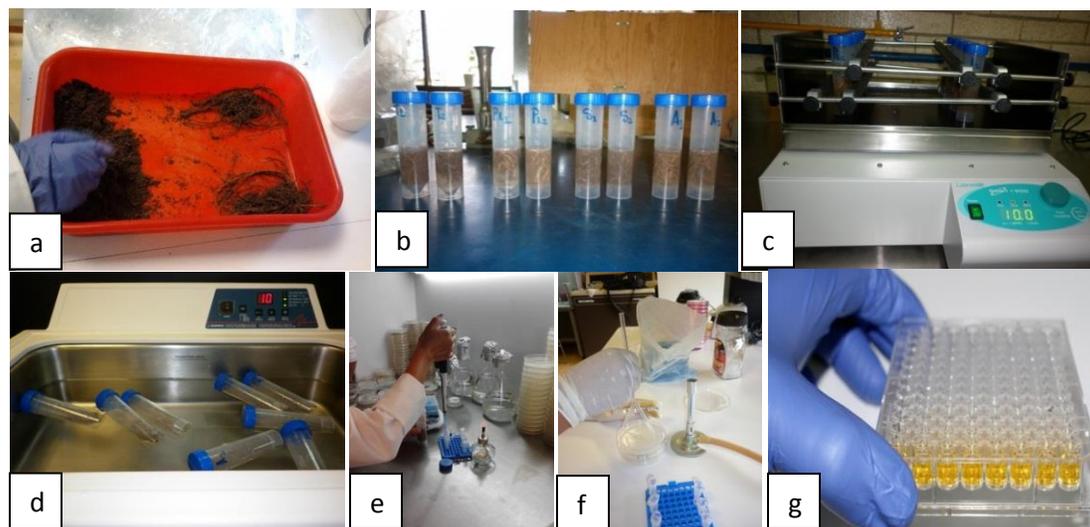


Figura 3. Aislamiento de bacterias de la rizósfera. Obtención de raíces(a), Suspensión de rizósfera (b), Agitador orbital (c), Ultrasonido (d), Dilución de la suspensión (e), Siembra en medio R2A (f), Siembra en B de King⁺⁺⁺ (g).

4.3 Antagonismo *in vitro* contra *P. parasitica*

Se evaluó el antagonismo *in vitro* de las bacterias contra *P. parasitica* Dauster. mediante el ensayo de cultivo dual en medio Waksman agar conteniendo por litro de medio: 5 g de polipeptona (Bioxon), 10 g de glucosa (JT Baker), 0.5 g de Sulfato de magnesio (JT Baker), 1 g de Fosfato de potasio, 20 g de agar (Merck), agua destilada 1L, pH 7.0. Se utilizó una cepa nativa, virulenta de *P. parasitica* aislado de una planta enferma de jamaica proveniente de Tecoaapa, Guerrero. En placas Petri con medio Waksman agar, se colocó un disco (5 mm de diámetro) con micelio de *P. parasitica* en el centro y se incubó a 28°C durante 24 h. Posteriormente se colocaron 8 bacterias por caja a una distancia de 2.5 cm del centro y se incubaron a 28° durante 5 días; Cada cepa bacteriana se evaluó con tres repeticiones. La inhibición del crecimiento radial del hongo (un área clara entre el bordes del micelio del hongo y las colonias bacterianas), determinó el antagonismo bacteriano (Figura 4).

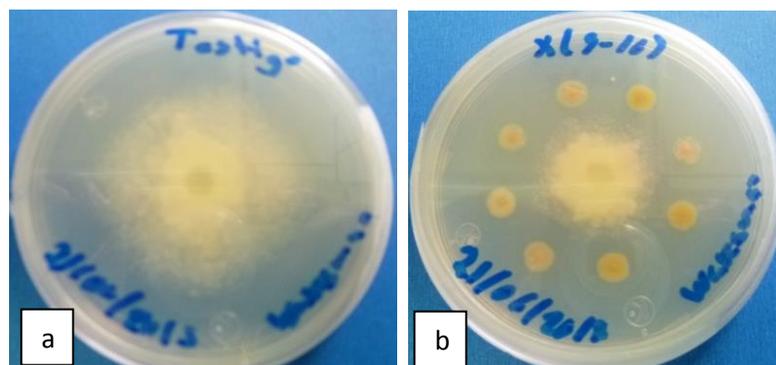


Figura 4. Antagonismo *in vitro* de bacterias aisladas de la rizósfera de Jamaica. Testigo de *P. parasitica* en medio Waksman(a), Inhibición del crecimiento de *P. parasitica* por bacterias antagonicas (b)

4.4 Caracterización de metabolitos involucrados en el antagonismo *in vitro*

Las cepas que mostraron antagonismo *in vitro* contra *P. parasitica* fueron caracterizadas para la producción de metabolitos *in vitro*. Todas las cepas se evaluaron por triplicado

4.4.1 Producción de ácido indol-3-acético (AIA)

La producción de AIA se realizó en forma cualitativa siguiendo el método descrito por Sawar y Kremer (1995). Las cepas bacterianas puras se inocularon en Caldo Soja Triptona

(TSB) en microplacas de 96 pocillos, se incubaron a 28°C durante 24 h. Posterior a la incubación, se agregó 3µl de reactivo de Kovac en cada pocillo con una multipipeta (Transferpette®, -8/-12). Las cepas bacterianas positivas a la producción de AIA fueron identificadas por el cambio en la coloración del medio a un tono rojo.

4.4.2 Actividad lipolítica

La actividad lipolítica de los aislados bacterianos se evaluó utilizando compuestos de Tween, ya que las lipasas son generalmente producidas por carbonos lipídicos como aceites, ácidos grasos, glicerol o Tweens (Gupta *et al.*, 2003). Se utilizó el medio Tween 80 agar (Chernin *et al.*, 1995), que contiene: Bacto Peptona 10 g, cloruro de sodio 5 g, cloruro de calcio 0.1 g, agua destilada 1L, Tween 80 (Sigma, ST. Louis, Mo) 5ml, agar 15 g, pH final de 6.8.

Las cepas bacterianas se inocularon en punto en las placas Petri con medio Tween 80 agar y se incubaron a 30 °C por 10 días. Se realizaron observaciones diarias. La actividad lipolítica se determinó cuando la cepa bacteriana hidroliza el Tween 80 observando en el medio de cultivo un precipitado alrededor del crecimiento bacteriano debido a la combinación de Ca^{2+} y los ácidos grasos liberados por la hidrólisis.

4.4.3 Actividad proteolítica

La actividad proteolítica se evaluó mediante el criterio descrito por Chernin *et al.*, (1995). Las cepas bacterianas se sembraron en un medio que constó de dos fracciones: 50 ml de leche descremada estéril mezclada a 55 °C con 50 ml de 1/5 de caldo soja triptona (TSB) y 4 g de agar en placas Petri cuadradas (120mm x 120mm).

Las cepas bacterianas se sembraron en punto y se incubaron durante 28 °C por 48-72 h. La actividad proteolítica se determinó por la formación de un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano.

4.4.4 Determinación de Producción de sideróforos

Para la detección de sideróforos se utilizó el medio universal CAS agar descrita por Schwyn y Neilands (1987). Se utilizó la solución reveladora CAS (Cromo Azurol S) que

indica la producción de este metabolito mediante un cambio de coloración en el medio de cultivo de azul a naranja. Las cepas bacterianas se inocularon por punto en el medio CAS agar en placas cuadradas Petri (120mm x 120mm). Se incubaron a 28°C por 5 días, se hicieron observaciones diarias. La formación de un halo amarillo-naranja alrededor de la colonia inoculada fue indicativa de las cepas bacterianas productoras de sideróforos.

4.4.5 Solubilización de fosfato mineral

Para determinar la solubilización de fosfato, las cepas bacterianas fueron sembradas en placas Petri cuadradas de (120mm x 120mm) en el medio de cultivo TCP, conteniendo (1 L): 4 g $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 10 g glucosa, 5 g NH_4Cl , 1 g NaCl , 1g MgSO_4 , 20 g agar, pH 7.2 (Abou *et al.*, 2007). Las bacterias fueron inoculadas en punto sobre el medio, y se incubaron a 25°C por 7 días, realizando observaciones diarias. La detección de zonas claras (halos) alrededor del crecimiento bacteriano fue considerada como positivas para la solubilización de fosfatos.

Las cepas seleccionadas con el mejor perfil antagonista se mantuvieron en preservación en caldo nutritivo y glicerol al 40% (solución acuosa) (1:1 v/v), a -20 °C. Todas las cepas se identificaron y conservaron por duplicado para estudios posteriores.

4.4.6 Identificación de las bacterias antagonistas a *P. parasitica*

La identificación de las cepas bacterianas antagonistas se realizó mediante la amplificación parcial y secuenciación del gen 16S ADNr con los iniciadores 27F y 1492R que amplifica un fragmento de 1465 pb. Los productos de la reacción fueron secuenciados por la empresa Macrogen (Corea), y comparados en base de datos de referencia del Centro Nacional de Biotecnología de los Estados Unidos (NCBI),

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Densidad de poblaciones bacterianas cultivables en la rizósfera de jamaica

La estructura de las poblaciones microbianas cultivables presentes en la rizósfera es un indicador de las condiciones de estabilidad de un cultivo y la diversidad microbiana encontrada refleja la salud de un ecosistema (Ariena *et al.*, 2006). De acuerdo con los

resultados, los valores medios de colonización obtenidos en la rizósfera de bacterias cultivables (BC), indican que la densidad de población en la rizósfera de BC estuvieron comprendidas en un intervalo de log 3.50 y 6.56 UFC·g de raíz⁻¹, en las cinco localidades de Tecoaapa, Guerrero. Sin embargo, los valores de UFC fueron diferentes para las tres etapas fenológicas de la planta de Jamaica en las cinco localidades. Estos resultados coinciden con los reportados por Berg, (2005) quién estimó una densidad poblacional de BC en intervalos de log 0.18 y 7.63 UFC·g de raíz⁻¹ en raíces de fresa. Asimismo, Landa *et al.* (2002) determinó que la densidad poblacional de BC en la rizósfera de trigo se encuentra en rangos de log 4.0 y 5.3 UFC·g de raíz⁻¹. En nuestros resultados, los valores totales de UFC g⁻¹ de raíz fueron diferentes en las etapas fenológicas en las cinco localidades (Cuadro 3). El estudio comparativo mediante la prueba de Tukey's HSD (Cuadro 4), mostró que el promedio de UFC·g⁻¹ de raíz en la etapa de Crecimiento inicial fue estadísticamente mayor (p>0.05) al promedio de la etapa de Desarrollo de botones florales; adicionalmente, la variable tuvo sus valores más altos en los sitios: Las Ánimas, Saucitos, Santa Rosa y Pueblo Largo, donde hubo mayor densidad de BC en la etapa de Crecimiento inicial. En contraste, en Xalpatláhuac se presentó el mayor número de UFC·g⁻¹ de raíz en la etapa de Desarrollo de botones florales (Figura 5).

Cuadro 3. Comparación de Tukey's HSD con una significativa al nivel 0.05 de las cinco localidades.

Localidad	Media	Agrupamiento
Las animas	0.65600	a
Saucitos	0.62956	a
Pueblo Largo	0.52556	ab
Santa Rosa	0.40778	ab
Xalpatláhuac	0.35067	b

Cuadro 4. Comparación de Tukey's HSD con una significativa al nivel 0.1 entre los estados fenológicos de las plantas de jamaica.

Estado Fenológico	Media	Agrupamiento
Crecimiento inicial	0.61973	a
Floración	0.46373	ab
Desarrollo de botones florales	0.45827	b

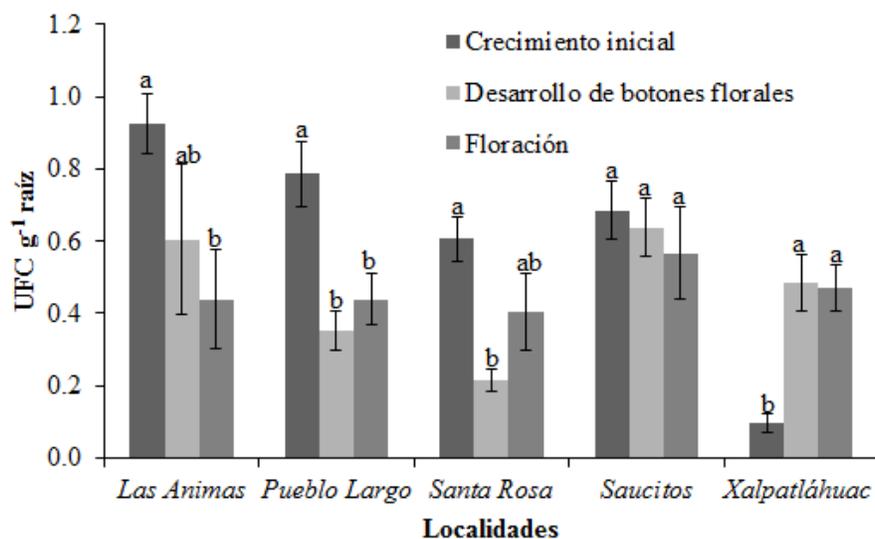


Figura 5. Prueba de comparación de medias de Tukey's HSD con una significativa al nivel 0.1. Las medias son comparables únicamente dentro de cada sitio de las poblaciones bacterianas en UFC·g⁻¹ de raíz.

Estas diferencias en la densidad poblacional pueden ser atribuidas a las características físico-químicas del suelo en las diferentes localidades y a la influencia de la especie de jamaica en los patrones cualitativos y cuantitativos de exudados de la rizósfera en las diferentes etapas fenológicas del cultivo y que proveen protección contra factores de estrés característico del suelo (Paulsen *et al.*, 2005); resultados similares fueron obtenidos por Rumberger *et al.* (2007) quienes observaron diferencias significativas en la composición de las comunidades microbianas de la rizósfera en manzano en función del genotipo y características del suelo; otras investigaciones han documentado que la composición de los exudados radicales es dependiente del estatus fisiológico de la especie de planta y de los microorganismos que interactúan (Marques *et al.*, 2014), y que la densidad de poblaciones

bacterianas varían en los diferentes estados fenológicos de las plantas, debido a los cambios ocurridos en los patrones de exudación en las raíces, e incluso que la cantidad y calidad de estos exudados también es dependiente del estatus fisiológico de la especie de planta (Kang *et al.*, 2010).

Mediante el coeficiente de correlación de Pearson, se analizó la relación entre las características físico-químicas del suelo (Cuadro 5) y el número de UFC g⁻¹ de raíz. Los resultados mostraron que el Mg ($\rho=0.9293$) y P ($\rho=0.8089$) tienen una correlación significativa con los valores de UFC. En la localidad de Las Ánimas, el contenido de Mg y P en el suelo son mayores que en Xalpatláhuac y se correlaciona con un incremento en la densidad de bacterias totales en la rizósfera. Nuestros resultados difieren de otras investigaciones donde el pH del suelo fue el factor más frecuentemente asociado influenciando la densidad y estructura de las comunidades bacterianas de la rizósfera; en este estudio, se encontró que la cantidad de P y Mg en el suelo afectan significativamente la densidad de bacterias cultivables en la rizósfera de jamaica. En este contexto, estudios previos han demostrado la influencia de P sobre la densidad y fluctuaciones de las comunidades bacterianas en la rizósfera de otras especies de plantas (Marschner *et al.*, 2004); sin embargo, muy pocos estudios han aportado evidencia sobre el efecto del Mg sobre estas comunidades, por lo que la presente investigación aporta información de referencia acerca de la influencia de este micro-elemento en el suelo sobre las comunidades microbianas cultivables en la rizósfera.

Cuadro 5. Características fisicoquímicas de los suelos de las cinco regiones muestreadas.

Características/ Localidad	Las animas	Santa Rosa	Pueblo Largo	Saucitos	Xalpatláhuac
Arena (%)	43.64	51.64	7.64	53.64	73.64
Limo (%)	33.28	30.36	21.08	27.08	19.08
Arcilla (%)	23.08	18.00	71.28	19.28	7.28
Textura	Migajón	Migajón arcillosos	Migajón Limoso	Migajón arcillo arenoso	Migajón arenoso
pH	5.21	5.38	5.02	4.92	4.80
C.E. (dSm ⁻¹ a 25°C)	0.192	0.30	0.24	0.4	0.102

MO (%)	1.05	5.74	1.31	2.25	1.55
N (%)	0.13	0.25	0.11	0.11	0.06
Ca (cmol _c kg ⁻¹)	7.36	4.99	1.19	2.14	1.43
Mg (cmol _c kg ⁻¹)	2.14	1.19	1.19	1.90	0.95
K (cmol _c kg ⁻¹)	0.186	0.29	0.12	0.28	0.08
P (mgKg ⁻¹)	28	9	32	64	2

5.2 Antagonismo *in vitro* contra *Phytophthora parasitica*

A partir de la rizósfera de Jamaica de los cinco sitios de muestreo, se obtuvieron un total de 294 aislamientos bacterianos los cuales mostraban diferencias morfológicas entre sí. De estos, 72 aislamientos inhibieron el crecimiento *in vitro* de *P. parasitica* mediante ensayos de confrontación dual. La medición del halo de inhibición micelial en mm indicó que 18 aislamientos bacterianos (A50, A51, A44, A52, S40, PL53, SR61, SR60, X12, X19, A49, SR59, X5, X6, X11, SR69, A45, y PL55) mostraron el mayor grado de antagonismo y la mayor capacidad para inhibir el crecimiento de *P. parasitica*; de estas el 44.4% fueron *Pseudomonas* fluorescentes (Cuadro 6).

La distribución por sitio de muestreo de las 18 bacterias antagonistas contra *P. parasitica*, aisladas a partir de la rizósfera de la jamaica fueron: el 33% de las Animas, 27.7% de Xalpatláhuac, 22.2% de Santa Rosa, 11.1% de Pueblo Largo y 5.7% de Saucitos.

Cuadro 6. Halo de inhibición *in vitro* de las 18 cepas bacterianas e identificación de bacterias fluorescentes

Sitio	Cepa	Halo de inhibición (mm)	Bacterias Fluorescentes en B de King
Las Animas	A50	7.0	-
Las Animas	A51	6.3	-
Las Animas	A44	6.2	+
Las Animas	A52	6.0	-
Saucitos	S40	5.7	+
Pueblo Largo	PL53	5.7	+

Santa Rosa	SR61	5.3	+
Santa Rosa	SR60	5.0	-
Xalpatláhuac	X12	4.7	+
Xalpatláhuac	X19	4.7	+
Las Animas	A49	4.7	-
Santa Rosa	SR59	4.7	-
Xalpatláhuac	X5	4.3	-
Xalpatláhuac	X6	4.3	+
Xalpatláhuac	X11	4.3	+
Santa Rosa	SR69	4.3	-
Las Animas	A45	4.0	-
Pueblo Largo	PL55	4.0	-

"-"= Fluorescencia negativo

"+"= Fluorescencia positivo

5.3 Identificación molecular de los aislamientos bacterianos antagonistas

Las amplificaciones realizadas mediante PCR de las 18 cepas bacterianas generaron amplicones de aproximadamente 1500 pb, con los iniciadores 518F y 800R, lo que corresponde con el tamaño del amplicón que se esperaba para el gen 16s ribosomal. Las secuencias de las dieciocho cepas tuvieron una identidad de 99% de acuerdo al alineamiento en el banco de genes del NCBI (Cuadro 7).

Cuadro 7. Identificación mediante el gen 16s ADNr de las 18 bacterias antagonistas a *P. parasitica*

No.	Aislado	Origen	Base de datos del NCBI	Identidad (%)	No de Referencia
1	A50	Las Animas	<i>Serratia marcescens</i>	99%	JX469437
2	A51	Las Animas	<i>Serratia marcescens</i>	99%	CP003959
3	A44	Las Animas	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99%	DQ439976
4	A52	Las Animas	<i>Serratia marcescens</i>	99%	JN896750
5	S40	Saucitos	<i>Pseudomonas sp.</i>	99%	AM745260
6	PL53	Pueblo Largo	<i>Pseudomonas sp.</i>	99%	AM745260
7	SR61	Santa Rosa	<i>Pseudomonas sp.</i>	99%	AM745260
8	SR60	Santa Rosa	<i>Serratia marcescens</i>	99%	JX469437
9	X12	Xalpatláhuac	<i>Stenotrophomonas sp</i>	99%	KC818599
10	X19	Xalpatláhuac	<i>Pseudomonas sp.</i>	99%	AM745260
11	A49	Las Animas	<i>Serratia sp.</i>	99%	JF833854

12	SR59	Santa Rosa	<i>Serratia marcescens</i>	99%	CP003959
13	X5	Xalpatláhuac	<i>Stenotrophomonas sp</i>	99%	KC818599
14	X6	Xalpatláhuac	<i>Pseudomonas sp.</i>	99%	AM745260
15	X11	Xalpatláhuac	<i>Pseudomonas sp.</i>	99%	AM745260
16	SR69	Santa Rosa	<i>Serratia marcescens</i>	99%	CP003959
17	A45	Las Animas	<i>Serratia marcescens</i>	99%	GU906248
18	PL55	Pueblo Largo	<i>Serratia marcescens</i>	99%	GU906248

En total, de las 18 cepas bacterianas antagonistas, el 50% de las cepas pertenecen al género *Serratia* (9 cepas), de las cuales el 88.8% fueron identificadas como *Serratia marcescens* 38.8% al género *Pseudomonas* (7 cepas), de las cuales fueron identificadas *Pseudomonas sp* (85.7%) y *Pseudomonas fluorescens* (14.3%).y el 11.2% al género *Stenotrophomonas* (2 cepas). (Cuadro 8).

Cuadro 8. Distribución taxonómica de las 18 bacterias antagonistas contra *P. parasitica*

Filo	Clase	Orden	Familia	Género	(%)
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i>	50
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	38.9
<u>Proteobacteria</u>	<u>Gammaproteobacteria</u>	Xanthomonadales	<u>Xanthomonadaceae</u>	<i>Stenotrophomonas</i>	11.1

Los resultados anteriores coinciden con investigaciones previas en las cuales se ha documentado que rizobacterias son eficientes antagonistas contra *Phytophthora* ssp. La mayoría de los estudios han puesto de relieve agentes bacterianos tales como *Pseudomonas* ssp., *Agrobacterium* sp., *Bacillus subtilis* y *Serratia marcescens* (Steddom et al., 2002; Turney, 1998). Por otra parte, Fernando y Linderman, 1995, mencionan que especies de *Phytophthora* han sido biológicamente controladas por diferentes rizobacterias, incluyendo a *Brevibacterium linens*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas vignae*, *Enterobacter aerogenes*.

En los últimos años, uno de los mayores desarrollos en el área del control biológico han sido las investigaciones realizadas sobre rizobacterias, debido a su mayor versatilidad como agentes de biocontrol y promotores del crecimiento de plantas. Las características que debe reunir una rizobacteria, para aumentar su capacidad de establecimiento y/o supervivencia, cuando se introduce en la rizosfera de un cultivo para que actúe como agente de control

biológico, incluyen: Una alta velocidad de crecimiento en relación a otros microorganismos autóctonos, resistencia ante condiciones adversas o falta de nutrientes, movilidad celular, producción de sustancias que permitan su fijación a las raíces de las plantas, y producción de antibióticos (Mazzola *et al.*, 1992).

Nuestros resultados muestran que *Serratia* y *Pseudomonas* son las rizobacterias de jamaica con la mayor abundancia, con un 50% y 38.9% respectivamente con el mayor grado de antagonismo contra *P. parasítica* (Cuadro 7). Sin embargo, también encontramos a *Stenotrophomonas* con el 11.1%.

Los miembros del género *Serratia* son bacilos gram negativos cortos y rectos de 0.5 - 0.8µm de diámetro y 0.9-2.0 µm de longitud, generalmente móviles, por bacilos peritricos. Son anaerobios facultativos, oxidasa negativos, fermentan la glucosa y reducen el nitrato.

Son productores de un gran número de enzimas que resultan muy útiles en su identificación tales como catalasa, desoxirribonucleasa extracelular, gelatinasa, lipasa, lecitinasa, quitinasa, esterasa (hidrólisis de Tween 80), una proteasa que hidroliza caseína y fibrinolisisina y fosfatasa (Von Graevenitz y Rubin, 1980).

Como agente de biocontrol, *Serratia* se encuentra como saprófito en el suelo y es ampliamente conocido por ser un promotor de crecimiento en plantas (PGPR). Abundan en la superficie de las raíces, ya que son versátiles en su metabolismo y pueden utilizar varios sustratos producidos por las mismas, pero no establecen una relación simbiótica con la planta. Entre sus mecanismos de acción se encuentran el incremento en la absorción de agua y nutrientes por la planta, la solubilización de fosfatos, la producción de reguladores del crecimiento vegetal y el control biológico de patógenos, fundamentalmente por la producción de sideróforos, antibiosis y la inducción de resistencia a la planta mediante la producción de ácido salicílico el cual actúa como una molécula de señalización que activa la —resistencia sistémica inducida (RSI) que es muy similar a la —resistencia sistémica adquirida (RSA) (Zhang *et al.*, 2002).

Cepas de *Serratia marcescens* son capaces de producir dos tipos distintos de bacteriocinas (marcescinas), una de producción espontánea, resistentes a trisina, cloroformo y calor, sensible a ácidos y con movilidad electroforética, denominadas tipo “A”, y otras

sensibles a tripsina, cloroformo y el calor, resistentes a ácidos y electroforéticamente inmóviles, denominadas tipo “B”. Solo las bacteriocinas de tipo A son activas frente a otras cepas de *Serratia marcescens* (Prinsloo, 1966; Poole y Braun, 1988)). Por otra parte, *Serratia marcescens* produce lecitinasas, fosforilasas, toxinas extracelulares y quitinasas. Es una bacteria cosmopolita que se ha encontrado sobre hongos Basidiomicetos y Ascomicetos (Escobar *et al.*, 2001; Ordentlich *et al.*, 1988), y con la mayor capacidad quitinolítica hasta ahora conocida entre las rizobacterias. Su sistema quitinolítico está constituido por la expresión de endoquitinasas, exoquitinasas, quitobiasas y una proteína que se une a quitina (Brurberg *et al.*, 1996). La quitinasa producida por *S. marcescens* pueden ser usadas en la degradación de materiales que tengan quitina, tales como el exoesqueleto de los crustáceos, membrana peritrófica de los insectos y en la degradación de la pared celular de hongos como *Sclerotium rolfsii* (Ordentlich *et al.*, 1988). Rojas-Avelizapa, *et al.*, (1999), han reportado que *S. marcescens* WF presenta hasta 20 veces más actividad de quitinasa que *B. thuringiensis*. Lo anterior resalta la necesidad de explorar y caracterizar otras propiedades de las cepas aisladas en este estudio que potencialmente estén involucradas en su actividad como antagonista y/o promotor de crecimiento contra *P. parasítica* en el cultivo de Jamaica, además de otras futuras aplicaciones biotecnológicas.

En nuestra investigación, los resultados obtenidos del potencial de antagonismo contra *P. parasítica* de *S. marcescens*, coinciden plenamente con investigaciones previas. De Melo, *et al.* (2006) demostraron que *S. marcescens* es una bacteria con actividad antagonista a través de la producción de sideróforos y la antibiosis, lo cual inhibe el crecimiento fúngico de *P. parasítica*, reduciendo la infección de la plántula en cítricos en un 50%, siendo capaz de inducir el crecimiento de las plantas y suprimir a *P. parasítica*.

Miembros del género *Pseudomonas* se caracterizan por la producción de sideróforos del tipo hidroxamato entre los que se encuentran el ferribactín y el pseudobactín, tales compuestos desempeñan un papel crucial en el control de hongos fitopatógenos que provocan enfermedades en diferentes cultivos de importancia económica. Adicionalmente, se ha demostrado que las pseudomicinas tienen efecto contra diversos microorganismos patógenos (Sokol, 1986; Hernández *et al.*, 2006).

Diversos autores resaltan la capacidad de *Pseudomonas* spp., de suprimir el desarrollo de patógenos en la rizósfera, la cual depende en gran medida de su habilidad para producir metabolitos de naturaleza antibiótica, tales como pyoluteorina, pyrrolnitrina, fenacina-1-ácido carbóxico y 2.4 diacetyl-phloroglucinol (Banger y Thomashow, 1998; Picard *et al.*, 2000). Berg *et al.*, (2005), aislaron nuevas cepas de rizobacterias con potencial de biocontrol con alta capacidad de producir 2.4 diacetil floroglucinol, entre otros metabolitos.

Las especies pertenecientes al género *Pseudomonas* son habitantes comunes del suelo, tejidos de las plantas y especialmente de la rizósfera. Las *Pseudomonas* fluorescentes son el grupo más estudiado dentro de este género, y comprende especies fitopatógenas y no fitopatógenas. Las especies del género *Pseudomonas* han sido objeto de estudio en múltiples interacciones con diferentes especies de plantas y cultivos agrícolas. Se caracterizan por ser bacterias aeróbicas, Gram-negativas, cosmopolitas en suelos agrícolas y de alta especialización y capacidad de adaptación para colonizar la rizósfera. Poseen atributos que las hacen ser una de las rizobacterias más estudiadas para actuar como ACBs y promotores de crecimiento, por sus requerimientos nutricionales muy simples y de crecer rápidamente en condiciones *in vitro*, lo cual facilita su producción en forma masiva, respuesta rápida a exudados de raíces y semillas, alta capacidad de colonizar y multiplicarse en la rizósfera y dentro de los tejidos como endofitas, producir un amplio espectro de metabolitos de relevancia en la interacción microorganismo-planta (antibióticos, sideróforos, sustancias volátiles y promotoras del crecimiento, capacidad de inducir resistencia sistémica en plantas, competir agresivamente con otros microorganismos y tener alta adaptación a diferentes medio ambientes. Adicionalmente, diversas especies de *Pseudomonas* son responsables en gran medida de la condición supresiva de suelos de todo el mundo para una amplia gama de patógenos (Gu y Mazzola, 2003; Lottmann *et al.*, 1999; Weller, 2007).

Los miembros del género *Stenotrophomonas* se clasificaron inicialmente en el género *Pseudomonas* y a continuación *Xanthomonas* antes de ser colocado en el nuevo género *Stenotrophomonas*, es filogenéticamente colocado en la subclase de las Proteobacterias (Moore *et al.*, 1997).

S. maltophilia es un bacilo Gram negativo, con flagelos polares y un metabolismo oxidativo, se caracteriza por la producción de enzimas de quitina, se produce ampliamente en los suelos y agua. Es una bacteria fenotípicamente similar a las especies de *Xanthomonas*, sin embargo presenta un taxón distinto, lo cual hace que no sea patógeno a las plantas. La participación de las quitinasas es una herramienta importante de las bacterias con actividad antagonista en la rizósfera contra plagas de las plantas causadas por hongos (Jeanes, 1974; Hugh and Ryschenkow, 1961; Palleroni and Bradbury, 1993; Moore *et al.*, 1997).

S. maltophilia ha sido aislada de rizósfera de gramíneas, las cuales han sido utilizadas como eficientes antagonistas contra hongos. También se aisló una cepa quitinolítica de una hoja de pasto azul de Kentucky, actualmente se puso a prueba para la inhibición de la enfermedad causada por *Rhizoctonia solani* (Giesler and Yuen, 1998)

Yuen, *et al.*, (2001), demostraron que *S. maltophilia* tiene un potencial antagonista contra la roya del frijol, utilizando la aplicación de quitina para inducir la producción de quitinasas y otras enzimas líticas.

5.4 Caracterización en la producción de metabolitos *in vitro* de bacterias de la rizósfera de jamaica contra *P. parasitica*

Los resultados de la caracterización en la producción de metabolitos *in vitro* por las cepas antagonistas contra *P. parasitica* se muestran en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Caracterización en la producción de metabolitos de 18 cepas bacterianas antagonistas vs *P. parasitica* aisladas de rizósfera de jamaica.

Cepa	Actividad Lipolítica	Actividad Proteolítica	Producción de Sideróforos	Producción de AIA	Solubilización de Fosfato Mineral
<i>Serratia marcescens</i>	+	+	+	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	+	+	-	+
<i>Serratia marcescens</i>	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas sp.</i>	+	+	+	+	-

<i>Pseudomonas sp.</i>	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas sp.</i>	+	+	+	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	+	+	+	+	+
<i>Stenotrophomonas sp</i>	+	+	+	+	-
<i>Pseudomonas sp.</i>	+	+	+	+	+
<i>Serratia sp.</i>	+	+	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	+	+	+	-	+
<i>Stenotrophomonas sp</i>	+	+	+	-	-
<i>Pseudomonas sp.</i>	+	+	+	-	+
<i>Pseudomonas sp.</i>	+	+	+	-	+
<i>Serratia marcescens</i>	+	+	+	-	+
<i>Serratia marcescens</i>	+	+	-	-	+
<i>Serratia marcescens</i>	+	+	+	-	+

*(+) Actividad positiva

(-) Actividad negativa

5.5 Producción de ácido indol-3- acético (AIA)

De las 18 cepas bacterianas antagonistas, 8 mostraron actividad metabólica para la producción de AIA (44.44%), las cuales se obtuvieron: 4 *Serratia marcescens*, 3 *Pseudomonas sp.* y 1 *Stenotrophomonas sp.*

Los reguladores de crecimiento vegetal (PGRs) son sustancias orgánicas que influyen la fisiología y desarrollo de la planta a concentraciones muy bajas (actúan a concentraciones internas menores a 1µM) (García *et al.*, 2005). Las bacterias habitantes de la rizósfera pueden influenciar el crecimiento de las plantas contribuyendo con el pool endógeno de PGRs en estas, como las auxinas, entre las que se encuentra el Ácido Indol Acético (AIA) (Patten y Glick, 2002). Dentro de los mecanismos por los cuales las rizobacterias pueden manifestar su acción se destacan la producción de compuestos indólicos, a los cuales se les atribuye el incremento en el desarrollo y rendimiento de diversas especies de plantas.

En algunos casos el AIA es sintetizado por algunos microorganismos tales como bacterias pertenecientes a los géneros *Azotobacter*, *Pseudomonas* y *Bacillus* (Patten y Glick, 1996). Algunas bacterias son capaces de metabolizar triptófano y producir diversos metabolitos, entre ellos, el ácido indol acético, el cual es un compuesto involucrado en la capacidad promotora del crecimiento vegetal y se ha demostrado que incrementa los rendimientos en algunos granos hasta en un 36% (Díaz *et al.*, 2005, García *et al.*, 2007). La producción de AIA, estimulante de crecimiento vegetal, en el caso de plantas superiores y microorganismos, se realiza por la vía del ácido antranílico (AA) a partir de triptófano (TRP), lo cual es regulado por el gen de la antranilato sintasa (Anderson *et al.*, 1999). La ruta de síntesis del AIA a partir de TRP se ha demostrado en diversos seres vivos tales como bacterias (*Bacillus*, *Pseudomonas* y *Burkholderia cepacia*) (Lestes y Yanofsky, 1961), en dichos organismos, el AIA tiene un papel de auxina o de promotor del crecimiento vegetal, participa en las rutas de síntesis de fitohormonas e incluso, en algunos casos, tiene funciones fungistáticas (Aoki *et al.*, 2005). El TRP, el AIA o sus análogos, son capaces de inhibir el crecimiento de cultivos celulares tanto de organismos procarióticos, como de eucarióticos, lo que en algunos casos de organismos productores de AIA de ser antagonistas (Anderson *et al.*, 1999).

En este ensayo se identificaron las bacterias que producen AIA. La capacidad para la producción de metabolitos que juegan un papel directo en la promoción del crecimiento vegetal confiere a dichas bacterias un amplio uso potencial en la producción agrícola, tanto en la promoción del crecimiento vegetal como biofertilizante; inclusive, se ha observado capacidad para participar en el control biológico de enfermedades (Carreño *et al.*, 2000).

5.6 Actividad lipolítica

De las 18 cepas bacterianas antagonistas, el 100% mostró actividad lipolítica. (Cuadro 9). Los resultados en la caracterización lipolítica, indicaron que los microorganismos bacterianos antagonistas aislados, hidrolizaron el ácido graso presente en el medio. La expresión metabólica de esta actividad en el sustrato de cultivo utilizado, se determinó por el desarrollo de una zona de hidrólisis alrededor de las colonias que evidenció después de tiempo de incubación. Se utilizó como criterio la selección de las cepas más sobresalientes, aquellas cepas que produjeron halos ≥ 1 mm de diámetro en la actividad de hidrólisis (Jaeger

et al., 1999). De las 18 cepas antagonistas, el 16.67% mostró un halo de hidrólisis de 5mm de las cuales fueron: 2 *Serratia* y 1 *Pseudomonas*, 33.33% de 6mm, fueron: 2 *Serratia*, 2 *Stenotrophomonas* y 2 *Pseudomonas* y el 50% de 7mm, fueron: 5 *Serratia* y 4 *Pseudomonas*.

5.7 Actividad Proteolítica

La actividad proteolítica se determinó cualitativamente, se tomó como criterio de selección de cepas a aquellas que presentaron más de ≥ 1 mm de diámetro en los halos de hidrólisis alrededor de las colonias bacterianas. De las 18 cepas bacterianas antagonistas, el 100% expresó actividad proteolítica (Cuadro 9). De acuerdo a estudios de Rodas *et al.*, (2009), la actividad proteolítica confiere capacidad de antagonismo a cepas bacterianas.

5.8 Producción de sideróforos

La presencia de un halo amarillo alrededor de la colonia bacteriana indicó producción de sideróforos (Fig. 6). Se tomó como criterio de selección de cepas con actividad de producción de sideróforos, aquellas que presentaran ≥ 1 mm de diámetro en los halos con coloración amarillo-naranja en el medio CAS. El halo de todas las cepas bacterianas fue mayor a 2mm tras 5 días de incubación. De las 18 cepas antagonistas evaluadas, el 88.88% mostraron actividad de producción de sideróforos, dentro de las que se encuentran: *P. fluorescens*, *S. marcescens* y *Stenotrophomonas* sp.



Fig. 6. Producción de sideróforos (halos amarillentos)

Se ha observado que las rizobacterias con la capacidad de sintetizar estos compuestos son altamente efectivas en el control biológico de fitopatógenos (Ramamoorthy *et al.*, 2001). Al formarse el complejo hierro-sideróforos, disminuye la disponibilidad de este en el suelo, ya que los receptores proteicos que reconocen el complejo son específicos de cada especie bacteriana, estableciendo una competencia por el hierro frecuentemente falta para el patógeno, que no posee mecanismos propios tan efectivos para la adquisición de hierro. Este mecanismo, sin embargo no perjudica las plantas colonizadas, por el contrario, se ha planteado la existencia de mecanismos de incorporación del hierro solubilizado por los sideróforos(De Chial *et al.*, 2003).

Uno de los mecanismos por medio de los cuales puede presentarse antibiosis es la producción de sideróforos, sustancias orgánicas de bajo peso molecular, con alta afinidad a Fe^{3+} . Los sideróforos son producidos por microorganismos y plantas y se encuentran ampliamente distribuidos en microorganismos aerobios y anaerobios facultativos, por ellos difieren en su eficiencia de producción (Nailands y Leong, 1986). Los sideróforos quelatan al ion férrico, en la rizósfera y puede originar la inhibición del crecimiento de otros microorganismos patogénicos cuya afinidad por el hierro es baja. La competencia por el hierro es probablemente más importante en la rizósfera que en el resto del suelo. Glick y Bashan (1997), mencionan que la producción de sideróforos por bacterias inhibe a patógenos de plantas *in vitro* y también promueve el crecimiento de plantas en el suelo. La habilidad de los sideróforos para actuar como agentes efectivos supresores de enfermedades es afectada por el tipo de planta, la especificidad del fitopatógeno a suprimir, la composición del suelo y la bacteria que sintetiza el sideróforo. La capacidad de las bacterias del suelo de producir y utilizar los sideróforos puede conferir ventajas ecológica en la colonización de la rizósfera y la superficie de las plantas.

Las bacterias *Pseudomonas* del grupo fluorescente se consideran una opción prometedora en el control biológico de fitopatógenos (Johri *et al.*, 1997; Paulsen *et al.*, 2005). Este grupo bacteriano es un importante colonizador del a rizósfera de plantas, además de presentar actividad antagónica hacia diversos fitopatógenos y ser promotoras del crecimiento (Burkhead *et al.*, 1994; Banger y Tomashow, 1996; Sutra *et al.*, 2000).

5.9 Solubilización de fosfatos minerales

De las 18 cepas antagonistas evaluadas, el 72.22% mostraron actividad de solubilización de fosfatos (Cuadro 9). Según Wakelin *et al.*, (2004), demostraron que la actividad microbiológica en la rizósfera podía disolver el P_i poco soluble e incrementar el crecimiento de las plantas. Posteriormente se demostró que muchas especies bacterianas y fungosas tienen actividad solubilizadora de P. En forma consistente, se ha señalado incrementos en la biodisponibilidad de P cuando existen aumentos paralelos en la actividad microbiana del suelo.

Varios estudios han puesto en evidencia la capacidad solubilizadora de fosfatos por diferentes especies microbianas (Khan *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2010; Zaidi *et al.*, 2009). Entre las bacterias destacan los géneros de: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Pantotea*, *Klebsiella*, *Rhodobacter*, *Arthrobacter*, *Serratia* y *Erwinia*; mientras en los hongos se mencionan principalmente: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium* y levaduras. Entre los mecanismos ampliamente aceptados como responsables de la solubilización del P mineral se tienen la producción de ácidos orgánicos y la producción fisiológica de protones, y la producción y excreción de fosfatasas ácidas para la mineralización del P.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones de esta investigación son:

- 1.- Los valores medios de colonización de bacterias cultivables indican que la densidad de población en la rizósfera de Jamaica están en un rango de log 3.50 y 6.56 UFC·g de raíz⁻¹, en las cinco localidades de Tecoaapa, Guerrero
- 2.- La mayor densidad poblacional de bacterias cultivables en la rizósfera de Jamaica se encuentra en la etapa de crecimiento del cultivo en los lugares de Saucitos, Las ánimas, Santa Rosa y Pueblo largo; y en la etapa de floración en Xalpatláhuac

3.- En este estudio, los resultados mostraron una relación entre la densidad de población microbiana total y las condiciones físicas y químicas del suelo, como el pH, fósforo y materia orgánica del suelo.

4.- De las 18 cepas bacterianas con el mayor grado de antagonismo contra *P. parasitica* aisladas de la rizósfera de Jamaica, el 50% pertenecen al género *Serratia*, de las cuales el 88.8% fueron identificadas como *Serratia marcescens*; 38.8% al género *Pseudomonas*, de las cuales el 85.7% fueron identificadas *Pseudomonas sp* y el 14.3% *Pseudomonas fluorescens*; y el 11.2% al género *Stenotrophomonas*.

4. La caracterización en la producción de metabolitos *in vitro* de estas cepas, indicó que el 44.44% produce AIA, el 100% tienen actividad lipolítica y proteolítica, el 88.88% produce sideróforos, y el 72.22% mostraron actividad de solubilización de fosfatos.

5.- *Serratia marcescens*, *Pseudomonas sp*; *Pseudomonas fluorescens* y *Stenotrophomonas maltophilia* son bacterias nativas, bien adaptadas en el cultivo de Jamaica, con alto grado de antagonismo *in vitro* contra *P. parasitica*, merecen ser consideradas como agentes de biocontrol y/o promotores de crecimiento que contribuyan al manejo de *P parasitica* y otras enfermedades bajo condiciones de campo en la zona productora de Tecoaapa Guerrero.

LITERATURA CITADA

- Abou A., E., H. Abou E., M. Mady A., and S. Moussa M. 2007. Enhancing Growth, Productivity and Quality of Squash Plants Using Phosphate Dissolving Microorganisms (Bio phos-phor) Combined with Boron Foliar Spray. *Journal of Agriculture and Biological Sciences* 3:274-286.
- Adeniji M., O. 1970. Fungi associated with storage decay of yam in Nigeria. *Phytopathology* 60:590-592.
- Agrios G., N. 2005. *Plant pathology*. 5th ed. Elsevier Academic Press. San Diego California, USA. 903 p.
- Ahn T., S., O. Jong K., H. Geon L., and G. Hong S. 2007. Revegetation of a Lakeside Barren Area by the Application of Plant Growth-promoting Rhizobacteria. *The Journal of Microbiology* 42: 171-174.
- Alexopoulos C., J., C. Mims W., and M. Blackwell. 1996. *Introductory Mycology*. 4th ed. John Wiley and Sons. New York. 869 p.
- Ali B., H., N. Wabel A., and G. Blunden. 2005. Phytochemical, Pharmacological and Toxicological Aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: A Review. *Phytotherapy Research* 19: 369-375.
- Amusa N., A., A. Adegbite A., and M. Oladapo O. 2005. Vascular Wilt of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*) in the Humid Forest Region of South-western Nigeria. *Plant Pathology Journal* 4: 122-125.
- Anderson P., C., P. Chomet S., M. Griffor C., and A. Kris L. 1999. Anthranilate synthase gene and method of use thereof for conferring tryptophan overproduction. Unit States Patent. Patent No. US 6,271,016 B1.
- Aoki Y., Y. Yoshida, M. Yoshida, H. Kawalde, H. Abe, and M. Natsume. Anthranilic Acid, a Spore Germination Inhibitor of Phytopathogenic *Streptomyces* sp. B-9-1 Causing Root Tumor of Melon. *Actinomycetologica* 19:48-54.

- Ariena H., C., A. Semenov M., A. Diepeningen D., O. Vos J., and W. Blok J. 2006. Relation between soil health, wave-like fluctuations in microbial population, and soil-borne plant disease management. *European Journal of Plant Pathology* 115: 105-122.
- Attard A., M. Gourgues, E. Galiana, F. Panabieres, M. Ponchet and H. Keller. 2008. Strategies of attack and defense in plant-oomycete interactions, accentuated for *Phytophthora parasitica* Dastur (syn. *P. Nicotianae* Breda de Haan). *Journal of Plant Physiology* 165: 83-94.
- Augstburger F., J. Berger, U. Censkowsky, P. Heid, J. Milz and C. Streit. 2000. Producción Ecológica de Hibisco. Asociación Naturland. 1ª ed. Berlín, Alemania 13 p.
- Bakker P., A., A. Bakker W., J. Marugg D., P. Weisbeek J., and B. Schippers. 1987. Bioassay for studying the role of siderophores in potato growth stimulation by *Pseudomonas* spp in short potato rotations. *Soil Biology and Biochemistry* 19: 443-449.
- Bangera M., G., and L. Thomashow S. 1998. Characterization of a Genomic Locus Required for Synthesis of the Antibiotic 2,4- diacetylphloroglucinol by the Biological Control Agent *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *Molecular Plant Microbe Interactions* 9: 83-90.
- Bangera M., G., and L. Thomashow S. 1999. Identification and Characterization of a Gene Cluster for Synthesis of the Polyketide Antibiotic 2,4 Diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *Journal of Bacteriology* 181: 3155-3163.
- Bendig J., W., P. Mayes J., D. Eyers E., B. Holmes, and T. Chin L. 1989. *Flavimonas oryzihabitans* (*Pseudomonas oryzihabitans*; CDC Group Ve-2): an Emerging Pathogen in Peritonitis Related to Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis?. *Journal of Clinical Microbiology* 27: 217-218.
- Barberán A., and E. Casamayor O. 2010. Global phylogenetic community structure and β -diversity patterns in Surface bacterioplankton metacommunities. *Aquatic Microbial Ecology* 59: 1-10.

- Barer M., R., and C. Harwood R. 1999. Bacterial Viability and Culturability. *Advances in Microbial Physiology* 41: 93-137.
- Berg G., K. Opelt, C. Zachow, J Lottmann, M. Gotz, R. Costa, and K. Smalla. 2005. The rhizosphere effect on bacteria antagonistic towards the pathogenic fungus *Verticillium* differs depending on plant species and site. *Federation of European Microbiological Societes Microbiology Ecology* 56: 250-261.
- Blake R., C., D. Choate M., S. Bardhan, N. Revis, L. Barton L., and T. Zocco G. 1993. Chemical transformation of toxic metals by a *Pseudomonas* strain from a toxic waste site. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12: 1365-1375.
- Blouin B., S., B. Landa B., E. Lutton., D. Weller M., and B. McSpadden G. 2004. Minimal changes in rhizobacterial population structure following root colonization by wild type and transgenic biocontrol strains. *Federation of European Microbiological Societes Microbiology Ecology* 49: 307-318.
- Bogosian G., and E. Bourneuf V. 2001. A matter of bacterial life and death. *European Molecular Biology Organization* 21: 770-774.
- Brurberg M., B., V. Hijsink G., A. Haandrikman J., G. Venema, and I. Nes F. 1995. Chitinase B from *Serratia marcescens* BJL200 is exported to the periplasm without processing. *Microbiology* 141: 123-131.
- Buée M., W. De Boer, F. Martin, L. van Overbeek and E. Jurkevitch. 2009. The rhizosphere zoo: An overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant Soil* 321: 189-212.
- Burkhead K., D., D. Schisler A., and P. Slininger J. 1994. Pyrrolnitrin Production by Biological Control Agent *Pseudomonas cepacia* B37w in Culture and in Colonized Wounds of Potatoes. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 2031-2039.

- Carvajal O., S. Waliszewski, y R. Infanzón. 2006. Los usos y maravillas de la jamaica. La ciencia y el hombre. Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana 19: 37-40.
- Contreras G., J., R. Soto J., y C. Huchin A. 2009. Tecnología para el cultivo de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Quintana Roo. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigaciones Regional Sureste. Chetumal, Quintana Roo. México. Folleto Técnico 3: 48.
- Cook R., J., L. Thomashow S., D. Weller M., D. Fujimoto, M. Mazzola, G. Banger, and D. Kim. 1995. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92: 197-201.
- Cook R., J., 1993. Making greater use of introduced microorganism for biological control of plant pathogens. Annual Reviews Phytopathology 31:53-80.
- Crane J., C. 1943. Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) as a fiber crop. Economic Plants of interest to the America United States department of Agriculture 47pp.
- De Chial M., B. Ghysels, S. Beatson A., V. Geoffroy, J. Meyer M., T. Pattery, C. Baysse, P. Chablain, Y. Parsons N., C. Winstanley, S. Cordwell j., and P. Cornelis. 2003. Identification of type II and tipye III pyoverdine receptors from *Pseudomonas aeruginosa*. Microbioloby 149: 821-831.
- Díaz A., F., M. Alvarado C., M. Cantú A. y I. Garza C. 2005. Fertilización Bilógica y producción de maíz en la región semiárida del norte de Tamaulipas, México. Agricultura Técnica en México 31: 153-163.
- Ducklow H. 2007. Microbial services: challenges for microbial ecologists in a changing world. Aquatic Microbial Ecology 53: 13-19.
- Eilers H., J. Pernthaler, F. Glockner O., and R. Aman. 2000. Culturability and In Situ Abundance of Pelagic Bacteria from the North Sea. Applied and Environmental Microbiology 66: 3044-3051.

- Erwin D., C., and O. Ribeiro K. 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. The American Phytopathological Society Press. Paul, Minnesota. 562 pp.
- Escalante E., Y. 2001. Variabilidad patogénica de *Phytophthora parasitica* Dastur en Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 19: 84-89.
- Escobar M., M., G. Carbonell V., L. Beriam O., W. Siqueira J., and T. Yano. 2001. Cytotoxin production in phytopathogenic and entomopathogenic *Serratia marcescens*. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 43: 165-170.
- Eslaminejad T., and M. Zakaria. 2011. Morphological characteristics and pathogenicity of fungi associated with Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) diseases in Penang. *Microbial Pathogenesis* 51: 325-337.
- Felske A., A. Wolterink, R. van Lis, W. Vos M., and A. Akkermans L. 1999. Searching for predominant soil bacteria 16S rDNA cloning versus strain cultivation. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology* 30:137-145.
- Fernando W., G., and R. Linderman G. 1995. Inhibition of *Phytophthora vignae* and Stem and Root Rot of Cowpea by Soil Bacteria. *Biological Agriculture and Horticulture*. 12: 1-14.
- Frezzi M., J. 1950. Las especies de *Phytophthora* en la Argentina. Buenos Aires: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria 10: 227-230.
- Fulthorpe R., R., L. Roesch F., A. Riva, and E. Triplet W. 2008. Distantly sampled soils carry few species in common. *International Society for Microbial Ecology* 2: 9001-910.
- Fundación Produce. 2004. Panorama actual de la jamaica. Guerrero si produce: Órgano informativo de la Fundación Produce de Guerrero A. C. 8: 4-6.
- Galand P., E., E. Casamayor O., D. Kirchman L., and C. Lovejoy. 2009. Ecology of the rare microbial biosphere of the Arctic Ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 2247-22432.

- Galiana E., M. Rivere P., S. Pagnotta, and E. Baudouin. 2005. Plant- induced cell death in the oomycete pathogen *Phytophthora parasitica*. *Cell microbiology* 2: 1365-1378.
- Garcia I., N., R. Hynes K., and L. Nelson M. 2005. Role of cytokinins in plant growth by rhizosphere bacteria PGPR. *Biocontrol and fertilization* 173-195.
- García O., J., V. Moreno M., I. Rodríguez L. A. Mendoza H., y N. Mayek P. 2007. Efecto de cepas de *Azospirillum brasilense* en el crecimiento y rendimiento de grano de maíz. *Fitotecnia Mexicana* 30: 305-310.
- Garland J., J., and A. Mills L. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community- level sole –carbon- souce utilization. *Applied an Environmental Microbiology*. 57: 2351-2359.
- Gassama D., Y., D. Sané and M. Ndoye. 2004. Direct genetic transformation of *Hibiscus sabdariffa* L. *African Journal of Biotechnology* 3: 226-228.
- Glick B., R. 1995. The enchancement of plant growth by free- living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 41: 109-117.
- González S., L. 2008. Etiología de la enfermedad “pata prieta” de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Guerrero, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo. Departamento de parasitología. México 63 pp.
- Goodman R., M., S. Bintrin B., J. Handelsman, B. Quirino F., J. Rosas C., H. Simo M., and K. Smith P. 1998. A dirty look: Soil microflora and rhizosphere microbiology. En: Flores H., E., J. Lynch P., And D. Eissenstat. *Radical biology: Advances and perspectives on the function of plant roots*. American Society of Plant Physiologists Rochville 219-231.
- Grayston S., J. 1998. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rizospher. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 369-378.
- Grimont P., A., and F. Grimont. 1978. The Genus *Serratia*. *Annual Review of Microbiology* 32: 221-248.

- Guha R., S., C. Suchismita, and S. Mukherje K. 2007. Biological control of *Phytophthora* spp. with a novel indigenous *Pseudomonas isolate*. J. Mycopathol. Res 45: 117-121.
- Hadad E., A., N. Hasman, and D. Sitepu. 1976. Testing of roselle varieties for resistance to *Phytophthora*. Pemberitaan Lembaga penelitian tonaman Industri, Bogar, Indonesia 22: 7-14.
- Hernández M., J., A. Martínez I., y M. Valadez E. 2004. Variabilidad genética de *Phytophthora parasitica* D., agente causal de la pata prieta de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) mediante RAPD y RAMPnr. Memorias XXXI.
- Hernández M., J. y C. Romero S. 1990. Identificación del agente causal de “La pata prieta” de la Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), y prueba de fungicidas para su control bajo condiciones de invernadero. Revista Chapingo, México 15: 50-54.
- Hernández M., J., C. Sosa M., S. Osada K., A. Martínez G., y S. Leyva G. 1990. Interacción entre *Phytophthora parasitica* y *Meloidogyne arenaria* en la “Pata prieta”. Agrociencia 1: 123-136.
- Hernández M., J. 1985. Identificación del agente causal de la “pata prieta” de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) y prueba de fungicidas para su control bajo condiciones de invernadero. Tesis de Licenciatura. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. México 137.
- Hernández R., A., C. Romero S., y M. Sosa C. 1987. Identificación de los agentes causales de dos enfermedades de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en el estado de Guerrero. Memorias del XIV Congreso Nacional de fitopatología. Morelia Michoacán 100.
- Hernández R., A., P. Heydrich M., M. Velázquez G., y A. Hernández N. 2006. Perspectivas del Empleo de Rizobacterias como Agente de Control Biológico en Cultivos de Importancia Económica. Revista Mexicana de Fitopatología 24: 42-49.
- Hervás A., L. Camarero, I. Reche, and E. Casamayor O. 2009. Viability and potential for immigration of airborne bacteria from Agriculture that reach high mountain lakes in Europe. Environmental Microbiology 11: 1612-1623.

- Horst R., K. 2008. Westcott's Plant Disease Handbook. 7th edition. Springer Verlag Berlin Heidelberg. New York 1317.
- Jung S., S. Park, D. Kim, and S. Kim B. 2008. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Bacterial Community Profiles in the Rhizosphere of *cry1AC* – carrying *Brassica rapa* subsp. *Pekinensis*. The Journal of Microbiology 46: 12-15.
- Kielak A., J. Rodriguez L., E. Kuramae E., P. Chain S., A. van Veen, and G. Kowalchuk A. 2010. Phylogenetic and metagenomic analysis of *Verrucomicrobia* in former agriculture grassland soil. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology 71: 23-33.
- Killian M., U. Steiner, B. Krebs, H. Junge, G. Schmiedeknecht, and R. Hain. 2001. FZB24 *Bacillus subtilis*- mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer 1: 72-93.
- Konopka A. 2006. Microbial ecology: Searching for principles. Microbe 1: 175-179.
- Konstantinidis K., T., A. Ramette and J. Tiedje M. 2006. Toward a more robust assessment of intraspecies diversity, using fewer genetic markers. Applied and Environmental Microbiology 72: 7286-7293.
- Landa B., B., O. Mayrodi V., J. Raaijmakers M., B. Mc.Spadden G., L. Thomashow S., and D. Weller M. 2002. Differential Ability of Genotypes of 2,4-Diacetylphloroglucinol- Producing *Pseudomonas fluorescens* Strains To colonize the Roots of Pea Plants. Applied and Environmental Microbiology 68: 3226-3237.
- Landa B., B., O. Mavrodi V., K. Allende R., and D. Weller M. 2005. Enrichment and genotypic diversity of *ph/D*- containing fluorescent *Pseudomonas* spp. in two soils after a century of wheat and flax monoculture. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology 55: 351-368.
- Ley R., E., J. Wilcox K., J. Spear R., and B. Bebout M. 2006. Unexpected diversity and complexity of the Guerrero Negro hyper saline microbial mat. Applied and Environmental Microbiology 72: 3685-3695.

- Liu W., T., T. Marsh L., H. Cheng, and L. Forney J. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphism of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4516-4522.
- Madigan M., J. Martinko and J. Parker. 1997. Brock: *Biología de los microorganismos*. 8ª edición. Ed. Pearson Prentice Hall, Estados Unidos. pp. 1-20.
- Marschner P., D. Crowley, and H. Yang C. 2004. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant and Soil*. 261: 199-208.
- Marzorati M., L. Wittebolle, N. Boon, D. Daffonchio, and W. Verstraete. 2008. How to get more out of molecular fingerprints: Practical tools for microbial ecology. *Environmental Microbiology* 10: 1571-1581.
- Mendez R., A. Aline, K. Pizzirani, L. Welington A., and J. Raaijmakers M. 2007. Diversity of Cultivated Endophyti Bacteria from Sugarcane: Genetic and Biochemical Characterization of *Burkholderia cepacia* Complex Isolates. *Applied an Environmental Microbiology*. 73: 7259-7267.
- Navarro G., S., S. Cruzaley R., J. Reyes M., C. Noriega H., y S. Miranda F. 2002. Nueva alternativa tecnológica para producir Maíz – Jamaica en áreas potenciales de Guerrero. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigaciones Regional Pacifico Sur. Chilpancingo, Guerrero, México, Folleto para Productores No. 11. 16 p.
- Neilands J., B., and S. Leong A. 1986. Siderophores in relation to plant growth and disease. *Annual Review of Plant Physiology* 37: 187-208.
- Newhook F., F., G. Waterhouse M., ans K. Stamps J. 1978. The Genus *Phytophthora*. Commonwealth Mycological Institute. England 21p.
- Nybore O., K. Brandt K., M. Nicolaisen H., and J. Sorensen. 2007. Methods to detect and quantify bacteria in soil. In: van Elsas J., D., J. Janson K. and J. Trevors D. *Modern*

- Soil Microbiology- second edition, CRC Press, Boca Raton, Florida, United States pp. 283-316.
- Ordentlich A., Y. Elad, and I. Chet. 1988. The role of Chitinase of *Serratia marcescens* in Biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*. 78: 84-88.
- Oros S., M., R. Costa, H. Heuer, and K. Smalla. 2007. Molecular fingerprinting techniques to analyze soil microbial communities. In: van Elsas J., D., J. Janson K., and J. Trevors D. *Modern Soil Microbiology* second edition, CRC Press, Boca Raton, Florida, United States pp. 355-386.
- Pace N., R. 1997. A Molecular View of Microbial Diversity and the Biosphere. *Science* 276: 734- 740.
- Panabire F., J. Amselem, E. Galiana, and J. Le Berre K. 2005. Gene identification in the oomycete pathogen *Phytophthora parasitica* during in vitro vegetative growth through expressed sequence tags. *Fungal Genetics and Biology* 42: 611-623.
- Park D., H., M. Keyhan, and A. Matin. 1999. Purification and characterization of chromate reductase in *Pseudomonas putida*. Abstracts of the General Meeting of the American Society Microbiology. 99: 536.
- Patiño A. 1975. Cultivo y aprovechamiento de la jamaica. Dirección General de Extensión Agrícola. SAG. Universidad Autónoma Chapingo, México. 10 p.
- Patten C., L., and B. Glick R. 1996. Bacterial biosynthesis of Indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 207-220.
- Patten C., L., and B. Glick R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3795-3801.
- Paulin M., M., A. Novinscak, St. Arnaud M., C. Goyer, N. DeCoste J., J. Privé P., J. Owen, and M. Fillion. 2009. Transcriptional activity of antifungal metabolite-encoding genes *ph/D* and *hcnBC* in *Pseudomonas* spp. using qRT-PCR. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology* 68: 212-222.

- Persad C., and M. Fortune. 1989. A new disease of sorrel (*Hibiscus sabdariffa* var. *sabdariffa*) caused by *Coniella musaiensis* var. *hibisci* from Trinidad and Tobago. *Plant Pathology* 38: 615-617.
- Picard C., D. Cello F., M. Fani R., and A. Guckert. 2000. Frequency and Biodiversity of 2,4-Diacetylphloroglucinol-producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of Plant Growth. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 948-955.
- Poole K., and V. Braun. 1988. Influence of growth temperature and lipopolysaccharide on hemolytic activity of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology* 170: 5146-5152.
- Porazinska D., L., W. Sung, R. Giblin M., and W. Thomas K. 2009. Reproducibility of read numbers in high-throughput sequencing analysis of nematode community composition and structure. *Molecular Ecology Resources* 10: 666-676.
- Prosser J., I., B. Bohannan M., T. Curtis P., R. Ellis J., M. Firestone K., R. Freckleton P., J. Green L., L. Green E., K. Killham, J. Lennon J., A. Osborn M., M. Solan, C. van Dergast J., and P. Young W. 2007. Essay- the role of ecological theory in microbial ecology. *Nature Reviews Microbiology* 5: 384-392.
- Ramamoorthy V., R. Viswanathan, T. Raguchander, V. Prakasam, and R. Samiyappan. 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection*. 20: 1-11.
- Ranjard L., F. Poly, and S. Nazaret. 2000. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: Application to Soil Environment. *Research in Microbiology* 151: 167-177.
- Reche I., E. Ortega R. O. Romera, E. Pulido V., R. Morales B., and E. Casamayor O. 2009. Effect of Saharan dust inputs on bacterial activity and community composition in Mediterranean lakes and reservoirs. *Limnology and Oceanography* 54: 869-879.

- Rendón A., B. 1993. Estudio de la variación morfológica y aspectos etnobotánicos en *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae), en relación a su uso y manejo. Tesis de Maestría UNAM. Facultad de Ciencias, Biología. México 223 p.
- Reyes I., y A. Valery. 2007. Efecto de la fertilidad del suelo sobre la microbiota y la promoción del crecimiento (*Zea mays* L.) con *Azotobacter* spp. *Bioagro* 19: 117-126.
- Robold A., V., and A. Hardham R. 2005. During attachment *Phytophthora* spores secrete proteins containing thrombospondin type 1 repeats. *Current Genetics* 47: 307-315.
- Rojas P., J. 1999. Perspectivas de ampliación del mercado de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), del estado de Guerrero. Tesis de licenciatura. División de Ciencias Económico Administrativas, Universidad Autónoma de Chapingo. Edo de México. 67 p.
- Roling F., W. 2007. Do microbial numbers count? Quantifying the regulation of biogeochemical fluxes by population size and cellular activity. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology* 62: 202-210.
- Romero C., S. 1988. Hongos Fitopatógenos. Ed. Universidad Autónoma Chapingo 347 p.
- Rumberger A., I. Merwin A., and J. Thies E. 2007. Microbial community development in the rhizosphere of apple trees at replant disease site. *Soil Biology and Biochemistry* 39: 1645-1654.
- Salvaudon L., G., and J. Shikoff A. 2008. Genetic diversity in natural populations a fundamental component of plant-microbe interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 135-143.
- Sayago A., S., A. Sara, J. Serrano, and I. Goñi. 2007. The dietary fiber content and associated antioxidant compounds in Roselle Flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) Beverage. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 55: 7886-7890.
- Schimdt T., M. 2006. The maturing of microbial ecology. *International Microbiology* 9: 217-223.

- Serrano A., V. 2008. Algunas características del cultivo de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en la costa de Oaxaca. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigaciones Regional Pacifico Sur. Valles Centrales, Oaxaca, México, Folleto Técnico No. 14. 60 p.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2010. <http://www.siap.go.mx/>, (Consultado: 30 de Enero, 2012).
- Silva R., R., S. Alves S., D. Macagnan, B. Halfeld V., M Baracat C., and A. Mounteer. 2004. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biological Control*. 29: 288-295.
- Smalla K., G. Wieland, A. Buchner, A. Zock, J. Parzy, N. Kaiser, H. 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. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4742-4751.
- Smit E., P. Leeflang, S. Gommans, J. van de Broek, S. van Mil, and K. Wernars. 2001. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Applied Environmental Microbiology*. 67: 2284-2291.
- Sogin M., L., H. Morrison G., J. Huber A., M. Welch D., D. Huse S., and P. Neal R. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the unexplored 'rare biosphere'. *Proceedings of the National Academy of Science United States of America* 103: 12115-12120.
- Sokol P., A. 1986. Production and utilization of pyochelin by clinical isolates of *Pseudomonas cepacia*. *Journal of Clinical Microbiology* 23: 560-562.
- Sommaruga R., and E. Casamayor O. 2009. Bacterial 'cosmopolitanism' and importance of local environmental factors for community composition in remote high-altitude lakes. *Freshwater Biology* 54: 994-1005.

- Steddom K., J. Growdey A., and J. Borneman. 2002. Effect of repetitive applications of the biocontrol bacterium *Pseudomonas putida*06090-rif/nal on citrus soil microbial communities. *Phytopathology*, 92: 857-862.
- Takemoto D., A. Hardham R., and D. Jones A. 2005. Differences in cell death induction by *Phytophthora* elicitors are determined by signal components downstream of MAP kinase kinase in different species of *Nicotiana* and cultivars of *Brassica rapa* and *Raphanus sativus*. *Plant Physiology* 138: 1491-1504.
- Tamames J., and A. Moya. 2008. Estimating the extent of horizontal genes transfer in metagenomic sequences. *Biomed Central Genomics* 9: 136-149.
- Toral F., J., A. Pérez G., J. Carreón A., J. L. Martínez R., R. Rodríguez R., J. F. Casas S. 2005. Niveles de Fertilización orgánica mediante vermicomposta en el cultivo de la jamaica. *Avances de la Investigación Científica en el CUCBA*. pp. 193-197.
- Torsvik V., and L. Ovreas. 2007. Microbial phylogeny and diversity in soil. In: van Elsas J., D., J. Janson K., and J. Trevors D. *Modern Soil Microbiology* second edition, CRC Press, Boca Raton, Florida. United States of America 23-54.
- Trigle S., G., and P. Hugenholtz. 2008. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Current Opinion in Microbiology* 11: 442-446.
- Tulukdar S. 1952. Photoperiodic behavior of *Hibiscus sabdariffa* L. *Nature* 170: 458-459.
- Turney J., K. 1993. Biocontrol of *Phytophthora citrophthora* root rot of citrus. *Phytopathology*. 83: 1348.
- Tuset J. 1977. Contribution to the knowledge of the genus *Phytophthora* De Bary in Spain. *Anales del Instituto de Investigaciones Agrarias, Protección Vegetal*. 7: 11-106.
- USDA, ARS, Programa de Recursos Genéticos Nacional de Recursos de Germoplasma Red de Información - (GRIN) [base de datos en línea]. Nacional de Recursos de Germoplasma de laboratorio, Beltsville, Maryland. URL: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/NPGS/html/taxon.pl?19078> (28 de mayo de 2013).

- Van Elsas J., D., S. Turner, and M. Bailey J. 2003. Horizontal gene transfer in the phytosphere. *New Phytologist* 157: 525-537.
- Van Overbeek L., S., J. H. Bergervoet H., F. H. Jacobs H., J. van Elsas D. 2004. The lowtemperature- induced viable-but nonculturable state affects the virulence of *Ralstonia solanacearum* biovar 2. *Phytopathology* 94: 463-469.
- Von Graevenitz A., and S. Rubin J. 1980 The genus *Serratia*. CRC Press, Boca Raton, Florida. United States of America 32: 221-248.
- Walker J., J., and R. Pace N. 2007. Endolithic microbial ecosystems. *Annual Review of Microbiology* 61: 331-347.
- Ward D., M., M. Bateson M., and A. Ruff R. 1992. Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature. *Advances in Microbial Ecology* 12: 219-286.
- Westcoot C. 1971. Plant disease. Hand book. 3a. ed. Vannostrand Reinhold Company. New York USDA. 701 p.
- Young J., M., J. Crawford W., N. Nunan, W. Otten, and A. Spiers. 2008. Microbial distribution in soils: Physics and scaling. *Advances in Agronomy* 100: 81-121.
- Zamora V., y C. Casin J. 1986. El género *Phytophthora* como causante de enfermedades en los cítricos. *Boletín de Reseñas Cítricos y frutales*. La Habana, Cuba 56.