



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE RIZOBACTERIAS
CON ACTIVIDAD ANTAGONISTA CONTRA *Fusarium* spp. EN
EL CULTIVO DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) EN EL
VALLE DE CULIACÁN, SINALOA**

POR:

Ricardo Vega Hernández

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE PRODUCTOS AGRÍCOLAS PARA
ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Ricardo Vega Hernández, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



M.C. José Armando Carrillo Fasío
Director de Tesis

Sañudo Barajas J. Adriana

Dra. Josefa Adriana Sañudo Barajas
Integrante de comité de tesis



Dr. José Benigno Valdez Torres
Integrante de comité de tesis



M.C. Manuel Alonzo Báez Sañudo
Integrante de comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Aislamiento y Caracterización de Rizobacterias con Actividad Antagonista contra *Fusarium* spp. en el Cultivo de Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en el Valle de Culiacán, Sinaloa" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Ricardo Vega Hernández, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Graciela Caire Juvera", written over a horizontal line.

Dra. Graciela Caire Juvera
Directora General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por el apoyo brindado durante mi posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) por aceptarme en el programa de Maestría en Ciencias y permitirme ser parte de la comunidad CIAD.

A mi familia por su apoyo durante toda mi maestría.

A mi director de tesis M.C. Armando Carrillo Fasio, por la confianza al permitirme realizar esta investigación pese al gran nivel de responsabilidad que implicaba el sacar adelante el proyecto, así como su apoyo con todo lo necesario para sacar adelante mi posgrado.

A cada uno de mis asesores por ayudarme a realizar este trabajo.

A la Dra. Josefa Adriana Sañudo Barajas por resolver dudas y apoyarme en todo esa fase de mi carrera.

Al Dr. José Benigno Valdez Torres por siempre estar dispuesto a apoyar en el área estadística de la institución.

Al M.C. Manuel Alonzo Báez Sañudo por sus consejos como asesor durante mi estancia en la maestría.

DEDICATORIA

*A MI MADRE **BLANCA ESTELA HERNANDEZ**, A QUIEN ADMIRO PROFUNDAMENTE
POR SACARNOS ADELANTE, PESE A TODO.*

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
CONTENIDO	6
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE CUADROS	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES	14
2.1. Importancia del Tomate	14
2.2. Microorganismos Fijadores de Nitrógeno	17
2.3. Microorganismos Solubilizadores de Potasio (K)	20
2.4. Microorganismos Solubilizadores de Fósforo (P)	22
2.4.1. Los Microorganismos como Fuente y Dinamizadores del P en el Suelo	23
2.4.2. Mecanismos Responsables de la Solubilización de Fosfatos	24
2.4.3. Solubilización de P por Ácidos Orgánicos	24
2.4.4. Factores que Determinan la Eficacia de la Bioinoculación	25
2.5. Microorganismos Antagonistas.....	27
2.5.1. Mecanismos de Acción	28
2.5.2. Bacterias Antagonistas.....	29
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	33
5. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	34
6. JUSTIFICACIÓN	35
7. HIPÓTESIS	36
8. OBJETIVOS	37
8.1. Objetivo General	37
8.2. Objetivos Específicos	37
9. MATERIALES Y MÉTODOS	38
9.1. Aislamiento de <i>Fusarium</i> spp.	38
9.2. Caracterización de <i>Fusarium</i> spp.	38
9.3. Aislamiento de Microorganismos del Suelo	39
9.3.1. Identificación de Antagonismo <i>in vitro</i>	40

CONTENIDO (continuación)

9.3.2. Caracterización Morfológica	41
9.3.3. Caracterización Bioquímica.....	42
9.4. Extracción de ADN.....	42
9.4.1. Amplificación del Gen 16S ARNr por PCR.....	43
9.4.2. Análisis Bioinformático y Filogenia.....	43
10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
10.1. Aislamiento de Microorganismos de la Rizosfera.....	44
10.2. Identificación Morfológica de <i>Fusarium oxysporum</i>	45
10.3. Identificación de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> por Cultivos Diferenciales.....	46
10.4. Identificación de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> por Cultivos Diferenciales.....	47
10.5. Selección e Identificación de Antagonistas.....	48
10.6. Pruebas para la Selección e Identificación de Antagonistas contra <i>Fusarium oxysporum</i> f sp <i>lycopersici</i>	49
10.7. Identificación Morfológica de los Aislados Bacterianos Evaluados contra <i>Fusarium</i> spp.....	51
10.8. Actividad Fijadora de Potasio (K).....	53
10.9. Actividad Fijadora de Fósforo (P).....	54
10.10 Extracción de ADN	55
11. CONCLUSIONES.....	57
12. REFERENCIAS	58

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pagina
1. Colonia de <i>Fusarium oxysporum</i> en medio PDA	46
2. Identificación de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> en cultivos diferenciales.....	47
3. Identificación de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> en cultivos diferenciales.....	48
4. Inhibición del crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> f sp <i>lycopersici</i> con 16 cepas antagonistas.....	50
5. Inhibición del crecimiento micelialde las cepas antagonistas contra <i>Fusarium oxysporum</i> f sp <i>radicis-lycopersici</i>	51
6. Identificación morfológica de los aislados bacterianos.....	53
7. Actividad solubilizadora de K de los aislados bacterianos.....	54
8. Actividad solubilizadora de P de los aislados bacterianos.....	56
9.- Amplificación del gen 16S ARNr por PCR en gel de agarosa al 1X.....	57

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Número de colonias de bacterias de la rizosfera en 12 muestras de suelo.....	44
2. Selección e identificación de rizobacterias antagonistas contra dos razas de <i>Fusarium</i> spp.....	49
3. Análisis espectrofotométrico de ADN de las rizobacterias aisladas.....	57

RESUMEN

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* (Fol) y *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl) son dos de las más de 100 formas especiales que se conocen de *Fusarium oxysporum*, las cuales ocasionan la enfermedad de la marchitez del tomate. La enfermedad ocasiona pérdidas que oscilan entre 21 y 47%. En Sinaloa, aún no se cuenta con datos de pérdidas ocasionadas por esta enfermedad. Para el control de este hongo, se aplican una amplia gama de fungicidas sintéticos fumigantes y no fumigantes; sin embargo, el uso excesivo de éstos ha provocado daño a la flora y fauna, la reducción de la biodiversidad microbiana y la inducción de patógenos con resistencia ante fungicidas, entre otros efectos adversos. Una alternativa para el control de esta enfermedad es el uso de bacterias aisladas de la rizosfera. En nuestro trabajo, 155 rizobacterias aisladas de suelos agrícolas del valle de Culiacán, Sinaloa se sometieron a pruebas de antagonismo contra las especies de *Fusarium* formas especiales Fol y Forl aisladas de la rizosfera de plantas de tomate de la misma zona. De los aislamientos de rizobacterias, 16 cepas presentaron la capacidad de inhibir el crecimiento micelial *in vitro* de Fol y Forl (M4-1 PDA, M1 RC, M5-1 PDA, M1 PKM, M2 PDA, M3 PDA, M1-2 PDA, M3-2 PDA, M4 PKM, M4-2 PDA, M5-2 PDA, M6 BK, M7-1 PDA, M7-2 PDA, M10-2 PDA y M12 PDA) con un porcentaje de inhibición micelial (% ICM) mayor al 60%, siendo las cepas nombradas como M4-1 PDA y M5-1 PDA las más eficientes al inhibir el crecimiento micelial de Fol hasta en un 84.4%. Los 16 aislados fueron caracterizados por morfología colonial y celular. Para ello, las rizobacterias se cultivaron en agar nutritivo (AN) a 30°C por 48 h y se registró la apariencia, forma, color y elevación de las colonias; se determinó que se trataba de bacilos Gram positivos, con endosporas ovales centrales. Se realizó además la caracterización molecular (ARN de la región 16s), en el cual se encontraron bandas íntegras en el gel de agarosa; sin embargo, se encontraron bandas inespecíficas, por lo cual se aumentó la temperatura de alineamiento. Se concluyó que, de las 155 rizobacterias aislados, solamente el 10% mostraron antagonismo contra *Fusarium* spp. con un (% ICM) mayor al 60%. Se recomienda continuar esta investigación para determinar el potencial como antagonistas contra patógenos causantes de la marchitez vascular del tomate.

Palabras claves: Fol, Forl, Tomate, Rizobacterias, Antagonismo, Bio control...

ABSTRACT

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* (Fol) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl) are two of more than 100 special forms of *Fusarium oxysporum* known to cause tomato wilt disease. The disease causes losses between 21 and 47% in crops produced under open-field and protected agriculture. In Sinaloa, there is still no data reporting the losses caused for this disease. Fungicides application (fumigant and non-fumigant) are used to control this fungal disease, however, excessive use has caused damage to flora and fauna, has reduced microbial biodiversity, and caused resistant strains of plant pathogens, among others negative consequences. The use of biocontrol bacteria isolated from the plant rhizosphere represents an alternative to control this disease. In this research, 155 isolated rhizobacteria obtained from intensive cultivated soils at Culiacan, Sinaloa valley were tested for antagonism capacity against the special forms of Fol and Forl. From rhizobacteria isolates only 16 strains showed the ability to inhibit the mycelial growth of these phytopathogens (M4-1 PDA, M1 RC, M5-1 PDA, M1 PKM, M2 PDA, M3 PDA, M1-2 PDA, M3-2 PDA, M4 PKM, M4 -2 PDA, M5-2 PDA, M6 BK, M7-1 PDA, M7-2 PDA, M10-2 PDA and M12 PDA) showed *in vitro* antifungal activity against Fol and Forl by means of dual cultures, with a percentage of mycelial inhibition (%ICM) greater than 60%, being M4-1 PDA and M5-1 PDA the most efficient, by inhibiting mycelial growth of Fol in 84.4%. The 16 isolates were characterized by colonial and cellular morphology. To do this, the rhizobacteria were grown on nutrient agar (NA) at 30° C for 48 h and the appearance, shape, color and elevation of the colonies were recorded, and it was determined that they were Gram positive bacilli, with central oval endospores. Molecular characterization was also carried out (RNA of the 16s region), in which intact bands were found in the agarose gel; however, non-specific bands were found, so the alignment temperature was increased, and cleaning was performed to obtain better results. It was concluded that only 10% from the 155 rhizobacteria isolated, showed antagonistic capacity against *Fusarium* spp. with a percentage greater than 60% in the inhibition of mycelial growth. It is recommended to continue this research to determine the potential of biocontrol by antagonism of vascular wilting pathogens of tomato.

Key words: Fol, Forl, Tomatoe, Rhizobacteria, Antagonism, Biocontrol ...

1. INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas más consumidas en el mundo, el consumo *per cápita* promedio en países desarrollados y en vía de desarrollo es de 86 g diarios. Se cultiva en más de 100 países para consumo fresco e industrial, la producción mundial en el 2019 fue de 170.750.767 t (FAOSTAT, 2019). El 76% de la producción se concentra en China, India, Estados Unidos, Turquía, Egipto, Irán, Italia, España, Brasil y México (FAOSTAT, 2019). El rendimiento promedio mundial es de 33.98 t/ha, cifra por debajo de la obtenida en áreas con mayor rendimiento y alta tecnificación como Países Bajos, 505,618t/ha; Bélgica, 498,6t/ha; Reino Unido, 424,569 t/ha y Noruega, con 362,18 t/ha (FAOSTAT, 2018).

Se reportan 48 enfermedades importantes en el cultivo del tomate, entre las cuales, destaca la marchitez vascular causadas por Fol, la cual representa una de las más de 100 formas especiales que se conocen de *Fusarium oxysporum*. Esta enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en el mundo. Para su control se han reportado numerosas prácticas de manejo enfocadas, especialmente hacia el suelo, sin embargo, son pocos los reportes acerca del manejo integrado de la enfermedad, incluido el uso de bacterias benéficas de la rizosfera para su control (Gordon, 2017). Las rizobacterias son bacterias que habitan en la rizosfera, descrita por Hiltner en 1904 como el área del suelo que se encuentra unida a la raíz y que se extiende a pocos milímetros de la superficie del sistema radicular, la rizosfera se caracteriza por albergar una gran diversidad de microorganismos que estimulan el crecimiento de la planta y reducen la incidencia de enfermedades. Siendo esta área donde se dan las mayores interacciones entre las rizobacterias y los patógenos, ya que son atraídos por los exudados radiculares (Kloeppler y Schroth, 1978; Do Carmo *et al.*, 2011; Molina-Romero *et al.*, 2015). Kloeppler y Schroth (1981) designaron a este grupo bacteriano como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés: Plant Growth Promoting Rhizobacteria).

Las PGPR desempeñan una función importante al establecer relaciones simbióticas mutualistas con las plantas, en las cuales, las rizobacterias mejoran el crecimiento, la tolerancia al estrés ambiental, la producción y la salud de las mismas, mediante una amplia variedad de mecanismos moleculares (Malik y Sindhu, 2011); mientras que, por su parte las plantas proveen a los microbios de un medio con humedad poco variable y exudados radiculares compuestos por aminoácidos,

ácidos grasos, nucleótidos, ácidos orgánicos, fenoles, reguladores de crecimiento, esteroides, azúcares y vitaminas, entre otros, que constituyen un ambiente ideal para su desarrollo y acción (Albareda *et al.*, 2006; Rives *et al.*, 2007; Molina-Romero *et al.*, 2015).

Las rizobacterias han sido ampliamente estudiadas en las últimas décadas, debido principalmente a su capacidad para potencializar la producción de diversos cultivos de interés agrícola (Angulo *et al.*, 2014). Entre los mecanismos más estudiados por los cuales logran este efecto, destacan: capacidad para fijar nitrógeno atmosférico (Annan *et al.*, 2012), solubilizar fosfatos inorgánicos (Ahemad y Kibret, 2013), producir fitohormonas que promueven un desarrollo vegetativo más vigoroso (Aguilar-Piedras *et al.*, 2008; Ortíz-Castro *et al.*, 2009; Camelo *et al.*, 2011; Vilchez y Manzanera, 2011), antagonismo contra fitopatógenos (Bloemberg y Lugtenberg, 2001; Molina-Romero *et al.*, 2015), producción de compuestos volátiles que estimulan el crecimiento (Farag *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2017), modulación del estrés bajo diferentes condiciones (Stearns *et al.*, 2012; Vacheron *et al.*, 2013); así como, inducir mecanismos de resistencia sistémica (RSI) frente a fitopatógenos (Bordiec *et al.*, 2011; Poupin *et al.*, 2013; Molina-Romero *et al.*, 2015), entre otros. Por lo tanto, el objetivo general de este trabajo fue aislar microorganismos antagonistas contra *Fusarium* spp. en el cultivo de tomate.

En Sinaloa el tomate es el cultivo de mayor importancia económica, por lo que la marchitez del tomate representa un problema de importancia agrícola y económica. El uso indiscriminado de fungicidas ocasiona problemas a la flora y fauna, reducción de la biodiversidad microbiana, resistencia ante fungicidas, entre otros. Una alternativa para el control de esta enfermedad es el uso de bacterias benéficas aisladas de la rizosfera. Por lo tanto, el objetivo general de este trabajo fue aislar y estudiar las características coloniales y morfológicas de microorganismos antagonistas contra *Fusarium* spp. en el cultivo de tomate.

2. ANTECEDENTES

2.1 Importancia del Tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas más consumidas en el mundo, el consumo per cápita promedio en países desarrollados y en vía de desarrollo es de 86 t diarios. Se cultiva en más de 100 países para consumo fresco e industrial, la producción mundial en el 2019 fue de 170.750.767 t (FAOSTAT, 2019). El 76% de la producción se concentra en China, India, Estados Unidos, Turquía, Egipto, Irán, Italia, España, Brasil y México (FAOSTAT, 2019). El rendimiento promedio mundial es de 33,98 t/ha, cifra por debajo de la obtenida en áreas con mayor rendimiento y alta tecnificación, como Países Bajos, 505,618t/ha; Bélgica, 498,6t/ha; Reino Unido, 424,569 t/ha y Noruega, con 362,18 t/ha (FAOSTAT, 2018).

Se reportan 48 enfermedades importantes en el cultivo de tomate, entre las cuales destaca la marchitez vascular causada por *Fol Hansen*, que es una de las más de 100 formas especiales que se conocen de *Fusarium oxysporum*, de amplia distribución mundial del cual se desconoce su teleomorfo (Gordon, 2017).

Esta enfermedad ocasiona pérdidas entre 21 y 47% tanto en cultivos a libre exposición; así como, bajo cubierta (Ramyabharathi *et al.*, 2012; Enespa y Dwivedi, 2014). En Sinaloa, aún no se tienen datos de pérdidas por esta enfermedad. Cuando este patógeno ataca plántulas, ocasiona lo que se conoce como mal del talluelo que se caracteriza por la carencia de lignina en el tallo y un aumento en la susceptibilidad, lo cual permite que el patógeno alcance rápidamente los vasos del xilema, la destrucción y el colapso del tejido (Agrios, 2005). El tejido vascular de una planta enferma se torna de color pardo oscuro, con mayor presencia en el punto de unión del peciolo con el tallo. Este color es característico de la enfermedad y se emplea para su identificación; la médula permanece sana y, ocasionalmente se infecta el fruto causando una decoloración del tejido vascular interno (Jones, 1991).

Cuando el hongo ataca a plantas adultas, la enfermedad se conoce como marchitez vascular. Las plantas muestran amarillamiento, que inicia por las hojas inferiores y, por lo general, mueren. La base del tallo adquiere un color oscuro y los haces vasculares se tornan de color pardo oscuro. Una

o varias ramas pueden mostrar síntomas; en ocasiones, las hojas presentan marchitez en los folíolos de un lado del pecíolo, mientras que los del lado opuesto se ven sanos. La marchitez del follaje es más notable después de la floración y cuajamiento de los frutos y durante los períodos más calurosos del día. Los síntomas son exacerbados por temperaturas altas, alrededor de 28°C, por pH bajo del suelo y uso de fertilizantes amoniacales (Mc Govern y Datnoff, 1992).

El hongo produce clamidosporas, microconidios y macroconidios. Los macroconidios se han relacionado con la diseminación aérea, lo que sugiere una fase policíclica, no común en patógenos habitantes del suelo (Katan *et al.*, 1997). El micelio sobrevive en residuos vegetales, como saprófito y en hospedantes alternos. Las clamidosporas permiten al hongo sobrevivir por largo tiempo; se producen a partir de la modificación de hifas o células conidiales. La formación de clamidosporas está relacionada con factores de estrés, como la ausencia del hospedante, agotamiento de nutrientes y ambientes adversos (Smith, 2007). Las clamidosporas germinan en condiciones favorables, incluyendo la presencia de exudados radicales. Se ha demostrado que las clamidosporas resisten temperaturas altas y sobreviven más tiempo en el suelo que los conidios, además que causan síntomas más severos que los microconidios (Mc Govern, 2015).

La forma especial Fol infecta solo a plantas de tomate susceptibles (Inami *et al.*, 2014); no obstante, Fassihiani (2000) comprobó que esta forma especial es capaz de colonizar las raíces de plantas pertenecientes a otros géneros, como *Oryzopsis*, *Digitaria*, *Amaranthus* y *Malva*; además de plantas de zanahoria, trigo, varias especies de pastos, berenjena y chile. Según este investigador, aunque el patógeno puede colonizar a varias especies, solo se observaron síntomas de retraso en el crecimiento, no de marchitez, en algunas especies del género *Malva*, en berenjena y chile, estas últimas pertenecientes a la familia Solanaceae.

El hongo también sobrevive en el suelo, como saprófito o en restos vegetales, donde se mantiene viable hasta por 10 años (Kant *et al.*, 2011). Cuando una planta sana crece en suelo infestado por el hongo, el contacto con las raíces induce a la germinación de los conidios, el tubo germinativo de la espora o el micelio penetra directamente por el ápice de las raíces o ingresa a éstas, a través de heridas o de los puntos de formación de las raíces laterales. El micelio avanza por medio del córtex de las raíces intercelularmente y cuando alcanza los vasos conductores del xilema entra por los extremos. El micelio permanece en los vasos y se transloca a través de ellos, principalmente, hacia arriba, hacia el tallo y la corona de la planta (Agrios, 2005). En los vasos, el micelio se ramifica y produce microconidios, que son liberados y llevados hacia el ápice en la corriente de la savia. Los

microconidios germinan en el punto donde el movimiento se detiene, el micelio penetra la pared superior del vaso y se producen más microconidios en el vaso próximo. El micelio también avanza lateralmente, dentro de los vasos adyacentes, penetrando por los extremos. La combinación de estos procesos, llamado taponamiento de los vasos por micelio, esporas, gel, gomas y tílides y el aplastamiento de los vasos por proliferación de células adyacentes de parénquima, es la responsable de la marchitez. Luego el hongo invade todos los tejidos vegetales, alcanzando la superficie externa de la planta muerta y allí esporula. Las esporas pueden ser diseminadas a nuevas plantas por el viento, el agua y así, sucesivamente. *Fusarium*, se disemina a distancias cortas, mediante el agua, equipos agrícolas y herramientas infestadas por el hongo y a distancias largas, por medio de plantas enfermas o suelo adherido a ellas. Una vez que el suelo es infestado, permanece así indefinidamente (Dixon y Tilston, 2010).

Debido a que el hongo se establece como endófito en células y tejidos vasculares, se dificulta su control (Hossain *et al.*, 2013), lo que sugiere un manejo integrado que permita reducir la población del patógeno y obtener los rendimientos necesarios para un cultivo rentable.

Dentro de las estrategias de manejo están la aplicación de fumigantes al suelo, uso de cultivares resistentes y prácticas culturales, como embolsado conteniendo suelo esterilizado, solarización, rotación de cultivos y desinfestación de estacones. La desinfestación del suelo con bromuro de metilo era la práctica más común hasta que su uso fue proscrito, debido a que, en 1993, el Protocolo de Montreal clasificó a este producto como degradador del ozono clase I, ordenando su retiro del mercado en el 2005 (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2022).

El uso de variedades resistentes reduce la incidencia de la enfermedad; sin embargo, la emergencia de nuevas razas del hongo y de nuevos biotipos dentro de las razas, supera su resistencia, conllevando a la búsqueda de nuevas estrategias (Horinouchi *et al.*, 2011).

Pocos estudios han reportado resultados cuantitativos sobre las rizobacterias presentes en cultivos y su potencial biotecnológico agrícola. Ahmed *et al.* (2014) aislaron 112 cultivos bacterianos de algunas plantas medicinales como: *Ocimum basilicum*, *Marrubium vulgare*, *Melissa officinalis*, *Origanum syriacum*, *Quisqualis indica*, *Solidago virgaurea*, *Melilotus officinalis*, *Cymbopogon citratus*, *Matricaria chamomilla*, *Thymus vulgaris* y *Majorana hortensis* demostrando su enorme potencial biotecnológico. Esto debido a que 36 de las cepas mostraron capacidad para producir AIA (Ácido Indolacético), la fitohormona que estimula la elongación de la raíz, 25 cepas produjeron HCN (ácido cianhídrico), 57 cepas mostraron actividad quitinasa contra hongos

fitopatógenos, 39 solubilizaron fósforo (P) y 105 solubilizaron potasio (K). P y K son macroelementos indispensables para el desarrollo vegetativo. Las cepas que mostraron mayor promoción en el crecimiento vegetal pertenecieron a los géneros *Bacillus*, *Azotobacter*, *Pseudomonas* y algunos actinomicetos. En otro estudio Ordookhani et al. (2011) reportaron un incremento en el número de raíces, peso seco de raíz, y contenido de N, P, K y aceites esenciales en *Ocimum basilicum* inoculado con *Pseudomonas putida* y *Azotobacter chroococcum*. La actividad de las PGPR ha sido reportada para cepas de muchos géneros como: *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Gluconoacetobacter*, *Pseudomonas* y *Serratia* (Somers et al., 2004). Algunos géneros como *Azospirillum* spp y *Pseudomonas* spp han sido aislados de una gran variedad de cultivos en todo el mundo, y han logrado potencializar el crecimiento en una gran diversidad de cultivos agrícolas de importancia económica, tales como: maíz, soya, lechuga, algodón, pimiento, entre otros (Guzmán et al., 2012). LunaMartínez et al. (2013) aislaron e identificaron cepas de *Bacillus megaterium* y *Bacillus subtilis* de la rizosfera de plantas de tomate, demostrando su capacidad para promover el crecimiento mediante la producción de AIA; así como, el aumento en la germinación en semillas de pimiento y tomate. Otro ejemplo claro es la investigación que se ha realizado sobre la fijación biológica del nitrógeno en la simbiosis entre *Rhizobium* y leguminosas que ha logrado aumentar considerablemente la productividad del cultivo.

2.2 Microorganismos Fijadores de Nitrógeno

Uno de los nutrientes indispensables para la producción agrícola es el nitrógeno, del cual alrededor el 78% se encuentra en la atmósfera en forma de gas (N_2 o nitrógeno molecular) aunque las plantas no utilizan esta forma para su metabolismo debido a que no pueden fijarlo (Döbereiner, 1997).

Otra forma para obtener dicho nutriente es por fijación biológica del nitrógeno llevada a cabo por bacterias denominadas diazotróficas (Martínez, 2003). Dichas bacterias convierten la molécula de nitrógeno atmosférico en amonio rompiendo el enlace doble gracias a la actividad de la enzima nitrogenasa (Okon y Vanderleyden, 1998). Esta fijación biológica de nitrógeno (FBN) no conlleva los daños al subsuelo, mantos freáticos ni esterilidad del suelo, que producen como efecto

secundario los fertilizantes químicos sintéticos, dando un valor agregado para los productores, principalmente en los que cultivan orgánicos.

Dichas bacterias además de fijar nitrógeno, promueven el desarrollo de las plantas por lo que se les conoce también como PGRP (Baldani *et al.*, 1997). Esta actividad la llevan a cabo mediante la producción de sustancias favorables para el desarrollo de las plantas como por ejemplo giberelinas (Arshad y Frankenberger, 1998; Khalid *et al.*, 2004; Carcaño *et al.*, 2006). Algunos ejemplos de géneros de bacterias del grupo PGRP asociadas con gramíneas son: *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas* y *Acetobacter* (Dobbela *et al.*, 2003).

Acetobacter es un género de bacterias que presenta desde células elipsoidales a bacilos, que miden de 0.6 a 4 micras, movilidad variable, aerobias obligadas, metabolismo oxidativo, catalasa positiva, oxidasa negativa y crecen bien en sales de ácidos orgánicos tales como el acetato y el lactato. Son acidófilas, crecen a pH tan bajos como 4, con un crecimiento óptimo entre 5 y 6. La temperatura óptima de crecimiento oscila entre 25 y 30 °C (Dobereiner, 1995). La proporción molecular de G+C del DNA es aproximadamente 51-65 % (Ley *et al.*, 1984; Favela *et al.*, 2006) *Acetobacter diazotrophicus* es una especie fijadora de nitrógeno, produce ácido indol acético (AIA) el cual favorece el crecimiento de la raíz del cultivo, el cual se ha utilizado como biofertilizante en caña de azúcar (Cavalcante y Dobereiner, 1988; James y Olivares, 1998).

Otro género de bacterias del grupo PGRP es *Herbaspirillum* que presenta células Gram negativa, vibroide y a veces helicoidal, mide de 0.6 a 0.7 micras, presenta un metabolismo oxidativo y no fermenta azúcares, bajo condiciones microaerófilas es fijador de nitrógeno, oxidasa, catalasa y ureasa positivo. Utiliza ácidos orgánicos como fuente de carbono como citrato, fumarato, succinato y piruvato. Utiliza varios azúcares como glucosa, galactosa, glicerol, crece en un pH de 5.3 a 8 (Baldani, 1986). Esta bacteria se ha aislado como endófito en la rizosfera y en las hojas de cultivos de gramíneas (Urquiaga *et al.*, 1992). La inoculación en cereales con *Herbaspirillum* sp. y *Azospirillum* sp. pueden incrementar el desarrollo y la producción del grano (Okon, 1985). Se ha reportado la producción de sustancias con efecto fitohormonal a partir de *Herbaspirillum* sp. como ácido indol acético (AIA) y giberelinas que ayudan a aumentar el rendimiento (Bastian, 1998).

Azotobacter es un género de bacterias Gram negativa con forma de bacilo, aeróbica mayormente pero en algunas ocasiones se muestra como anaeróbicas, con metabolismo oxidativo a variable, catalasa positiva, oxidasa variable, degrada carbohidratos como la glucosa o lactosa, produce colonias fluorescentes o amarillas, su pH óptimo es de 7 a 7.5 no se desarrolla a pH 4 a 5. Utiliza

nitrito, amonio y algunos aminoácidos como fuente de carbono, fijador de nitrógeno por lo cual necesita molibdeno o vanadio y es no proteolítica (Whitman *et al.*, 2012). *Azotobacter sp.* inoculado en trigo aumentó la producción en 30 a 45% comparado con la inoculación con *Bacillus* (Kloepper y Schroth, 1978). Además, produce ácido indol acético (AIA), por lo cual aumenta el peso seco de las hojas y raíces en varios cultivos de gramíneas como trigo y maíz, después de inocular sus raíces (Barbieri *et al.*, 1986).

El género *Pseudomonas* son bacterias Gram negativas, aerobias, móviles a variable, no son formadores de esporas, con una amplia capacidad metabólica y pueden utilizar distintas fuentes de carbono y carbohidratos, catalasa positiva (Whitman *et al.*, 2012). *Pseudomonas* aumenta el rendimiento de grano y el peso seco del mismo inoculado en gramíneas como el trigo, inoculando *Pseudomonas sp.* únicamente o en combinación con *Glomus sp.* (Kumar y Dube, 1992; Valdivia-Urdiales *et al.*, 1999).

El género *Azospirillum* presenta células vibroides gruesas, o bacilos rectos, con gránulos de poli B hidroxibutirato y móviles por un único flagelo polar. Algunas cepas forman colonias de color rosa pálido o rojo en agar NFB rojo congo (Rodríguez, 1982) Las condiciones óptimas para su desarrollo es una temperatura de 34 a 37 °C y un pH de 7.0 aunque algunas cepas prefieren uno más ácido, una fuente de nitrógeno fijado por ejemplo las sales de amonio. Su metabolismo es respiratorio con oxígeno, algunas utilizan nitratos como aceptor de electrones. Su habilidad fermentativa aunque débil, también ocurre. Bajo condiciones de oxígeno limitado algunas cepas pueden convertir nitratos a nitritos u óxido nitroso a nitrógeno molecular. Se desarrollan bien en sales de ácidos orgánicos como malato, succinato, lactato y piruvato. Algunos carbohidratos también pueden ser utilizados. Algunas cepas requieren biotina. No inducen la formación de nódulos en las raíces (Whitman *et al.*, 2012).

Azospirillum sp. ha demostrado aumentar el peso seco, el nitrógeno total, la producción y peso de los granos y el grado de germinación tanto en invernadero como de campo abierto (Bashan, 1996; Pandey, 1998). Dicho microorganismo se puede aislar tanto de rizosfera, como de suelo y también se ha logrado el aislamiento de cepas endófitas (Hernández *et al.*, 2002; Rangel *et al.*, 2011). En condiciones de invernadero se inoculó *Azospirillum* en trigo, cebada y avena, logrando disminuir los costos de producción en cebada al suplementar el 20% de uso de fertilizante (González *et al.*, 2011); además, de un aumento de hasta 9% en la producción de grano en trigo (Dalla *et al.*, 2004). En pruebas de invernadero una cepa de *Azospirillum brasilense* nativa del norte de Tamaulipas,

México la cual produjo una cantidad de auxinas in vitro superior a otras dos cepas nativas, tuvo un efecto de incremento desde 20 hasta 90% en la producción de biomasa de tres híbridos de maíz en comparación con los materiales no inoculados (García-Olivares *et al.*, 2007).

2.3. Microorganismos Solubilizadores de Potasio (K)

La actividad de ciertos microorganismos que habitan el suelo es de vital importancia en los ciclos del carbono, nitrógeno, azufre y fósforo; también para la movilización de potasio, magnesio y otros minerales aprovechables por las plantas. El potasio se encuentra retenido en la solución del suelo. Puede formar iones, estar en forma cambiante, inmovilizado entre las láminas de filosilicatos o formando parte de las estructuras minerales tales como feldespatos o micas. El Área de Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Extremadura (2006), indica que este elemento también puede hallarse en forma orgánica en los restos vegetales y en células microbianas. Tan solo una parte de él es soluble y otra es no intercambiable (Correa, 2013).

El potasio en el suelo, junto con otros elementos minerales, puede ser liberado debido a la erosión. Los minerales feldespáticos tienen origen ígneo y son fácilmente erosionados, aunque también pueden intervenir algunos ácidos orgánicos y ácidos polisacáridos de origen microbiológico. Estos ácidos pueden ser también de origen abiótico; sin embargo, la mayoría son bióticos, siendo orgánicos o inorgánicos. Muchos de estos ácidos orgánicos capaces de erosionar feldespatos se producen de forma anaerobia por fermentación bacteriana (Sugumaran y Janarthanam, 2007).

A pesar de la dificultad de interpretar los complejos procesos ocurridos en la naturaleza con experimentos de laboratorio, es posible obtener información sobre los principios básicos de disolución o solubilización de potasio por bacterias, mediante trabajo experimental. Varios estudios de laboratorio sugieren que los ácidos producidos por distintos microorganismos pueden promover la disolución de diferentes tipos de minerales. En la investigación realizada por (Sugumaran y Janarthanam, 2007) un mecanismo empleado por las bacterias analizadas para disolver feldespato, fue la oxidación parcial de glucosa a ácidos orgánicos. De forma directa, los ácidos orgánicos pueden incrementar la disolución mediante un mecanismo de protones o de ligandos. De manera indirecta son capaces de mejorar la disolución a través de la formación de complejos que

reaccionan en la solución, cuyos productos incrementan la afinidad química de la reacción general de disolución de feldespato.

Los microorganismos capaces de destruir las estructuras minerales que contienen potasio son diversos. Entre ellos se encuentran bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Clostridium* y hongos tales como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Mucor*. Estos microorganismos en conjunto con otros géneros y especies, poseen actividad funcional y actúan de varias formas solubilizando minerales como el potasio acomplejado con distintas matrices minerales en el suelo, por lo que cumplen un papel fundamental en la nutrición radicular de las plantas (Correa, 2013).

Bacterias como *Bacillus mucilaginosus* y *Bacillus siliceus* atacan la biotina, moscovita y ortoclasas (Urbano, 2003). Sugumaran y Janarthanam (2007) realizaron un estudio en el que analizaron la solubilización de potasio de distintos minerales que contienen este elemento (microclina, ortoclasa y moscovita), y demostraron que *Bacillus mucilaginosus* libera potasio de moscovita con mayor facilidad que de otros minerales; aunque el mecanismo de liberación no está claro. Esta bacteria podría producir ácidos, álcalis o quelantes que actuarían sobre los minerales potásicos. Por otro lado, y a pesar de que su papel no está definido, la producción de exopolisacáridos podría estar involucrada en el mecanismo principal de liberación de potasio de silicatos.

La investigación realizada por Liu et al. (2006) también desarrollada con *Bacillus mucilaginosus* reporta que esta bacteria es capaz de extraer K^+ y SiO_2 a partir de minerales sólidos de silicatos excepto a los feldespatos (tectosilicatos). *B. mucilaginosus* produce durante el crecimiento, ácidos orgánicos y polisacáridos. Hay dos procesos que induce la bacteria para la descomposición de los minerales de silicato. En uno de estos procesos, los polisacáridos adsorben fuertemente los ácidos orgánicos y se fijan a la superficie del mineral, dando como resultado un área de gran concentración de ácidos orgánicos cercanos al mineral. En el otro proceso los polisacáridos adsorben SiO_2 , esto afecta el equilibrio entre las fases mineral y fluida y conduce a la reacción hacia la solubilización de K^+ y SiO_2 .

Otro microorganismo capaz de liberar potasio de minerales que lo contienen es el hongo termofílico *Aspergillus fumigatus*. Aparentemente, este hongo promueve la liberación de potasio por lo menos con tres rutas diferentes. La primera a través de la formación de complejos de ligandos orgánicos solubles, otra forma recurre a biopolímeros inmóviles; tales como las secreciones de componentes insolubles y la tercera ruta relaciona las fuerzas mecánicas en asociación con el contacto directo físico entre células y partículas minerales (Lian et al., 2007). En algunas

investigaciones el hongo *Trichoderma viridae* ha sido asociado a la solubilización de potasio (Arévalo, 2009).

Una bacteria solubilizadora de potasio empleada en biofertilizantes es *Frateruria aurentia*, puede actuar en cualquier tipo de suelo en el área rizosférica, movilizándolo el potasio hacia la planta. Este microorganismo se desarrolla empleando carbono, azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos, que pueden ser del suelo o de exudados radiculares.

2.4. Microorganismos Solubilizadores de Fósforo (P)

El contenido de fósforo (P) en los suelos varía entre 200 y 5000 mg Kg⁻¹, con un promedio de 600 mg Kg⁻¹ (Arai y Sparks, 2007; Sharpley, 2012), incluyendo formas inorgánicas (Pi) y formas orgánicas (Po). De manera general la disponibilidad de P en el suelo para la nutrición de las plantas depende de tres procesos principales que afectan la concentración del P en la solución del suelo (Pierzynski, 2005):

- a) Disolución/precipitación (equilibrio mineral)
- b) Adsorción/desorción (interacciones entre el P en solución y las superficies sólidas del suelo)
- c) Mineralización / inmovilización (conversiones mediadas biológicamente entre formas orgánicas e inorgánicas del P)

Desde una perspectiva nutricional, el P disponible para las plantas es el fosfato inorgánico (Pi) presente en la solución del suelo como iones ortofosfato, procedentes de la mineralización de materiales orgánicos y la solubilización de fuentes minerales (Gojon *et al.*, 2009) cuya concentración, como se mencionó, varía en forma considerable temporal y espacialmente (200 - 5000 mg P Kg⁻¹) (Robinson, 2005; Arai y Sparks, 2007; Gojon *et al.*, 2009; Sharpley, 2012).

Como respuesta evolutiva a la baja disponibilidad del P en los suelos, las plantas desarrollaron diferentes estrategias morfológicas, bioquímicas y simbióticas adaptativas para incrementar la adquisición del Pi y/o para mejorar la eficiencia de su utilización interna (Vance *et al.*, 2003; Lambers *et al.*, 2006; Lambers *et al.*, 2011), entre las más importantes la asociación de la raíz con microorganismos del suelo capaces de mineralizar y/o solubilizar las fuentes de P orgánicas e inorgánicas, respectivamente.

2.4.1. Los Microorganismos como Fuente y Dinamizadores del P en el Suelo

Los organismos involucrados en las transformaciones del P en el suelo incluyen bacterias, hongos, chromista, protozoos y algunos nematodos (Oberson y Joner, 2004; Awasthi *et al.*, 2011; Bünemann *et al.*, 2011; Jones y Oburger, 2011). En general, los microorganismos del suelo dinamizan el ciclo del P a través de procesos de mineralización, inmovilización y solubilización, los cuales están relacionados con su metabolismo nutricional. Debido a que las fuentes orgánicas no son utilizadas directamente para la nutrición microbiana, éstas deben primero hidrolizarse por la acción de enzimas fosfatasas, producidas y secretadas al suelo por los microorganismos (Singh y Satyanarayana, 2012). La revisión de Nannipieri *et al.* (2011) analiza exhaustivamente la naturaleza y roles de las fosfatasas en el suelo. Entre los factores que influyen la mineralización e inmovilización del P en el suelo se incluyen la naturaleza química de la materia orgánica y su reactividad asociada, la cantidad de P, la proporción C:P y N:P de los materiales orgánicos, la temperatura, la humedad, la aireación, el pH, la intensidad de cultivo y la fertilización con P (Condrón, 2004; Sims y Vadas, 2005). Es importante considerar que, además de mediar varios procesos clave en el ciclo biogeoquímico del P, los microorganismos constituyen en sí mismos una importante reserva de P en el suelo (Chuang *et al.*, 2007).

La solubilización del P del suelo es el proceso por el cual las reacciones de precipitación se revierten, liberando P en la solución del suelo, mediado generalmente por la acción metabólica de los microorganismos y las raíces de las plantas. La solubilización del P como una capacidad bacteriana se reconoció ya hace más de un siglo (Gerretsen 1948; Goldstein y Krishnaraj, 2007). Durante las décadas siguientes, varios estudios pusieron en evidencia la capacidad solubilizadora de P de las bacterias *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Arthrobacter*, *Rhodobacter*, *Pantotea* y *Klebsiella*, así como de los hongos *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Fusarium* (Awasthi *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2007; Sharan *et al.*, 2008; Zaidi *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2010).

Las estimaciones de la microflora del suelo con capacidad para solubilizar fosfatos varían ampliamente. Mientras Chabot *et al.* (1993) estimaron que los microorganismos representaban entre el 26% y el 46% de la microflora total de un suelo en Quebec, Bouchard (2002) encontró que

en suelos cultivados con papa los microorganismos solubilizadores de fosfatos podrían representar entre del 4% al 30% de la población total. En suelos de Canadá, Kucey y Legget (1989) detectaron que esta proporción era del 0.5% entre poblaciones de bacterias y 0.1% de la población total de hongos. En un Typic encontraron que las poblaciones de bacterias solubilizadoras de P representaban del 0.18% al 13.3% de las bacterias heterotróficas totales, con una media de 3.8%, sin evidenciar un efecto diferencialmente significativo por las prácticas de manejo. En cualquier caso es evidente que la capacidad solubilizadora de fosfatos está ampliamente distribuida dentro de la taxonomía bacteriana y edáfica.

2.4.2 Mecanismos Responsables de la Solubilización de Fosfatos

Los mecanismos más ampliamente aceptados como responsables de la solubilización microbiana del P mineral son:

- a) Producción de ácidos orgánicos.
- b) Producción de protones (normalmente asociada a la asimilación de NH_4^+ y/o a los procesos respiratorios).
- c) Producción de ácidos inorgánicos y CO_2 .

2.4.3 Solubilización de P por Ácidos Orgánicos

En la mayoría de las bacterias se ha demostrado que la capacidad de solubilización del P está estrechamente relacionada con la producción de ácidos orgánicos resultantes de la respiración oxidativa o de procesos fermentativos microbianos. Desde una perspectiva mecanicista, la acción de los ácidos orgánicos sobre la solubilización del P resulta de tres procesos generales (Antoun, 2012; Chuang *et al.*, 2007; Paredes *et al.*, 2010; Archana *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2010):

- a) La disociación de los ácidos orgánicos libera protones que contribuyen a reducir el pH del suelo y favorecen la disolución de los minerales fosfóricos;
- b) Las reacciones de quelatación en las cuales los componentes aniónicos de los ácidos orgánicos

se intercambian por el grupo ortofosfato de los fosfatos de Ca_2^+ , Fe_3^+ y Al_3^+ , liberándolo en la solución del suelo, y;

c) El desplazamiento de los fosfatos adsorbidos no específicamente sobre las partículas sólidas del suelo, por las componentes aniónicas de los ácidos orgánicos.

Varios ensayos han demostrado que la inoculación con hongos y bacterias solubilizadoras de P pueden incrementar el rendimiento o el crecimiento de las plantas en invernadero y campo (Chuang *et al.*, 2007; Valverde *et al.*, 2006). Supanjani *et al.* (2006) y Han *et al.* (2006), reportaron que la aplicación de *Bacillus megaterium* var *phosphaticum* (Bmp) en conjunto con roca fosfórica (RF), produjo incrementos en varios parámetros de crecimiento y rendimiento en cultivos de chile y pepino bajo condiciones de invernadero y campo. Cuando en invernadero el sustrato de siembra se inoculó con la bacteria y se fertilizó con RF 3 g kg^{-1} , los contenidos de N, P y K en la materia seca de tallo y raíz de chile fueron mayores y significativamente diferentes de los obtenidos por el tratamiento control sin RF ni Bmp. También se obtuvieron incrementos significativos, pero menores a los anteriores, cuando sólo se aplicó Bmp. Si además de RF y Bmp se inoculó con bacterias solubilizadoras de K (BSK) y se adicionó illita (polvo mineral de la arcilla incoloro con luz transmitida), el tratamiento incrementó los contenidos de N, P y K en los tallos y en las raíces. Este último tratamiento también aumentó la fotosíntesis foliar en 20% en el chile y 16% en las plantas de pimiento en relación con el control (Han *et al.*, 2006).

En el mismo experimento, los ensayos en campo, demostraron también un efecto benéfico de las MSF. Cuando se aplicó RF y Bmp como inoculante al suelo en dos años consecutivos, se obtuvieron en ají, incrementos significativos en la biomasa total y rendimiento de fruta. Estos rendimientos no fueron estadísticamente diferentes de los logrados con la aplicación de un fertilizante altamente soluble, los cuales incrementaron las variables entre el 21% y el 35% (Han *et al.*, 2006) ya sea solas o en combinación con BSK, RF y polvo de Illita, las Bmp aumentaron, además de la tasa fotosintética, el área foliar y los contenidos de N, P y K en las plantas tratadas.

2.4.3 Factores que Determinan la Eficacia de la Bioinoculación

Cualquier acción práctica de biofertilización que pretenda ser efectiva, debe considerar invariablemente la ecología de la rizosfera, en la cual se desenvuelven los MSF, pues en

condiciones de campo, la efectividad de los inoculantes depende de la capacidad de los aislados para colonizar la rizosfera y mantener en ella una alta actividad (Rodríguez y Fraga, 1999).

Las características identificadas como importantes para la competencia de los aislados inoculados en la rizosfera incluyen: motilidad, alta tasa de crecimiento, habilidad para sintetizar aminoácidos y vitamina B1, habilidad para utilizar ácidos orgánicos y ciertas proteínas de superficie celular; así como, rápido ajuste a las condiciones cambiantes del ambiente edáfico (Marschner, 2007). En relación con las condiciones del suelo, el pH, salinidad y temperatura, entre otros, especialmente en condiciones de estrés, determinan en diferentes características, tales como solubilizadores de P, combinados con diazótrofos o con hongos micorrícicos arbusculares, arrojan efectos superiores a la inoculación con únicamente el MSF (Valverde *et al.*, 2006; Babana y Antoun, 2007).

Leaungvutiviroj (2010) demostró que bajo condiciones de invernadero, la inoculación de maíz y brócoli chino con una mezcla de una cepa solubilizadora de P de *Burkholderia unamae* + *Bacillus subtilis* (BSK) + el diazótrofo *Azotobacter tropicalis* + la cepa KJB9, productora de auxinas, generó un incremento del peso seco de 4.14 a 8.76 g planta⁻¹ en el caso del maíz, y de 11.1 a 40.8 g planta⁻¹ en el caso del brócoli. Cuando, además de la mezcla de los microorganismos se adicionó RF y polvo de feldespatos, la masa seca aumentó a 10.2 g planta⁻¹ en el maíz, y 79.9 g planta⁻¹ en el caso del brócoli, un aumento de casi 4 y 7 veces, respectivamente.

Collavino et al. (2010) no encontraron efectos sobre el peso de la materia seca de la raíz o del tallo de frijol, o sobre el tamaño del área foliar, cuando *Burkholderia* se aplicó sola o en combinación con una fuente de P. Sin embargo, la relación de materia seca de la raíz/materia seca del tallo presentó un menor valor absoluto, lo que hace presumir que la planta invirtió menos fotosintatos en desarrollo del sistema radical, dado que había mayor disponibilidad de nutrientes, especialmente P, en la zona rizosférica.

Valverde et al. (2006) estudiaron el efecto de la inoculación con *Pseudomonas jessenii* PS06, bacteria solubilizadora de P, y el diazótrofo *Mesorhizobium ciceri* C-2/2, solos o en combinación, sobre el crecimiento de garbanzo. En invernadero, la inoculación con sólo C-2/2 produjo la más alta masa seca en la planta (24% mayor al testigo sin inocular) y la inoculación con PS06 resultó en una masa seca 14% mayor que el testigo no inoculado, aunque no se detectó correlación con el contenido de P en los tallos. La coinoculación con las dos cepas produjo a su vez reducción en la masa seca del garbanzo, en relación con la inoculación con únicamente C-2/2. En condiciones de campo, las plantas inoculadas con C-2/2 solo o en combinación, produjeron una mayor masa fresca

de los nódulos, mayor número de nódulos y más alto contenido de N. Aunque la inoculación con PS06 no tuvo efecto significativo sobre el crecimiento de las plantas, la coinoculación produjo mayor rendimiento en semillas (54% mayor al testigo sin inocular) y mayor masa fresca de los nódulos. Los resultados contrastantes de la coinoculación en invernadero y campo pueden deberse, según los autores, a diferencias en el sustrato (perlita vs. suelo) de siembra y/o a las condiciones climáticas.

Estudios registrados por Babana y Antoun (2007), demostraron que el uso simultáneo de hongos vesículo arbusculares (VAM) y diferentes MSF como inoculantes, produjo respuestas positivas en varios parámetros agronómicos evaluados sobre plantas de trigo fertilizadas con roca fosfórica. Otros resultados similares han sido informados por Rodríguez y Fraga (1999) para el caso de bacterias y por Whitelaw, 1999; Khan *et al.*, 2007; Sahoo y Gupta, 2014, en el caso de hongos solubilizadores de fosfato.

Por último, conviene señalar que el potencial de uso de los MSF como alternativas a la fertilización tradicional se explota con fines comerciales en el mundo. En Australia, formulados a base de *Penicillium bilaiae* y *Penicillium radicum* se han liberado exitosamente como inoculantes comerciales (Wakelin *et al.*, 2004); de los cuales, *Penicillium bilaiae* se comercializó en Canadá bajo la marca JumpStart®. El producto comercial se registró para uso en trigo en 1990, año en el cual sólo se utilizó en unas pocas hectáreas. Para el 2002, aproximadamente un millón de hectáreas sembradas con los principales cultivos de Canadá utilizaban el biofertilizante (Leggett *et al.*, 2007). En Cuba, Fosforina® es un bioinoculante a base de *Pseudomonas fluorescens* aplicado principalmente en tomate (Uribe *et al.*, 2010). En Colombia, actualmente se comercializa Fosfosol®, cuyo ingrediente activo es *Penicillium janthinellum*, dirigido especialmente al cultivo del arroz, con incrementos del rendimiento entre el 5% y el 38%, con respecto a cultivos no inoculados (Rojas y Moreno, 2008; Moreno *et al.*, 2007).

2.5 Microorganismos Antagonistas

Existen grupos de microorganismos que presentan efectos antagónicos hacia otros microorganismos, esta acción puede ser aprovechada como forma de control biológico de los

patógenos vegetales. Entre los más importantes se encuentran los hongos de los géneros *Gliocladium* y *Trichoderma* y bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*. *Trichoderma* es uno de los más utilizado para el tema del control biológico. El efecto principal de este es por hiperparasitismo ya algunas especies pueden producir metabolitos bioactivos que ayudan a incrementar su mecanismo de acción. En el mundo biológico existe una interacción continua entre los patógenos potenciales y sus antagonistas, de forma tal que estos últimos contribuyen a que en la mayoría de los casos no se desarrolle la enfermedad. En condiciones naturales los microorganismos están en un equilibrio dinámico en la superficie de las plantas (Leggett *et al.*, 2007).

2.5.1 Mecanismos de Acción

Se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos. Algunos de estos son antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes, interacciones directas con el patógeno (mico parasitismo y lisis enzimática) e inducción de resistencia sistémica (RSI). No es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los patógenos en la planta. En general, los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de éstos es una característica importante para su selección como agentes de control biológico. Si el antagonista posee varios modos de acción reduce los riesgos de desarrollo de resistencia en el patógeno. Este riesgo de resistencia también se reduce mediante el uso de combinaciones de antagonistas con diferente modo de acción (Uribe *et al.*, 2010).

2.5.1.1 Competencia. Esta constituye un mecanismo de acción antagónica muy importante. Puede definirse como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. Un factor esencial para que exista competencia es la escasez o limitación de un elemento porque si hay exceso no hay competencia (Lazarete *et al.*, 1994).

2.5.1.2 Competencia por nutrientes. La competencia más común es por nutrientes, oxígeno o espacio. *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* son dos hongos de poscosecha típicamente dependientes de los nutrientes, como hongos necrotróficos sus esporas requieren de estas sustancias para germinar y comenzar el crecimiento de las hifas antes de penetrar al sustrato. Esos nutrientes se encuentran en las heridas de las frutas y es allí donde la competencia microbiana actúa inhibiendo el desarrollo de estos patógenos (Lazarete *et al.*, 1994).

2.5.1.3 Competencia por espacio. Este tipo de competencia también ha sido evaluado. Las levaduras son eficaces colonizadoras de la superficie de plantas y se destaca la producción de materiales extracelulares (especialmente polisacáridos) que restringen el espacio para la colonización por otros microorganismos (Brada *et al.*, 1995).

2.5.1.4 Interacción directa con el patógeno. Un tipo de interacción directa entre los antagonistas y los patógenos es el parasitismo. El parasitismo es la acción de un microorganismo parasitando a otro y puede ser definido como una simbiosis antagónica entre organismos. Este consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. Generalmente, están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasa, celulasa, β 1,3- glucanasa y proteasa, que rompen las estructuras de los hongos parasitados. Los ejemplos más conocidos de hongos hiperparásitos son *Trichoderma* y *Gliocladium*. Ambos ejercen su acción mediante varios mecanismos, entre los cuales tiene un rol importante el parasitismo. Los hongos del género *Trichoderma* han sido muy estudiados como antagonistas de patógenos de suelos como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotium cepivorum* y existen varias formulaciones comerciales desarrolladas a partir de ellos (Korsten *et al.*, 1997).

2.5.2 Bacterias Antagonistas

Las bacterias del grupo de *Pseudomonas fluorescens* y las del género *Bacillus* son consideradas las

más eficaces para controlar enfermedades foliares y de las raíces.

Dada la diversidad genética en el género *Bacillus*, tanto en el suelo como en la rizosfera, se considera a estos microorganismos como colonizadores eficaces. Las potencialidades del género *Bacillus* sobre *P. fluorescens* han sido señaladas por (Kin et al,1997), quienes encontraron mayor emergencia y control de patógenos del trigo cuando utilizaron este género.

Estas bacterias se han evaluado para el control de enfermedades fungosas, determinándose que las aplicaciones de *Bacillus subtilis* pre y poscosecha en aguacate tienen un efecto similar al de los fungicidas comerciales (Korsten et al., 1997). Los mejores resultados fueron logrados con un tratamiento integrado que incluía aplicaciones de benomil y oxiclورو de cobre y control biológico, siendo este el primer informe de control biológico pre-cosecha en aguacate. En investigaciones futuras deberán evaluarse el modo de acción de *B. subtilis*, habitante natural del filoplano del árbol de aguacate.

Anteriormente, se desarrolló una formulación de *B. subtilis* para controlar la pudrición radicular del frijol, la cual se evaluó comparando diferentes sustratos y se determinó que en condiciones de laboratorio el tratamiento con turba fue el más eficaz. No obstante, en condiciones de campo la formulación a base de pectina fue la que logró mejor control (Lazarete et al., 1994).

Se determinó el efecto de *Bacillus sp.* sobre la germinación y el desarrollo de semillas de tomate infectadas con *Fusarium oxysporium* var *cubensis* (Brada et al., 1995); también se realizaron pruebas in vitro con *Pseudomonas sp.* y *B. subtilis* aislados de plátano y arroz, respectivamente (Sosa et al., 2006). Estos microorganismos mostraron la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos del suelo, tales como *Fol*, *Pythium ultimum*, *R. solani*, *S. rolfsii*, *Phytophthora nicotianae*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium solani*.

Castellanos et al. (1995) evaluaron *B. subtilis* para el control de *Alternaria porri* en plantas de cebolla, alternando aplicaciones del producto biológico con las de los fungicidas zineb y oxiclورو de cobre, determinándose que los tratamientos que consistían en la combinación de fungicidas sintéticos y biológicos mostraron mejor control que el resto de los tratamientos. Uno de los usos de *B. subtilis* como agente de control biológico es mediante el tratamiento de semillas. Su efecto benéfico cuando se aplica junto a las semillas o en forma individual no se debe exclusivamente al antagonismo con los patógenos, sino que influye positivamente en la germinación, desarrollo y rendimiento del cultivo debido a la producción de sustancias promotoras del crecimiento y al mejoramiento de la nutrición de las plantas. Con respecto a *B. subtilis*, se ha estudiado la liberación

de compuestos con propiedades antifúngicas como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las Iturinas. Estas últimas son polipéptidos que actúan sobre la pared celular de los hongos. Observaron vacuolización y deformación de las hifas de *R. solani* y *P. ultimum* provocadas por la formación de un compuesto volátil con propiedades fungicidas. Estudios como los anteriores demuestran la diversidad de microorganismos que pueden habitar en la rizosfera de los cultivos y la gran cantidad de interacciones que pueden desarrollar con ellos, mostrando su enorme potencial en la biotecnología, principalmente por su habilidad para actuar como biofertilizantes, control de fitopatógenos y promotores de crecimiento.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El tomate (*Solanum lycopersicum*, L.) es una de las hortalizas más consumidas en el mundo y es atacada por numerosas enfermedades, entre las cuales, está la marchitez vascular, causada por Fol. Este patógeno, es un habitante del suelo de difícil control y manejo. Esto ha orientado a la búsqueda de alternativas de control de esta enfermedad, desde un enfoque integrado y amigable con el medio ambiente. Entre las opciones de manejo se encuentra el uso de rizobacterias promotoras de la nutrición y con actividad de biocontrol. En la región productora de Sinaloa, pueden encontrarse poblaciones establecidas de rizobacterias con efectividad de control de Fol cultivables para su uso a mayor escala en la producción agrícola.

4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1. ¿Cuáles son los principales grupos de rizobacterias antagonistas presentes en las plantas de tomate?
2. ¿Cuál es el potencial antagonista de las bacterias nativas de la rizosfera del tomate contra *Fusarium spp*?

5. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El tomate es uno de los cultivos de mayor importancia en la región ya que su producción es de gran importancia económica. *Fusarium oxysporum* es el principal patógeno que ataca el cultivo de tomate causando grandes pérdidas en cuanto a producción y rendimiento. La aplicación de plaguicidas es la principal forma de control para este fitopatógeno; sin embargo, el uso inadecuado de éstos está conduciendo a una degradación creciente del suelo; así como, a una pérdida irrecuperable del mismo. El uso inadecuado de este recurso trae como consecuencia la imposibilidad de hacer un uso óptimo del suelo en la agricultura. Por tal razón, es necesario buscar alternativas de control de enfermedades, por ello en el departamento de Nematología en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) se propone la incorporación de microorganismos benéficos al suelo para el control biológico de fitopatógenos y así hacer un uso eficiente de este recurso devolviéndole al suelo microorganismos benéficos para su restauración.

6. JUSTIFICACIÓN

Las rizobacterias representan una alternativa biotecnológica atractiva en la agricultura por su gran diversidad de mecanismos moleculares que les permiten actuar como biofertilizantes, fitoestimulantes y como agentes de biocontrol contra fitopatógenos. Son pocos los trabajos que se han centrado en la investigación con cultivos hortícolas en la entidad y es por ello que este trabajo pretende contribuir al conocimiento de la biodiversidad de los microorganismos asociados a la rizosfera de estos cultivos y su interacción.

7. HIPÓTESIS

1. Las bacterias que se encuentran presentes en la rizosfera del cultivo de tomate pertenecerán a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*
2. La efectividad biológica de al menos una de las bacterias aisladas presentará un valor de inhibición sobre el crecimiento micelial de *Fusarium* spp. en un 60 % in vitro

8. OBJETIVOS

8.1. Objetivo General

Aislar y caracterizar rizobacterias antagonistas a *Fusarium* spp. en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en el valle de Culiacán, Sinaloa.

8.2. Objetivos Específicos

- 1) Aislar y caracterizar el patógeno *Fusarium* spp.
- 2) Aislar bacterias a partir de muestras de raíces de tomate en agrícolas del valle de Culiacán, Sinaloa
- 3) Determinar la capacidad de control biológico de los aislados seleccionados
- 4) Caracterizar morfológica y bioquímicamente las bacterias aisladas
- 5) Caracterizar molecularmente los aislados seleccionados

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 Aislamiento de *Fusarium* spp.

Se tomaron muestras de plantas con síntomas de fusariosis de predios agrícolas intensivos de cooperantes. De cada agrícola se colectaron plantas enfermas, que manifestaban diversos tipos de daño (necrosis radicular y vascular y/o necrosis basal externa con daño vascular), las cuales fueron transportadas al laboratorio de Nematología en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD). Para el aislamiento de *Fusarium* spp. se realizaron cortes de la parte vascular de la planta previamente desinfectada, y se sembraron sobre placas de medio de cultivo Agar Dextrosa y Papa (PDA), posteriormente se incubaron a 27° C por 7 días, y luego se tomaron muestras del micelio del hongo (avance del desarrollo micelial), y se transfirieron a nuevas placas de medio para obtener cultivos puros. Posteriormente de estas placas con cuatro días de crecimiento, se realizaron preparaciones o montajes para observarse al microscopio en la búsqueda de macroconidias y microconidias que son características de *Fusarium* spp. Una vez obtenidas y caracterizadas las esporas se purificaron y preservaron en arena esterilizada para su uso posterior (Alexander, 1994).

9.2 Caracterización de *Fusarium* spp.

Los aislados de *Fusarium* spp. de las plantas que manifestaban daños de necrosis basal o de la corona, se sembraron en medio PDA y se incubaran a 27°C por 7 días para posteriormente recuperar el micelio y las esporas productivas (macroconidias y microconidios). Para lo cual se preparó una suspensión de conidios a concentración de 1×10^6 esporas mL⁻¹, con la que se inocularon las plantas diferenciales variedad Mamor y Motelle de la casa comercial Vilmorin, para determinar la presencia de (For1). Las plantas se obtuvieron sembrando las semillas en charolas de poliestireno de 128 cavidades con sustrato peat moss y un mes después de su germinación fueron

utilizadas para la inoculación. Para esto se preparó la suspensión de conidios en diferentes recipientes conteniendo 60 mL de agua destilada esterilizada. Una vez agregado los propágulos del hongo en el agua, se resuspendieron para determinar la concentración, para lo cual se utilizó una cámara de Neubauer para conocer la concentración de esporas, una vez determinada la concentración (1×10^6 esporas/mL), se inocularon las plantas diferenciales de tomate a las que se les realizaron pequeñas heridas en las raíces secundarias y se depositaron en el vaso de precipitado que contenía la suspensión de conidios, dejándose por un tiempo de 10 minutos de contacto (esporas-plántulas). Las plantas diferenciales que se utilizaron fueron Mamor (susceptible a Forl) y Moteelle (resistente a Forl).

Por otro lado, para la identificación a nivel de raza fisiológica del Fol, el cual se aisló de plantas con presencia de necrosis radicular y vascular, se utilizó la misma metodología que para Forl, con la diferencia que, para esto, se utilizaron las líneas diferenciales para Fol las cuales son las siguientes Bonny Best (susceptible a las 3 razas), Manapal (suceptible a raza 3, pero resistente a raza 1 y 2), Walter (Suceptible a raza 1 y 3 pero resistente a raza 2) y IR3-301-301 (Resistente a las tres razas).

Las plantas fueron colocadas en los bancales del invernadero de CIAD y se mantuvieron bajo condiciones de riego, nutrición y control de plagas, después de 21 a 25 días las plantas fueron analizadas de forma visual (síntomas de marchitez, clorosis, amarillamiento o muerte). Así mismo, a cada planta se le realizó un corte longitudinal desde la base del tallo hacia arriba, detectando si había presencia de necrosis vascular, lo cual nos indica que el patógeno fue capaz de ocasionar infección en los tejidos del xilema.

9.3 Aislamiento de Microorganismos del Suelo

La toma de muestras de suelo y de raíces se tomaron de agrícolas cooperantes. De cada Agrícola se colectaron 10 submuestras repartidas al azar en diferentes lotes, todas a una profundidad de 5 a 20 cm, las que constituyeron una muestra compuesta. Las muestras fueron embolsadas y transportadas al laboratorio de Nematología en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) el mismo día del muestreo. La evaluación microbiológica se realizó por medio

de la técnica indirecta de diluciones seriadas y siembra en placas. Las diluciones se prepararon inicialmente partir de 50 gramos de suelo y 450 mL de agua estéril y de estas se realizaron las siguientes diluciones en serie, hasta la dilución 10^4 , la cual se utilizó para la siembra sobre placas de medios de cultivo general y semiselectivos, sembrando un conjunto de tres placas por cada dilución. Se emplearon tres diluciones en medios de cultivo selectivos para la evaluación de los respectivos grupos de microorganismos: PDA para bacterias aerobias y anaerobias, PDA AL para hongos, B de K para *Pseudomonas fluorescences*, rojo congo para bacterias fijadoras de N, Pikokscaya y Pikovskaya modificado para bacterias solubilizadores de fosforo y potasio respectivamente. Una vez sembradas las placas de cada muestra de suelo sobre las placas con medio de cultivo, se incubaron a 28°C por de 24 a 48 horas (Alexander, 1994).

9.3.1 Identificación de Antagonismo *in vitro*

Para la selección de cepas antagonistas se realizó un bioensayo de confrontación directa con la técnica de cultivos duales (Pérez *et al.*, 2019) en placas Petri con medio de cultivo PDA. En el centro de la placa se colocaron discos miceliales de 5 mm de diámetro del fitopatógeno y las cepas antagonistas (una asada) se colocaron en los 4 puntos equidistantes a 2 cm alrededor del fitopatógeno. El control (testigo) fue solamente el hongo fitopatógeno en medio PDA. Las placas se incubaron a 28 °C con 40% de humedad relativa. Después de 15 días se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (ICM) con la siguiente fórmula:

$$\% ICM = \left(\frac{dc-dt}{dc} \right) \times 100 \quad (1)$$

Donde % ICM representa el porcentaje de inhibición de crecimiento micelial, dc representa diámetro de inhibición de crecimiento micelial del control, dt representa el diámetro de inhibición de crecimiento micelial del tratamiento.

Propuesta por Ezziyani et al. (2004) se midió el diámetro de inhibición de crecimiento micelial,

entre la colonia fúngica y las cepas bacterianas. Se seleccionaron los aislados que presentaron un porcentaje de ICM de al menos 60% contra las cepas fúngicas.

9.3.2 Caracterización Morfológica

Los aislados bacterianos seleccionados fueron sembrados por punción en medio PDA e incubados por 48h a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, las colonias fueron examinadas por sus características morfológicas (color, forma, tamaño, superficie, borde), además, se evaluó su tinción Gram y morfología celular.

Tinción de Gram. Se realizó un frotis de cada una de las colonias bacterianas sobre un portaobjetos, posteriormente se secó al aire y se fijó con calor; después se adicionó cristal violeta y se dejó actuar por 1 min. Se decantó el colorante inicial y se agregó solución de lugol, dejándose actuar por 1 min, se decantó la solución de lugol y se decoloró con etanol hasta que el colorante se diluyó; posteriormente, se lavó con agua y se adicionó solución safranina al 1% por 30 s. Por último, se lavó con agua y se dejó secar al aire y se observó al microscopio. Las bacterias que retuvieron el colorante inicial (cristal violeta) fueron consideradas como Gram positivas y las que se decoloraron con el etanol y adquiriendo el colorante contrastante (rojo o rosa) se consideraron como Gram negativas (Alexander, 1994).

Tinción de endosporas. Después de determinar el Gram de las bacterias en estudio, se determinó si los aislados bacterianos positivos en Gram, poseen la capacidad de formar endosporas. Para ello, se tomaron varias asadas bacterianas, se adicionaron a un tubo de ensayo con agua destilada, se calentaron al menos a 85°C por 15 min, y se sembraron en agar nutritivo por la técnica de diluciones seriadas. Se incubaron por 72 h a 30°C , después se tomó una colonia pura y se colocó en un portaobjetos, se hizo un frotis, se secó al aire y se fijó con calor. Enseguida, se adicionó solución verde malaquita, se calentó hasta emisión de vapores, se decantó la solución verde malaquita, se adicionó safranina al 1 % por 45 s, se secó al aire, y se observó al microscopio óptico (Álvarez *et al.*, 2013).

9.3.3 Caracterización Bioquímica

Todos los aislamientos bacterianos se evaluaron por sus actividades metabólicas de interés en la promoción de crecimiento vegetal y se desarrolló un perfil bioquímico para su posible identificación.

5.3.3.1 Fijación de nitrógeno. La capacidad de fijación de nitrógeno se evaluó inoculando los aislados en medio Jensen's libre de nitrógeno, el cual contenía 20 g de sacarosa, 1g de K_2HPO_4 , 0.5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g de NaCl, 0.1gde $FeSO_4$, 0.005 g de Na_2MoO_4 , 2 g de $CaCl_2$, 15 g agar por litro y ajustado a un pH 7.0. Los aislamientos se incubaron a una temperatura de 28 ° C durante 7 días. El experimento se realizó por triplicado. El crecimiento en la placa se tomó como evidencia cualitativa positiva de la fijación atmosférica de nitrógeno (Döbereiner *et al.*, 1995).

5.3.3.2. Solubilización de fósforo (P). Para evaluar el efecto de la capacidad solubilizadora de P, cultivos bacterianos de 24 h de desarrollo se inocularon por punción en medio agar Pikovskaya [en g L⁻¹: glucosa, 10 g; $(NH_4)_2SO_4$, 0.5 g; NaCl, 0.2 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 g; KCl, 0.2]. (Döbereiner *et al.*, 1995).

9.4 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN genómico de todos los aislados se utilizó el kit high pure PCR template preparation kit. Para determinar la concentración y pureza del material genético se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La integridad del ADN extraído se verificó en un gel de agarosa al 1%.

9.4.1 Amplificación del Gen 16S ARNr por PCR

El gen 16S ARNr se amplificó por PCR utilizando un conjunto de cebadores universales; 16S_fd1 (5'CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 16S_rD1 (5'CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3') propuestos por Weisburg et al. (1991). La mezcla de la reacción PCR (20 μ L) consistió en 2 μ L de buffer 10X de reacción, 0.8 de $MgCl_2$ [50 mM], 0.5 de dNTPs [10mM], 0.2 de taq polimerasa, 1 μ L de cada uno de los primers [10 mM], 1 μ L de ADN [5ng/ μ L] y 13.5 μ L de agua. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador con el siguiente programa: Pre-desnaturalización a 94°C por 5 min, desnaturalización a 94°C por 30seg, alineamiento 50° C por 30seg, extensión a 72°C por 2min, 36 ciclos y una extensión final a 72°C por 5 min. El producto de PCR será verificado en un gel de agarosa al 1.0 %. Posteriormente, se realizó la limpieza de los productos amplificados por el método PEG Precipitation of PCR products. Los fragmentos amplificados fueron secuenciados.

9.4.2 Análisis Bioinformático y Filogenia

Las secuencias de nucleótidos obtenidas se analizaron empleando el software Chromas versión 2.6.5 para visualizar y analizar la calidad de los electroferogramas y se tomaron las secuencias con los picos más definidos. Se realizó un alineamiento local empleando la herramienta nucleotide BLAST de NCBI. Posteriormente, se tomaron las secuencias que presentaron mayor porcentaje de similitud y se realizó un análisis múltiple de secuencias utilizando el software CLC Sequence Viewer Version 7.8.1. El árbol filogenético fue construido a partir del alineamiento múltiple de secuencias empleando el algoritmo de Neighbor-joining y editado en la plataforma en línea ITOL (Interactive Tree Of Life).

10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.1 Aislamiento de Microorganismos de la Rizosfera

El 100% de las muestras obtenidas de la rizosfera del cultivo de tomate de diferentes agrícolas resultó positiva en base a la presencia de microorganismos con diferente actividad según el medio de cultivo en el que fue sembrado. Se aislaron 155 cepas de rizobacterias de los diferentes medios como lo muestra el Cuadro 1. La presencia de las rizobacterias con diferente actividad se debe a que estos microorganismos juegan un papel muy importante en los procesos físicos, químicos y biológicos, y algunos estudios reportan el aislamiento de diferentes especies bacterianas con diferente potencial biotecnológico y su posible aplicación en la agricultura, lo que demuestra la ocurrencia natural en procesos físico-químicos del suelo como la fijación de N y la solubilización de K y P (Ahmed *et al.*, 2014).

Cuadro 1. Número de colonias de bacterias de la rizosfera en 12 muestras de suelo y diferentes medios de cultivo

MUESTRA	BK	PK	PKM	PDA	RC	TOTAL
M1	1	0	4	8	3	16
M2	2	0	5	3	5	15
M3	1	0	2	7	2	12
M4	3	0	1	7	3	14
M5	3	0	4	9	2	18
M6	1	0	2	7	1	11
M7	3	0	1	8	2	14
M8	2	0	3	5	1	11
M9	2	0	5	2	1	10
M10	1	0	1	4	3	9
M11	1	0	2	8	2	13
M12	1	0	4	6	1	12
TOTAL	22	0	34	74	26	155

BK- B de King; PK- Pikovskaya; PKM - Pikovskaya modificado; PDA- Agar dextrosa y papa; RC- Rojo congo.

Las 155 bacterias de la rizosfera fueron aisladas, purificadas y sometidas a cultivos duales o de antagonismo y solo aquellas que resultaron positivas, fueron identificadas con pruebas morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y moleculares.

10.2 Identificación Morfológica de *Fusarium oxysporum*

De acuerdo a las características microscópicas evaluadas después de 15 días de incubación, en los cuatro aislamientos se observó la presencia de microconidias de forma oval a elíptica, usualmente sin septas y en ocasiones solo presentó una septa; ligeramente curvadas con la presencia de una célula pie y las clamidosporas fueron simples (Figura 1). Los aislamientos fueron identificados como *Fusarium oxysporum*, donde se observaron variaciones en cuanto al color y crecimiento de las colonias cultivadas en medio PDA. Estos resultados coinciden con la descripción de Arbeláez (2000) quien manifiesta que una de las dificultades encontradas para la identificación de especies de *F. oxysporum* es la frecuente variación observada en las características culturales de la colonia del hongo y en tamaño de las esporas. Así mismo, se atribuye que estas variaciones se deben a la presencia de muchos clones de *F. oxysporum* y la frecuente mutación en medio de cultivo PDA.



Figura 1. Colonia de *Fusarium oxysporum* en medio PDA (colonia evaluada sobre de superficie).

No obstante, se logró la identificación a nivel de especie; ya que las mediciones de las estructuras asexuales como: microconidias, macroconidias y clamidosporas coincidieron con los descriptores propuestos por Booth (1970) y Leslie y Summerell (2006) para la especie de *F. oxysporum*.

6.3 Identificación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* por Cultivos Diferenciales

De acuerdo con la identificación de Forl se utilizaron los cultivos diferenciales Mamor y Motelle, los cuales fueron analizados con la tabla de resistencia donde la variedad Mamor se comporta como susceptible a Forl y Motelle como resistente a esta especie. Los resultados demuestran que las plantas de la variedad Mamor manifestaron susceptibilidad a los aislados o cepas inoculadas de *Fusarium oxysporum*, ya que se observó la presencia de síntomas de clorosis o amarillamiento de

las plantas y en el área radicular y tallo basal, la presencia de necrosis (Figura 2). Plantas que fueron procesadas en el laboratorio para el reisolamiento del agente causal y así comparar la sintomatología de las plantas originales de campo con los síntomas de las plantas inoculadas en laboratorio. Al contrario de la respuesta de las plantas del material Motelle, en las que no manifestaron daños tanto en follaje como en raíces, lo que se demuestra su capacidad de resistencia a los aislados de Forl.



Figura 2. Identificación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* en cultivos diferenciales

Pocos estudios se han realizado en esta especie; sin embargo, ya se había descrito como una fuente de variabilidad genética con genes mayores de resistencia a diferentes enfermedades entre las que destaca Fol.

10.4 Identificación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por Cultivos Diferenciales

Los aislados de *Fusarium oxysporum* fueron sometidos a una prueba de resistencia entre los cultivos diferenciales (Manapal) que es resistente a Fol razas 1 y 2 pero susceptible a Fol raza 3,

(Bonny Best) que es susceptible a las 3 razas de *Fusarium oxysporum* y (Walter) que es susceptible a raza 1 y raza 3 pero es resistente a raza 2. Los resultados mostraron que el aislado 1 fue compatible o patógeno a los cultivos diferenciales de Bonny Best y Walter y presentó incompatibilidad o resistencia a la variedad Manupal. El aislamiento 2 fue susceptible a Bonny Best y resistente a las otras variedades y el aislado 3 fue susceptible a las 3 variedades diferenciales (Figura 3), por lo cual se reporta la presencia de las tres razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* por lo que estas especies representan una buena opción para los programas de mejoramiento genético del tomate (Rick,1990). La resistencia vertical a las 3 razas de *Fusarium oxysporum* se ajustó a una relación de genotipos resistentes y susceptibles, lo que indica herencia monogénica con dominancia completa. Lo cual indica que pueden ser consideradas como una fuente de resistencia importante a estas enfermedades, ya que además tendría características deseables para el mercado.



Figura 3. Identificación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en cultivos diferenciales.

10.5 Selección e Identificación de Antagonistas

Las 155 rizobacterias aisladas fueron sometidas a una prueba de antagonismo contra las dos especies de Fol y Forl de las cuales solamente 14 presentaron la capacidad de inhibir el crecimiento micelial de ambas especies (Cuadro 2). Esto concuerda con diferentes estudios Djordjevic et al.

(2011) y Trivedi et al. (2008) en los que evaluaron a bacterias aisladas de la rizosfera contra *Fusarium* spp. Dentro de los cuales solamente el 10% del total de los aislados presentaba esta actividad antagonista. Lo cual demuestra que las rizobacterias tienen una gran capacidad para el control de este patógeno además de tener una gran capacidad de promoción de crecimiento con sus diferentes mecanismos de acción.

Cuadro 2. Selección e identificación de rizobacterias antagonistas contra dos razas de *Fusarium* spp.

Microorganismo Antagonista	Fol	Forl
M1 PKM	+	+
M1 RC	+	+
M1-2 RC	+	+
M1-2 PDA	+	+
M3-1 PDA	+	+
M3-2 PDA	+	+
M4 PKM	+	+
M4-1 PDA	+	+
M4-2 PDA	+	+
M5-1 PDA	+	-
M5-2 PDA	+	-
M6 BK	+	+
M7-1 PDA	+	+
M7-2 PDA	+	+
M10-2 PDA	+	+
M12 PDA	+	+

*Forl: *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*

*Fol: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

*(+): Presentó antagonismo; (-): No presentó antagonismo

10.6 Pruebas para la Selección e Identificación de Antagonistas contra *Fusarium oxysporum* f sp *lycopersici*

Los resultados obtenidos en los cultivos duales mostraron que las cepas M4-1 PDA y M5-1 PDA fueron estadísticamente las más eficientes en inhibir el crecimiento micelial de Fol en un 84.4% seguidas de M1 PKM (78.8%), M2 PDA (77.7%), M3 PDA (71.1%), M1-2 PDA (72.57%), M3-

2 PDA (78.51%), M4 PKM (71.1%), M4-2 PDA (65.17%), M5-2 PDA(77.7%), M6 BK (61.46%), M7-1 PDA (75.5%), M7-2 PDA (74.06%), M10-2 PDA (74.8%) y M12 PDA (69.62%) (Figura 4). Estos resultados son más altos que los reportados por Ríos-Velasco et al. (2016), quienes obtuvieron un porcentaje de inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* de 42 y 51.5% por efecto de *Bacillus methylotrophicus* y *Bacillus amyloliquefaciens*, respectivamente; así como, los reportados por Mojica Morín et al. (2009), al confrontar *F. oxysporum* con las cepas de *Bacillus thuringiensis* GM-23 (43.02%) y HD-121 (42.04%) y observaron porcentajes de inhibición más altos para *R. solani* por efecto de las cepas GM-64 (66.66%) y HD-203 (65.99%). Por su parte, Djordjevic et al. (2011) al evaluar 16 aislamientos bacterianos como antagonistas de *F. oxysporum*, reportan un porcentaje de inhibición más alto (70.98%) sobre el crecimiento de este hongo.

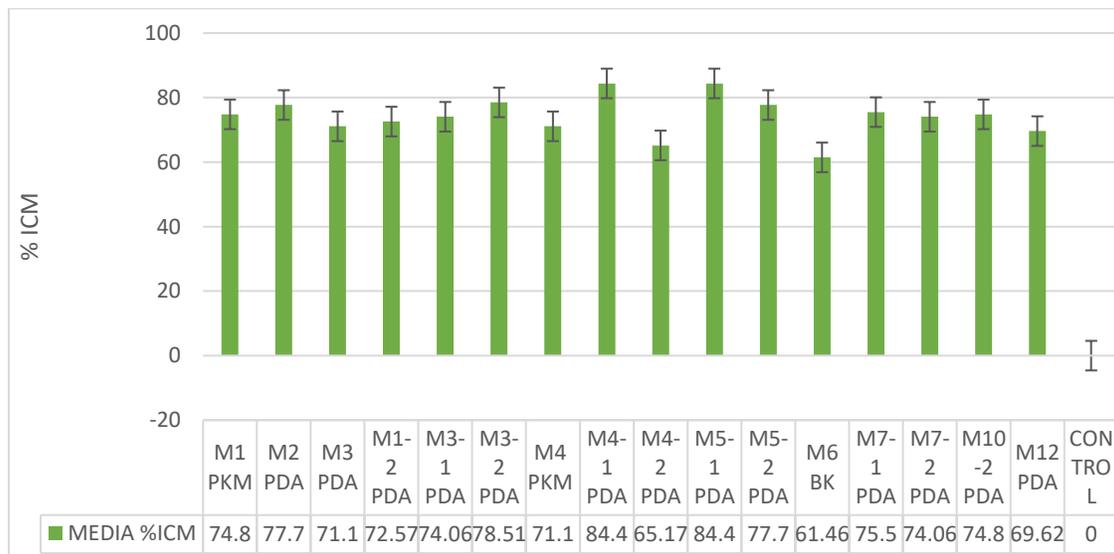


Figura 4. Inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici con 16 cepas antagonistas.

Por otra parte, al evaluar el antagonismo de las cepas rizosféricas aisladas, se reportan porcentajes de inhibición del crecimiento de (Forl) de un 45.91 a un 75.5 % al confrontar los 16 aislados antagonistas. Donde la cepa M3 PDA fue la que presentó mayor inhibición con un porcentaje del 75.5% y la M5-1 PDA fue la menor con un porcentaje de 45.91%. Finalmente, las cepas M5-1 PDA y M5-2 PDA no cumplieron con el porcentaje del efecto inhibitorio en los fitopatógenos estudiados (Figura 5), lo cual indica que estas cepas no fueron capaces de producir una cantidad

suficiente de sustancias que puedan inhibir el crecimiento de los patógenos, por lo que no se alcanza un umbral que les permita exhibir una respuesta antagónica (Figuroa-López *et al.*, 2016).

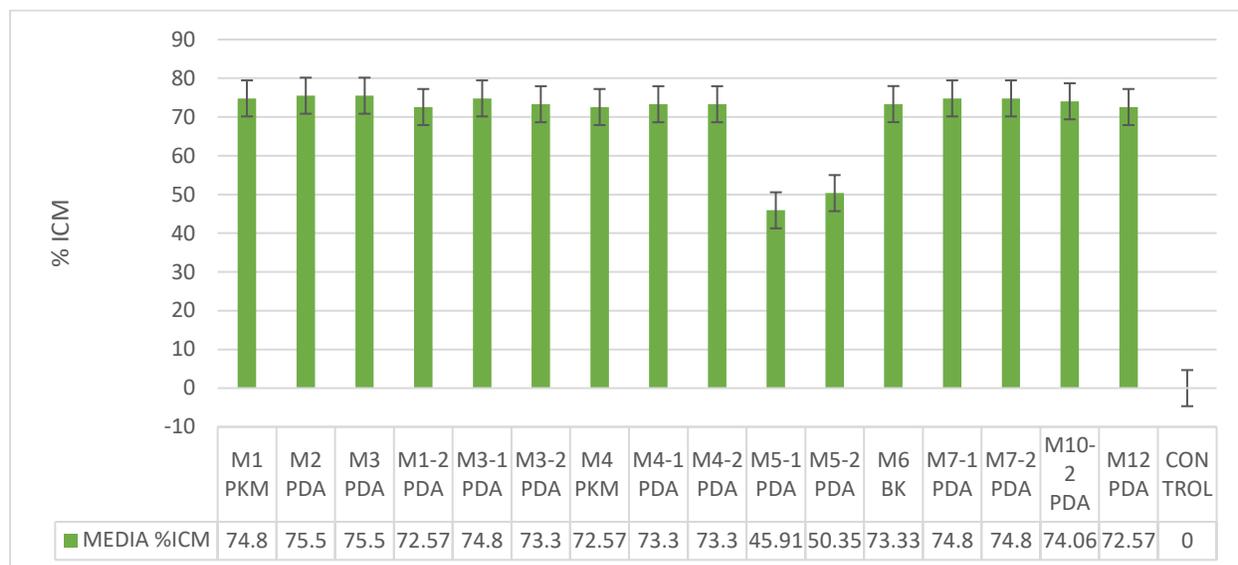


Figura 5. Inhibición del crecimiento micelial de las cepas antagonistas contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicle-lycopersici*

Está bien documentado que el efecto antagónico de las rizobacterias sobre la inhibición del crecimiento de fitopatógenos es debido a la síntesis de metabolitos secundarios (Khannous *et al.*, 2014). Trivedi *et al.* (2008) demostraron que metabolitos volátiles producidos por *Pseudomonas corrugata* juegan un papel predominante en la inhibición de los hongos *F. oxysporum* y *A. alternata*, mientras que los metabolitos difusibles solo tienen un rol secundario. Por otra parte, se ha demostrado que algunas especies de *Pseudomonas* producen enzimas líticas, las cuales pueden romper las membranas celulares de algunos hongos fitopatógenos; las más conocidas de estas enzimas son: quitinasas, celulasas, proteasas y β -glucanasas (Compant *et al.*, 2005).

10.7 Identificación Morfológica de los Aislados Bacterianos Evaluados contra *Fusarium* spp.

De un total de 155 aislados bacterianos obtenidos de la rizosfera de tomate, 16 de ellos presentaron

inhibición de crecimiento micelial, con las que, se procedió a determinar sus características morfológicas de las colonias. Las bacterias se cultivaron en agar nutritivo (AN) a 30°C por 48 h, registrando su apariencia, forma, color, elevación de la colonia.

Después de determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial, y conocer las características de la colonia, se cultivaron en agar nutritivo (AN) por 48 °C, y posteriormente se realizó la prueba de tinción de Gram. Se observó la forma de la célula en un microscopio de luz a 100x.

En la Figura 6 se observa la apariencia de cada colonia bacteriana, caracterizadas por presentar consistencia seca, forma irregular, con elevación en el centro de la colonia en forma de corona, tales características son similares a las reportadas por Wakita et al. (2001), además el color crema de las colonias probablemente se debe a que, al habitar la rizosfera de la planta de tomate, puede tener algunos compuestos que las protejan de la radiación solar, tal como lo describieron Zúñiga y Gutiérrez-Correa (1982).

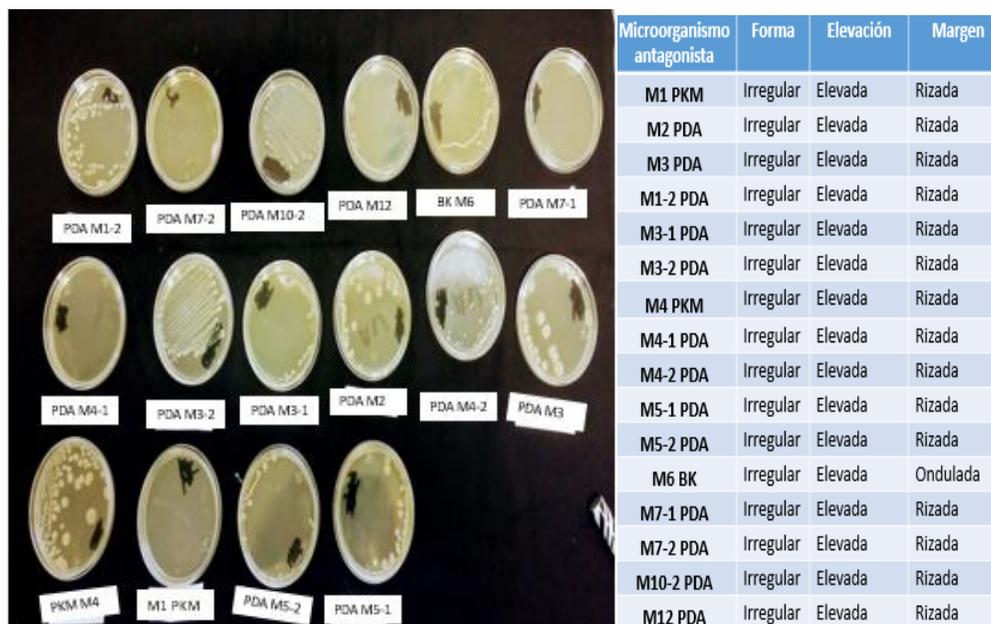


Figura 6. Identificación morfológica de los aislados bacterianos de rizosfera de plantas de tomate.

10.7 Actividad Fijadora de Potasio (K)

El potasio (K) es uno de los nutrientes de mayor importancia a que es esencial para el desarrollo de la planta y juega un papel fundamental en la síntesis proteica, fotosíntesis, activación enzimática; así como, en la resistencia a enfermedades e insectos (Rehm y Schmitt, 2002). Gran cantidad de microorganismos en el suelo son capaces de solubilizar formas “no disponibles” de potasio mediante la liberación de ácidos orgánicos (Groudev, 1987; Ullman *et al.*, 1996). Dentro de los géneros de hongos y bacterias con capacidad solubilizadora de K se han mencionado *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium* y *Aspergillus* (Prajapat *et al.*, 2013), lo cual es acorde a los resultados obtenidos en el presente trabajo donde se aislaron bacterias de la rizosfera del cultivo del tomate, con potencial de aplicación en la solubilización de K. En la Figura 7 puede observarse el efecto de las bacterias aisladas en la solubilización de potasio a las 24 horas posterior a su cultivo *in vitro* (Agar Pikovskaya modificado), adicionado con fosfato de potasio dibásico y colorante púrpura de bromocresol. Éste medio de cultivo contiene el indicador púrpura de bromocresol por lo que es de color morado, al transcurrir 24 horas de cultivo el hongo, empieza a virar la coloración a amarillo, producto del cambio de pH debido a la liberación de ácidos orgánicos por parte del microorganismo.



Figura 7. Actividad solubilizadora de K de los aislados bacterianos de suelo y rizosfera de plantas de tomate.

10.8 Actividad Fijadora de Fósforo (P)

De las 16 bacterias seleccionadas solamente una presentó la capacidad de solubilizar P. Las estimaciones de la microflora del suelo con capacidad para solubilizar fosfatos varían ampliamente. Chabot et al. (1993) estimaron que los MSF (Microorganismos solubilizadores de Fósforo) representaban entre el 26% y el 46% (Figura 8).

En la mayoría de las bacterias se ha demostrado que la capacidad de solubilización del P está estrechamente relacionada con la producción de ácidos orgánicos, resultantes de la respiración oxidativa o de procesos fermentativos microbianos. Desde una perspectiva mecanicista, la acción de los ácidos orgánicos sobre la solubilización del P resulta de tres procesos generales (Antoun, 2012; Chuang *et al.*, 2007; Paredes *et al.*, 2010; Archana et al., 2012; Khan et al., 2014):

- a. La disociación de los ácidos orgánicos libera protones que contribuyen a reducir el pH del suelo y favorecen la disolución de los minerales fosfóricos;
- b. Las reacciones de quelatación en las cuales los componentes aniónicos de los ácidos orgánicos se intercambian por el grupo ortofosfato de los fosfatos de Ca^{2+} , Fe^{3+} y Al^{3+} , liberándolo en la solución del suelo, y;
- c. El desplazamiento de los fosfatos adsorbidos no específicamente sobre las partículas sólidas del suelo, por las componentes aniónicas de los ácidos orgánicos.

Varios ensayos han demostrado que la inoculación con hongos y bacterias solubilizadoras de P pueden incrementar el rendimiento o el crecimiento de las plantas en invernadero y campo (Chuang *et al.*, 2007; Valverde *et al.*, 2006). Supanjani et al. (2006) y Han et al. (2006) encontraron que la aplicación de *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* (Bmp) junto con roca fosfórica (RF) produjo incrementos en varios parámetros de crecimiento y rendimiento, en cultivos de ají y pepino, en condiciones de invernadero y campo. Cuando en invernadero el sustrato de siembra se inoculó con la bacteria y se fertilizó con RF 3 g kg⁻¹, los contenidos de N, P y K en la materia seca del tallo y la raíz del ají fueron mayores y significativamente diferentes de los obtenidos por el tratamiento control sin RF ni Bmp. También se obtuvieron incrementos significativos, pero menores a los anteriores, cuando sólo se aplicó Bmp. Si además de RF y Bmp se inoculó con bacterias solubilizadoras de K (BSK) y se adicionó illita (como polvo), el tratamiento incrementó los contenidos de N, P y K en los tallos y en las raíces. Este último tratamiento también aumentó la

fotosíntesis foliar en 20% en el ají y 16% en las plantas de pimentón en relación con el control (Han, 2006).

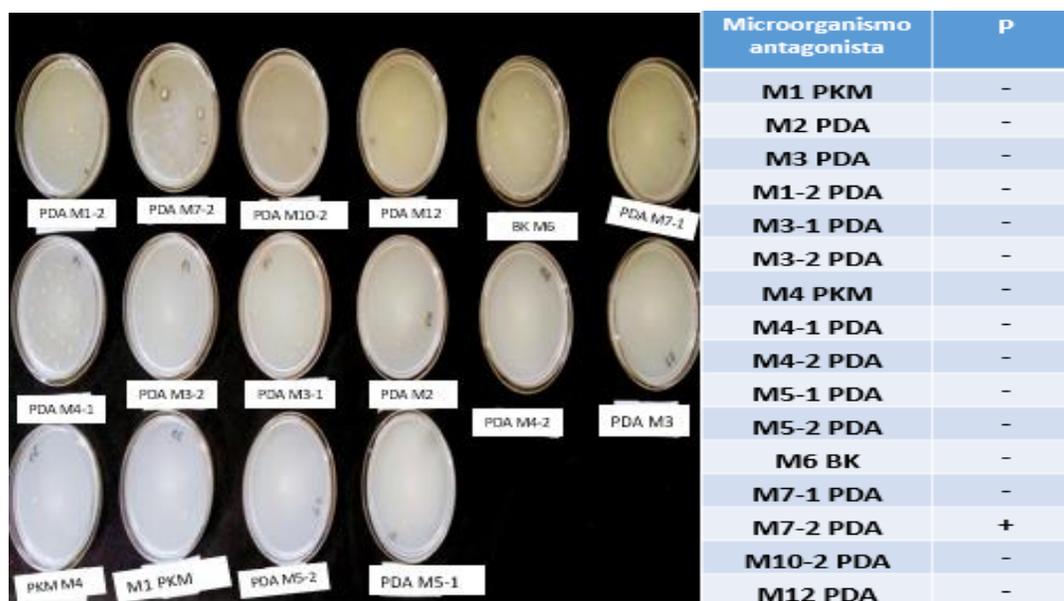


Figura 8. Actividad solubilizadora de P de los aislados bacterianos.

10.9 Extracción de ADN

Se realizó extracción de ADN genómico de los 16 aislamientos bacterianos de la rizosfera del cultivo de tomate empleando el kit High Pure PCR Template Preparation. Los análisis espectrofotométricos obtenidos muestran que en la relación 260/280, la mayoría de las muestras presenta un valor mayor a 2,200 lo que se debe probablemente a contaminación por ARN; mientras que, la relación 260/230 se encontró dentro de los parámetros aceptables.

Amplificación del gen 16S ARNr por PCR. Los resultados positivos fueron obtenidos en la amplificación del gen 16S ARNr. Los análisis espectrofotométricos muestran ADN de calidad óptima para la secuenciación (Cuadro 3). Así mismo, se encontraron bandas integras en el gel de agarosa; sin embargo, se encontraron bandas inespecíficas para lo cual se aumentó la temperatura de alineamiento (Figura 9). Posteriormente, se realizó una limpieza por el método propuesto por Valenzuela-González et al. (2015) y se prosiguió almacenarlo a -20°C hasta su secuenciación.

Cuadro 3. Análisis espectrofotométrico de ADN de las rizobacterias aisladas.

AISLAMIENTO	260/280	260/230	CONCENTRACIÓN ng/ μ L
M1 PKM	2,190	2,786	58,150
M1 RC	2,157	1,920	35,750
M1-2 RC	1,711	1,092	14,750
M1-2 PDA	2,100	1,718	40,950
M3-1 PDA	2,109	0,860	3,150
M3-2 PDA	2,172	0,780	2,400
M4 PKM	1,672	0,718	2,500
M4-1 PDA	1,714	1,038	31,350
M4-2 PDA	2,360	2,188	365,950
M5-1 PDA	2,237	2,230	205,150
M5-2 PDA	2,274	2,199	204,400
M6 BK	2,305	2,200	367,500
M7-1 PDA	2,290	2,259	173,750
M7-2 PDA	2,358	2,133	378,850
M10-2 PDA	2,250	2,112	135,150
M12 PDA	2,308	2,221	298, 950

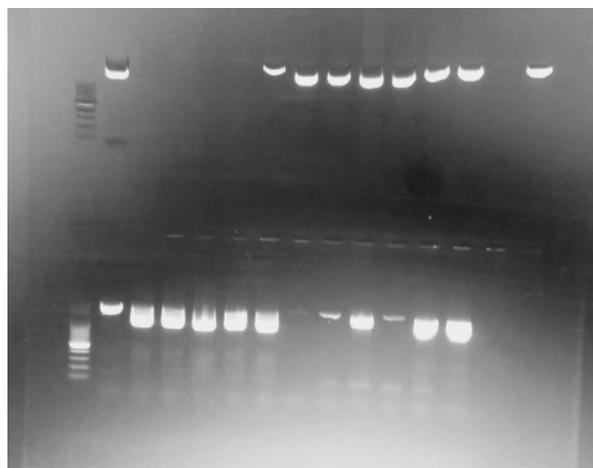


Figura 9. Amplificación del gen 16S ARNr por PCR en gel de agarosa al 1X.

11. CONCLUSIONES

1. Se aislaron e identificaron en base a su morfología y líneas diferenciales a los hongos *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl) y *Fusarium oxysporum* f sp *lycopersici* (Fol) causante de la marchitez del tomate.
2. Se aislaron rizobacterias con una actividad antagónica contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl) y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) mayor al 50% de inhibición micelial.
3. Las rizobacterias que presentaron antagonismo positivo, se caracterizaron e identificaron como *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* sp.

12. REFERENCIAS

- Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. Elsevier. Academic press. USA. pp. 305-592. https://booksite.elsevier.com/samplechapters/9780120445653/0120445654_FM.pdf
- Aguilar-Piedras, J.; Xique-Vásquez, M.; García, S.; Baca, B.E. 2008. Producción del ácido indol 3-acético en *Azospirillum*. Revista Latinoamericana de Microbiología. 50(1-2): 29-37. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=18235>
- Ahemad, M.; Kibret, M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth Promoting rhizobacteria: Current perspective. Journal of King Saud University-Science. 26(1): 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>.
- Ahmed, E.A.; Hassan, E.A.; El Tobgy, K.M.K.; Ramadan, E.M. 2014. Evaluation of rhizobacteria of some medicinal plants for plant growth promotion and biological control. Annals of Agricultural Science. 59 (2): 273-280. <https://doi.org/10.1016/j.aogas.2014.11.016>
- Albareda, M.; Dardanelli, M. S.; Sousa C.; Megías, M.; Temprano, F.; Rodríguez-Navarro, D. 2006. Factors affecting the attachment of rhizospheric bacteria to bean and soybean roots. FEMS Microbiology Letters. 259: 67-73. <http://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2006.00244.x>
- Alexander, M. 1994. Introducción a la microbiología del suelo. Peña CJJ (trad). 2a. reimp. AGT Editor, S.A. México, DF. pp. 491. https://books.google.com.mx/books/about/Introducci%C3%B3n_a_la_microbiolog%C3%A1a_del_suelo.html?id=Bj1nzgAACAAJ&redir_esc=y
- Álvarez, I.; Pantoja, A.; Gañan, L.; Ceballos, G. 2013. La sigatoka negra en plátano y plátano. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO. 1 plegable. <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/69683>
- Angulo, C.V.; San Fuentes, A.E.; Rodriguez, F.; Sossa, E.K. 2014. Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. Revista Argentina de Microbiología. 46(4): 338-347. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70093-8](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70093-8)
- Annan, H.; Golding, A.; Zhao, Y.; Dong, Z. 2012. Choice of hydrogen uptake (Hup) status in legume-rhizobia symbioses. Ecology and Evolution. 2(9): 2285-2290. <http://doi.org/10.1002/ece3.325>
- Antoun, H. 2012. Beneficial microorganisms for the sustainable use of phosphates in agriculture. Procedia Engineering. 46: 62-67. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.09.446>
- Arai, Y.; Sparks, D. 2007. Phosphate reaction dynamics in soils and soil components: a multiscale approach. Advances in Agronomy. 94: 135-179. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(06\)94003-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(06)94003-6)
- Arbeláez -Torres, G. 2000. Algunos aspectos de los hongos del genero fusarium y de la especie fusarium oxysporum. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía, Centro Editorial. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/34305>
- Archana, G.; Buch, A.; Kumar, N. 2012. Pivotal role of organic acid secretion by rhizobacteria in plant growth promotion. In: Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology.

Pp 35-53. http://doi.org/10.1007/978-94-007-2214-9_3

- Área de edafología y química agrícola. 2006. El Suelo como hábitat. Microorganismos del suelo. Bacterias. Liberación de nutrientes. Extraído el 11 de septiembre, 2008, del sitio Web de la Universidad de Extremadura: <http://www.unex.es/edafo/ECAP/ECAL6MBactLibNutr.htm>
- Arévalo, E. 2009. Más arroz a menos costos con la aplicación de biofertilizantes y materia orgánica. *Revista Arroz*. 57(476): 26-28.
- Arshad, M.; Frankenberger, W.T. 1998. Plant growth-regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. *Advances in Agronomy*. 62: 45-151. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60567-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60567-2)
- Awasthi, R.; Tewari, R.; Nayyar, H. 2011. Synergy between plants and P-solubilizing microbes in soils: Effects on growth and physiology of crops. *International Research Journal of Microbiology*. 2(12): 484-503. <https://www.researchgate.net/publication/265209336>
- Azziz, G.; Bajsa, N.; Haghjou, T.; Taulé, C; Valverde, A.; Igual, J.M.; Arias, A. 2012. Abundance, diversity and prospecting of culturable phosphate solubilizing bacteria on soils under crop-pasture rotations in a no-tillage regime in Uruguay. *Applied Soil Ecology*. 61: 320-326. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.10.004>
- Baldani, J.I.; Baldani, V.L.D.; Seldin, L.; Dobereiner, J. 1986. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov. sp. nov. A root-associated nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 36(1): 86-93. <https://doi.org/10.1099/00207713-36-1-86>
- Baldani, J.I.; Caruso, L.; Baldani, V.L.D.; Goi, S.R.; Dobereiner, J. 1997. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*. 29(5-6): 911-922. [https://doi.org/10.1016/s0038-0717\(96\)00218-0](https://doi.org/10.1016/s0038-0717(96)00218-0)
- Barbieri, P.; Zanelli, T.; Galli, E.; Zanetti, G. 1986. Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole3-acetic acid. *FEMS Microbiology Letters*. 36(1): 87-90. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1986.tb01672.x>
- Bashan, Y.; Holguín, G.; Ferrera, R. 1996. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. *Terra*. 14(2): 159-194. <http://www.bashanfoundation.org/gmaweb/pdfs/ronaldpgpb8.pdf>
- Bashan, Y.; Puente, M.E.; Rodríguez-Mendoza, N.; Toledo, G.; Holguín, G.; Ferrera-Cerrato, R.; Pedrin, S. 1995. Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and rizosphere of 23 soil types. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(5): 1938-1945. <https://doi.org/10.1128/aem.61.5.1938-1945.1995>
- Bastian, F.; A, Cohen.; P, Piccoli.; V, Luna.; R, Baraldari.; R, Bottini. 1998. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regulation*. 24: 7-11 <https://doi.org/10.1023/A:1005964031159>
- Bloemberg, G.V.; Lugtenberg, B.J. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*. 4(4): 343-350. [https://doi.org/10.1016/s1369-5266\(00\)00183-7](https://doi.org/10.1016/s1369-5266(00)00183-7)
- Booth C. 1970. The genus *Fusarium*. Kew (Surrey): Commonwealth Mycological Institute.

[https://www.scirp.org/\(S\(i43dyn45teexjx455qlt3d2q\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1257093](https://www.scirp.org/(S(i43dyn45teexjx455qlt3d2q))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1257093)

- Bordiec, S.; Paquis, S.; Lacroix, H.; Dhondt, S.; Ait-Barka, E.; Kauffmann, S.; Jeandet, P.; Mazeyrat-Gourbeyre, F.; Clement, C.; Baillieul, F.; Dorey, S. 2011. Comparative analysis of defence responses induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacterium *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN and the non-host bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* in grapevine cell suspensions. *Journal of Experimental Botany*. 62: 595-603. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq291>
- Bouchard, Daniel. 2002. Influence des propriétés physicochimiques et biochimiques du sol sur la présence des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. Mémoire de Maîtrise, Université Laval. p. 109. https://publications.polymtl.ca/779/1/2012_StephenBrient.pdf
- Brada, I.E.; Quintana, E.; Pelaya, E.; Araujo, T. 1995. Efecto de *Bacillus* sp. sobre la germinación y desarrollo de semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* M.) infestadas con *Fusarium oxysporum* Schl. var. *cubensis* Smith. *Bioplag INIFAT*. 95: 11 <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e541>
- Bünemann, E.; Prusisz, B.; Ehlers, K. 2011. Characterization of phosphorus forms in soil microorganisms. In: *Phosphorus in Action*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 37-57. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-642-15271-9>
- Camelo, M.; Vera, S.P.; Bonilla, R. 2011. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 12(2): 159-166. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=449945031010>
- Carcaño, M.G.; Ferrera, D.; Pérez, J.; Molina, J.D.; Bashan, Y. 2006. Actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideroforos y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella* aisladas de maíz y teocintle. *Terra Latinoamericana*. 24(4):439-502. <https://www.redalyc.org/pdf/573/57324407.pdf>
- Castellanos, J.J.; Oliva, P.; Izquierdo, E.; Morales, N. 1995. Evaluación de *Bacillus subtilis* como biocontrol del patógeno *Alternaria porri* (Ell). *Cif en cebolla*. *Bioplag INIFAT*. 95: 21
- Cavalcante, V.A.; Dobereiner J.A. 1988. New acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*. 108: 23-31. <https://doi.org/10.1007/BF02370096>
- Chabot, R.; Hani A.; Cescas, M. 1993. Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. *Canadian Journal of Microbiology*. 39: 941-947. <https://doi.org/10.1139/m93-142>
- Chuang, C.; Chao, K.; Yu, L.; Chao, C.; Ching, C.; Wei, L. 2007. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. *Biology and Fertility of Soils*. 43: 575-584. <https://doi.org/10.1007/s00374-006-0140-3>
- Collavino, M.; Sansberro, P.; Mroginski, L.; Aguilar, M. 2010. Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. *Biology and Fertility of Soils*. 46(7): 727-738. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0480-x>
- Compant, S.; Duffy, B.; J. Nowak, C. Clément, E.A. 2005. Use of plant growth promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects.

Applied and Environmental Microbiology 71: 4951-4959.
<https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005>

- Condrón, L.M. 2004. Phosphorus-surplus and deficiency. In: Managing Soil Quality: Challenges in Modern Agriculture: CABI Books. p. 69-84.
<https://doi.org/10.1079/9780851996714.0069>
- Correa, O.S. 2013. Los microorganismos del suelo inminente en la nutrición vegetal. Tercera Jornada del Instituto de Investigaciones en Biociencias Agrícolas y Ambientales. Aportes de la microbiología a la producción de Cultivos. Ed. Díaz-Zorita, M.; Correa, O.; Fernández-Canigia, M.V.; Lavado, R.S. p. 1-11. <https://www.researchgate.net/publication/306960003>
- Dalla, S.O.R.; Socol, C.R.; Ronzelli, J.P.; Fernández, H.F.; Michelena, A.G.L.; Dalla, S.H.S.; Pandey, A. 2004. Effects of inoculation of *Azospirillum* sp. in maize seeds under field conditions. Food, Agriculture and Environment. 2(1): 238-242.
https://www.researchgate.net/publication/266355181_Effects_of_inoculation_of_Azospirillum_sp_in_maize_seeds_under_field_conditions
- Dixon, G.R.; Tilston, E.L. 2010. Soil-borne pathogens and their interactions with the soil environment. In: Dixon, G.R.; Tilston, E.L. (Eds) Soil Microbiology and Sustainable Crop Production. Ed. Springer. (Netherlands). pp.197-271. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9479-7_6
- Djordjević, M.; Ugrinović, M.; Šević, M.; Djordjević, R.; Mijatović, M. 2011. Antagonistic effect of soil bacteria against fusarium wilt of pepper *in vitro*. Acta Agriculturae Serbica. 16: 19-31. <https://www.researchgate.net/publication/259157562>
- Do Carmo, F.L.; dos Santos, H.F.; Martins, E.F.; Van Elsas, J.D.; Rosado, A.S.; Peixoto, R.S. 2011. Bacterial structure and characterization of plant growth promoting and oil degrading bacteria from the rhizospheres of mangrove plants. Journal Microbiology. 49: 535-43.
<https://doi.org/10.1007/s12275-011-0528-0>
- Dobbelaere, S.; Vanderleyen, J.; Okon, Y. 2003. Plant growth-promotion effects of *diazotrophs* in the rhizosphere. Critical Reviews in Plant Sciences. 22(2): 107-149.
<https://doi.org/10.1080/713610853>
- Döbereiner, J. 1997. Importância da fixação biológica de nitrogênio para a agricultura sustentável. Biotecnologia Ciencia and Desenvolvimento Encarte Especial, 1, 2-3.
<https://www.embrapa.br/documents/10180/15892812/Publica%C3%A7%C3%B5es.pdf/22d03278-f561-4345-949c-fa5a9f9e4aa3>
- Döbereiner, J. 1995. Isolation and identification of aerobic nitrogen-fixing bacteria from soil and plants, in: K. Alef (Ed.). Methods in applied soil microbiology and biochemistry, Nannipieri. London: P. Academic. Press. Pp. 134-141. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02738.x>
- Enespa; Dwivedi, S.K. 2014. Effectiveness of some antagonistic fungi and botanicals against *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* infecting brinjal and tomato plants. Asian Journal of Plant Pathology. 8(1): 18-25.
<https://doi.org/10.3923/ajppaj.2014.18.25>
- Ezziyyani M.; Sid-Ahmed A.; Pérez-Sánchez, C.; Requena, M.E.; Candela, M.E. 2004. Control biológico por microorganismos antagonistas. Revista Horticultura. 191: 8-15.

http://www.horticom.com/revistasonline/horticultura/rh191/08_15.pdf

- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2018. FAOSTAT Producción Agrícola [online]. Consultado el 8 de marzo de 2018. <http://www.fao.org/faostat/en/#data>
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2019. FAOSTAT Producción Agrícola [online]. Consultado el 8 de marzo de 2019. <http://www.fao.org/faostat/en/#data>
- Farag, M.A.; Zhang, H.; Ryu, C.M. 2013. Dynamic chemical communication between plants and bacteria through airborne signals: Induced resistance by bacterial volatiles. *Journal of Chemical Ecology*. 39: 1007-1018. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0317-9>
- Fassihiani, A. 2000. Symptomless carriers of the causal agent of tomato wilt pathogen. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 2: 27-32. <https://jast.modares.ac.ir/article-23-1450-en.pdf>
- Favela, C.E.; Preciado, R.P.; Benavides, M.A. 2006. Manual para la preparación de soluciones nutritivas. Departamento de Horticultura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna. Torreón, Coahuila. pp. 146. https://www.nutricaoedplantas.agr.br/site/downloads/unesp_jaboticabal/Manual_Soln_Nutritivas.pdf
- Figueroa-López, A.M.; Cordero-Ramírez, J.D.; Martínez-Álvarez, J.C.; López-Meyer, M.; Lizárraga-Sánchez, G.J.; Félix-Gastélum, R.; Castro-Martínez, C.; Maldonado-Mendoza, I.E. 2016. Rhizospheric bacteria of maize with potential for biocontrol of *Fusarium verticillioides*. *SpringerPlus*. 5: 330. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1780-x>
- García-Olivares, J.G.; Moreno-Medina, V.R.; Rodríguez-Luna, I.C.; Mendoza-Herrera A.; Mayek-Pérez, N. 2007. Efecto de cepas de *Azospirillum brasilense* en el crecimiento y rendimiento de grano del maíz. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 30(3): <https://www.redalyc.org/pdf/610/61003013.pdf>
- Gerretsen, F.C. 1948. The influence of microorganisms on the phosphate intake by the plant. *Plant and Soil*. 1: 51-81. <https://doi.org/10.1007/BF02080606>
- Gleen, C.T.; Schable, A.N. 2005. Isolating Microsatellite DNA Loci. *Methods in Enzymology*. Vol. 395: 202-222. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)95013-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)95013-1)
- Gojon, A.; Nacry, P.; Jean, C. 2009. Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. *Current Opinion in Plant Sciences*. 12(3): 328-338. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.04.015>
- Goldstein, A.H.; Krishnaraj, P.U. 2007. Phosphate solubilizing microorganisms vs. phosphate mobilizing microorganisms: what separates a phenotype from a trait? In: Velázquez, E., Rodríguez-Barrueco, C. (eds). *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Developments in Plant and Soil Sciences*. Vol. 102. Springer, Dordrecht, p. 203-213. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5765-6_31
- Govern, R.J. 2015. Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. *Crop Protection*. 73:78-92. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.021>
- Govern, R.J.; Datnoff, L.E. 1992. *Fusarium* crown and root rot of tomato: reevaluation of management strategies. In: Vavrina, C.S. (Ed.), *Fla. Tom. Instit. Proc., Vegetable Crops Special Series, SS HOS 1 University of Florida-IFAS*, p. 75-82.

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262017000200014

- Govern, R.J.; Sorley, R. 2012. Management of bacterial and fungal plant pathogens by soil solarization. In: Gamliel, A., Katan, J. (Eds.), Soil Solarization: Theory and Practice. APS Press, Minneapolis, MN. p. 53-62. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262017000200014
- Groudev, S.N. 1987. Use of heterotrophic microorganisms in mineral biotechnology. Acta Biotechnology. 7:299-306 <https://doi.org/10.1002/abio.370070404>
- Guzmán, A.; Obando, M.; Rivera, D.; Bonilla, R. 2012. Selección y caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) asociadas al cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum*). Revista Colombiana de Biotecnología. 14: 182-90. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752012000100016
- Han, H.; Supanjani, S.; Lee, K.D. 2006. Effect of co-inoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. Plant, Soil and Environment. 52(3): 130-136. <https://doi.org/10.17221/3356-PSE>
- Hernández, A.; Plana, R.; Martín, G.M.; Santander, J.L. 2002. Estudio de algunos géneros microbianos asociados a diferentes variedades de trigo (*Triticum aestivum* L) en suelo ferralítico rojo. Cultivos Tropicales. 23(1): 1520. <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193218114003.pdf>
- Hiltner, L. 1904. Über neuere erfahrungen und probleme auf dem gebiete der bodenbakteriologie unter besonderden berucksichtigung und brache. Arb. Dtsch. Landwirtsch. Gesellschaft 98: 59-78. <https://doi.org/10.12691/aees-1-6->
- Horinouchi, H.; Watabane, H.; Taguchi, Y.; Muslim, A.; Hyakumachi, M. 2011. Biological control of Fusarium wilt of tomato with *Fusarium equiseti* GF191 in both rock wool and soil systems. BioControl. 56(6): 915-923. <https://doi.org/10.1007/s10526-011-9369-3>
- Hossain, M.J.; Ran, C.; Liu, K.; Ryu, C.; Rasmussen-Ivey, C.R.; Williams, M.A.; Hassan, M.K.; Choi, S. K.; Jeong, H.; Newman, M.M.; Kloepper, J.W.; Liles, M.R. 2015. Deciphering the conserved genetic loci implicated in plant disease control through comparative genomics of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*. Frontiers in Plant Science. 6: 631. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00631>
- González, H.A.; Pérez, L.D.; Franco, M.O.; Balbuena, M.A.; Gutiérrez, R.F.; Romero, S.H. 2011. Respuesta de tres cultivares de maíz a la inoculación con *Azospirillum brasilense* bajo cuatro diferentes dosis de nitrógeno. Ciencia Ergo Sum. 18(1): 51-58. <https://www.redalyc.org/pdf/104/10416528006.pdf>
- Inami, K.; Kashiwa, T.; Kawabe, M.; Onokubo-Okabe, A.; Ishikawa, N.; Rodríguez-Pérez, J.E., Hozumi, T.; Caballero, L.A.; De Baldarrago, F.C.; Roco, M.J., Madadi, K.A.; Peever, T.L.; Teraoka, T.; Kodama, M.; Arie, T. 2014. The tomato wilt fungus *Fusarium oxysporum* F. Sp. *lycopersici* shares common ancestors with nonpathogenic *F. oxysporum* isolated from wild tomatoes in the peruvian andes. Microbes and Environments. 29(2): 200-210. <https://doi.org/10.1264/jsme2.me13184>
- James, E.K.; Olivares, F.L. 1998. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. Critical Reviews in Plant Sciences. 17(1): 77-119. <https://doi.org/10.1080/07352689891304195>

- Jones, D. 2011. Solubilization of phosphorus by soil microorganism. In: Phosphorus in action. Springer Verlag Berlin Heidelberg, vol. 26. p. 169-198 <http://www.fsp-parrur.irenala.edu.mg/Data-FSP>
- Jones, J.P. 1991. *Fusarium* wilt. In: Compendium of tomato diseases. Jones, J.B.; Jones, J.P.; Stall, R.E.; Zitter, T.A. (Eds). St. Paul, Minnesota, APS Press. <https://doi.org/10.4236/me.2014.513114>
- Kant, P.; Reinprecht, Y.; Martin, C.J.; Islam, R.; Pauls, K.P. 2011. Integration of biotechnologies: disease resistance pathology *Fusarium*. In: Moo-Young M. (Ed.). Comprehensive Biotechnology, Second Edition, Elsevier, Amsterdam. p. 729-743. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262017000200014
- Katan, T.; Shlevin, E.; Katan, J. 1997. Sporulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on stem surfaces of tomato plants and aerial dissemination of inoculum. Phytopathology. 87:712-719. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.7.712>
- Khalid, A.; Arshad, M.; Zahir, Z.A. 2004. Screening plant-growth promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. Journal of Applied Microbiology. 96:473-480. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02161.x>
- Khan, M.S.; Zaidi, A.; Ahemad, M.; Oves, M.; Wani, P.A. 2010. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. Archives of Agronomy and Soil Science. 56(1): 73-98. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03650340902806469>
- Khan, M.S.; Zaidi, A.; Wani, P.A. 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture – A review. Agronomy for Sustainable Development. 27: 29-43. <https://doi.org/10.1051/agro:2006011>
- Khannous, L.; Mouna, J.; Mouna, D.; Ramzi, M.; Nour, C.; Bassem, K.; Néji G.; Imen, F. 2014. Isolation of a novel amylase and lipase-producing *Pseudomonas luteola* strain: study of amylase production conditions. Lipids in Health and Disease. 13: 9. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-13-9>
- Kim, D.S.; Cook, R.J.; Weller, D.M. 1997. *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root disease of wheat grown with reduced tillage. Phytopathology. 87: 551-558. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.5.551>
- Kloepper, J.W.; Schroth, M.N. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In Angers (ed), proc. 4th int. Conf. Plant path. Bact. INRA, Gibert-Clarey, Tours, France. 4: 879-82. <https://www.researchgate.net/publication/284682983>
- Kloepper, J.W.; Schroth, M.N. 1989. Plant growth-promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. Phytopathology. 71:642-644. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1981Articles/Phyto71n06_642.PDF
- Korsten, L.; De Villiers, E.E.; Wehner, R.C.; Kotzet, J.M. 1997. Field spray of *Bacillus subtilis* and fungicides for control of preharvest fruit disease of avocado in South Africa. Plant Disease. 81: 455-459. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.5.455>
- Kucey, R.M.; Leggett, M.E. 1989. Microbial mediated increases in plant available phosphorus. In: Advances in Agronomy. 42: 199-228. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60525-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60525-8)

- Kumar, B.S.; Dube, H.C. 1992. Seed bacterization with a fluorescent *Pseudomonas* for enhanced plant growth, yield and disease control. *Soil Biology and Biochemistry*. 24: 539-542. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(92\)90078-C](https://doi.org/10.1016/0038-0717(92)90078-C)
- Lambers, H.; Finnegan, P.; Laliberté, E.; Pearce, Stuart J.; Ryan, M.H.; Shane, M.W.; Veneklaas, E.J. 2011. Phosphorus nutrition of Proteaceae in severely phosphorus-impooverished soils: are there lessons to be learned for future crops?. *Plant Physiology*. 156(3): 1058-1066. <https://doi.org/10.1104/pp.111.174318>
- Lambers, H.; Shane, M.W.; Cramer, M.D.; Pearce, S.J.; Veneklaas, E.J. 2006. Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits. *Annals of Botany*. 98(4): 693-713. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl114>
- Lazzarete, E.; Menten, J.O.M.; Bettiol, W. 1994. *Bacillus subtilis* antagonicos aos principais patógenos associados a sementes de feijao e trigo. *Fitopatología Venezolana*. 7(2): 42-46 <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/12395/bacillus-subtilis-antagonicos-aos-principais-patogenos-associados-a-sementes-de-feijao-e-trigo>
- Leaungvutiviroj, Ch.; Ruangphisarn, P.; Hansanimitkul, P.; Shinkawa, H.; Sasaki, K. 2010. Development of a new biofertilizer with a high capacity for N₂ fixation, phosphate and potassium solubilization and auxin production. *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry*. 74(5): 1098-1101. <https://doi.org/10.1271/bbb.90898>
- Leggett, M.; Cross, J.; Hnatowich, G. G. 2007. Challenges in commercializing a phosphates solubilizing microorganism: *Penicillium bilaiae*, a case history. In: First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Springer. p. 215-222. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5765-6_32
- Leslie, J.F.; Summerell, B.A. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. First Ed. Blackwell Publishing (Eds). USA: Iowa. p. 388. doi.org/10.1002/9780470278376
- Ley, J. D.; Swings, J.; Gossele, F. 1984. Key to the genera use of the family Acetobacteraceae. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. (Eds. N.R. Kreig and J.G. Holt). Baltimore, USA: Ed. Williams & Wilkins., 268. [https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkozje\)\)/reference/referencespapers.aspx?referenceid=1710730](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkozje))/reference/referencespapers.aspx?referenceid=1710730)
- Lian, B.; Wang, B.; Pan, M.; Liu, C.; Teng, H. 2007. Microbial release of potassium from K-bearing minerals by thermophilic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 72(1): 87-98. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2007.10.005>
- Liu, W.; Xu, X.; Wu, X.; Yang, Q.; Luo, Y.; Christie, P. 2006. Decomposition of silicate minerals by *Bacillus mucilaginosus* in liquid culture. *Environmental Geochemistry and Health*. 28(1-2): 133-140. <https://doi.org/10.1007/s10653-005-9022-0>
- Luna-Martínez, L.; Martínez-Peniche, R.A.; Hernández-Iturriaga, M.; Arvizu- Medrano, S.M.; Pacheco-Aguilar, J.R. 2013. Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 36(1): 63-69. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802013000100007
- Malik, D.K.; Sindhu, S.S. 2011. Production of indole acetic acid by *Pseudomona* ssp: effect of coinoculation with *Mesorhizobium* sp. *Cicer* on nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum*). *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 17: 25-32.

<https://doi.org/10.1007/s12298-010-0041-7>

- Marschner, P. 2007. Plant-microbe interactions in the rhizosphere and nutrient cycling. In: Nutrient Cycling in Terrestrial Ecosystems. Springer-Verlag, Berlin. p. 159-181. https://doi.org/10.1007/978-3-540-68027-7_6
- Martínez, L.; Caballero-Mellado, J. 2003. *Diazotrophic* bacteria associated with banana (*Musa* spp.). Plant and Soil. 257: 35-47. <https://doi.org/10.1023/A:1026283311770>
- Mojica, M.V.; Luna, O.H.A.; Sandoval, C.C.F.; Pereyra, A.B.; Morales, R.L.H.; González, A.N.A.; Hernández, L.C.E; Alvarado, G.O.G. 2009. Control biológico de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) por *Bacillus thuringiensis*. Phytón. 78(2):105-110. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-56572009000200004
- Molina-Romero, D.; Bustillos-Cristales, M.; Rodríguez-Andrade, O.; Morales-García, Y.E.; Santiago-Saenz, Y.; Castañeda-Lucio, M.; Muñoz-Rojas, J. 2015. Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. Biológicas. 17(2): 24-34. <https://www.researchgate.net/publication/293086504>
- Moreno, N.; Moreno, R.; Uribe-Velez, D. 2007. Biofertilizantes para la agricultura en Colombia. En: Biofertilizantes en Iberoamérica: una visión técnica, científica y empresarial. Imprenta Denad Internacional, Montevideo, p. 38-45 <http://www.scielo.org.co/pdf/entra/v10n2/v10n2a18.pdf>
- Nannipieri, P.; Giagnoni, L.; Landi, L.; Renella, G. 2011. Role of phosphatase enzymes in soil. In: Bünemann, E.; Oberson, A.; Frossard, E. (eds) Phosphorus in action. Vol. 26. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 215-243. https://doi.org/10.1007/978-3-642-15271-9_9
- Oberson, A.; Joner, E.J. 2004. Microbial turnover of phosphorus in soil. In: Organic Phosphorus in the Environment. CAB International. pp. 133-164. <https://doi.org/10.1079/9780851998220.0133>
- Okon, Y. 1985. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. Trends in Biotechnology. 3, 223-228. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(85\)90012-5](https://doi.org/10.1016/0167-7799(85)90012-5).
- Okon, Y.; Vanderleyden, J. 1998. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. Features, 63: 366-370. https://kuleuven.limo.libis.be/discovery/search?query=any,contains,LIRIAS1759148&tab=LIRIAS&search_scope=lirias_profile&vid=32KUL_KUL:Lirias&offset=0
- Ordookhani, K.; Sharafzadeh, S.; Zare, M. 2011. Influence of PGPR on growth, essential oil and nutrients uptake of sweet basil. Advances in Environmental Biology. 5(4): 672-677. https://www.researchgate.net/publication/228448782_Influence_of_PGPR_on_Growth_Essential_Oil_and_Nutrients_Uptake_of_Sweet_Basil
- Ortíz-Castro, R.; Contreras-Cornejo, H.A.; Macías-Rodríguez, L.; López-Bucio, J. 2009. The role of microbial signals in plant growth and development. Plant Signal & Behavior 4(8): 701-12. <https://doi.org/10.4161/psb.4.8.9047>
- Pandey, A.; Sharma, E.; Palni, L.M.S. 1998. Influence of bacterial inoculation on maize in upland farming systems of the Sikkim Himalaya. Soil Biology and Biochemistry. 30(3): 379-384. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(97\)00121-1](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00121-1)
- Paredes, M. 2010. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fósforo: una

revisión crítica. Terra Latinoamericana. 28(1): 61-70.
https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792010000100007

- Pérez, D.; García-Godos, P. 2019. Identificación del agente causal del marchitamiento en *Caesalpinia spinosa* “Tara” y el efecto antagónico de aislados de *Bacillus* spp. y *Trichoderma* sp. *Ecología Aplicada*. 18(1): 51. <https://doi.org/10.21704/rea.v18i1.1306>
- Pierzynski, G.; Sims, J.G. 2005. *Soils and environmental quality*. 3rd ed. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 584. <https://www.routledge.com/Soils-and-Environmental-Quality/Pierzynski-Vance-Sims/p/book/9780849316166>
- Poupin, M.J.; Timmermann, T.; Vega, A.; Zuñiga, A.; González, B. 2013. Effects of the plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *PlosOne*. 8: 6943. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0069435>
- Prajapat K.; Sharma M.C.; Modi H.A. 2013. Growth promoting effect of potassium solubilizing microorganisms on okra (*Abelmoschus esculentus*). *International Journal of Agricultural Science and Research*. 3(1): 181-188. https://www.researchgate.net/publication/235943493_Growth_promoting_effect_of_potassium_solubilizing_microorganisms_on_okra_Abelmoschus_esculentus
- Ramyabharathi, S.; Raguchander, T. 2012. Efficacy of secondary metabolites produced by *Bacillus subtilis* EPCO16 against tomato wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Journal of Mycology and Plant Pathology*. 44(2): 148-156. https://www.academia.edu/7744686/Efficacy_of_Secondary_metabolites_produced_by_Bacillus_subtilis_EPCO16_against_tomato_wilt_pathogen_Fusarium_oxysporum_f_sp_lycopersici
- Rangel-Lucio, J.A.; Rodríguez-Mendoza, M.N.; Ferrera-Ronald, C.J.; Ramírez-Rosa, A.E.; Alvarado, E. 2011. Afinidad y efecto de *Azospirillum* sp. en maíz. *Agronomía Mesoamericana*, 22(2): 269-279 <https://www.redalyc.org/pdf/437/43722407004.pdf>
- Rehm, G.; Schmitt, M. 2002. Potassium for crop production. Regents of the University of Minnesota. <https://extension.umn.edu/phosphorus-and-potassium/potassium-crop-production>
- Rick, C.M. 1990. Perspectives from plant genetics: The tomato genetics stock center. Genetic Resources at Risk; Scientific Issues, Technologies, and Funding Policies. Report No. 5. Published by Genetic Resources Conservation Program. Division of Agriculture and Natural Resources University of California. pp. 11-19.
- Rios-Velasco, C.; Caro-Cisneros, J.N.; Berlanga-Reyes, D.I.; Ruíz-Cisneros, M.F.; Ornelas-Paz, J.J.; Salas-Marina, M.A.; Villalobos-Pérez, E.; Guerrero-Prieto, V.M. 2016. Identification and antagonistic activity in vitro of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 34: 84-99. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507-1>
- Rives, N.; Acebo.; Hernández, A. 2007. Bacterias promotoras de crecimiento vegetal en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). perspectivas de su uso en Cuba. *Cultivos Tropicales*. 28(2): 29-38. <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193217731004.pdf>
- Robinson, D. 2005. Integrated root responses to variations in nutrient supply. In: Nutrient acquisition by plants, an ecological perspective. In: *Ecological Studies*, vol. 181. Springer-

- Verlag, Berlin Heidelberg. p. 43-61. https://link.springer.com/chapter/10.1007/3-540-27675-0_3
- Rodríguez, C.E.A. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. Applied and Environmental Microbiology. 44(4): 990-991. <https://doi.org/10.1128/aem.44.4.990-991.1982>
- Rodriguez, H.; Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advances, 17(4-5): 319-339. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2)
- Rojas, S.J.; Moreno, S.N. 2008. Producción y formulación de prototipos de un biofertilizante a partir de bacterias nativas asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa*). Revista Colombiana de Biotecnología. 10(2): 50-62. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752008000200007
- Sahoo, H.R.; Gupta, N. 2014. Phosphate solubilizing fungi: impact on growth and development of economically important plants. In: Khan, M.S.; Zaidi, A.; Musarrat, J. (eds.), Phosphate Solubilizing Microorganisms. p. 87-112. https://doi.org/10.1007/978-3-319-08216-5_4
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2022. Protocolo de Montreal relativo a las sustancias que agotan la capa de ozono. <https://www.gob.mx/semarnat/acciones-y-programas/protocolo-de-montreal-relativo-a-las-sustancias-que-agotan-la-capa-de-ozono-protocolo-de-montreal>
- Sharan, A.; Shikha; Darmwal, N.; Gaur, R. 2008. *Xanthomonas campestris*, a novel stress tolerant, phosphate-solubilizing bacterial strain from saline-alkali soils. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 24(6): 753-759. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9535-z>
- Sharpley, A. 2012. Phosphorus availability. In: Huang, P.M.; Li, Y.S.; Malcolm E.; Huang, P.M. (Eds). Handbook of soil sciences. Properties and processes. Vol. 2. pp. 11.14 – 11.37. Boca Raton, Fla.: CRC.
- Sims, J.V.; P. 2005. Phosphorus in soils. Overview. Encyclopedia of Soils in the Environment. 3: 202-210. <https://doi.org/10.1016/B0-12-348530-4/00237-X>
- Singh, B.; Satyanarayana, T. 2012. Production of phytate-hydrolyzing enzymes by thermophilic moulds. African Journal of Biotechnology. 11(59): 12314-12324. <https://www.researchgate.net/publication/268200729>
- Smith, F.; Mudge, S.; Rae, A. 2007. Phosphate transport in plants. In: Plant Soil. 248: 71-83. <https://DOI.ORG/10.1023/A:1022376332180>
- Somers, E.; Vanderleyden, J.; Srinivasan, M. 2004. Rhizosphere bacterial signaling: a love parade beneath our feet. Annual Review Microbiology. 30(4): 205-240. <https://doi.org/10.1080/10408410490468786>
- Sosa L.A.; Álvarez-Rivera, V.; González G.M. 2006. Nuevos aislados de *Bacillus* spp. antagonistas a *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* y *Pythium aphanidermatum*. Fitosanidad. 10(1): 73-74. <https://www.redalyc.org/pdf/2091/209116158010.pdf>
- Stearns, J.C.; Woody, O.Z.; McConkey, B.J.; Glick, B.R. 2012. Effects of bacterial ACC deaminase on *Brassica napus* gene expression. Molecular Plant-Microbe Interactions. 25(5): 668-676. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-11-0213>

- Sugumaran, P.; Janarthanam, B. 2007. Solubilization of potassium containing minerals by bacteria and their effect on plant growth. *World Journal of Agricultural Sciences*. 3(3): 350-355. <https://www.researchgate.net/publication/236846002>
- Supanjani, S.; Hio, S.; Jung, Jae.; Sung, Lee.; Kiung, D. 2006. Rock phosphate potassium and rock-solubilizing bacteria as alternative, sustainable fertilizers. *Agronomy for Sustainable Development*. 26(4): 233-240. <https://doi.org/10.1051/agro:2006020>
- Trivedi, P.; Pandey, A.; Palni, L.M.S. 2008. *In vitro* evaluation of antagonistic properties of *Pseudomonas corrugata*. *Microbiological Research*. 163: 329-336 <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.06.007>
- Ullman, W.J.; Kirchman, D.L.; Welch, S. 1996. Laboratory evidence for microbially mediated silicate mineral dissolution in nature. *Chemical Geology*. 132:11-17 [https://doi.org/10.1016/S0009-2541\(96\)00036-8](https://doi.org/10.1016/S0009-2541(96)00036-8)
- Urbano, T. P. 2003. *Tratado de Fitotecnia General*. Bilbao: Mundi Prensa Libros. <https://www.mundiprensa.mx/catalogo/9788484763307/tratado-de-fitotecnia-general>
- Uribe, D.; Sanchez,-N.; Jimena, V. 2010. Role of microbial biofertilizers in the development of a sustainable agriculture in the tropics. Chap. 21. In: *Soil biology and agriculture in the tropics*. Soil Biology. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. p. 235-250. https://doi.org/10.1007/978-3-642-05076-3_11
- Urquiaga, S.; Cruz, K.H.S.; Boddey, R.M. 1992. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: Nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. *Soil Science Society of America Journal*. 56(1): 105-11. <https://doi.org/10.2136/sssaj1992.03615995005600010017x>
- Vacheron, J.; Desbrosses, G.; Bouffaud, M. L.; Touraine, B.; Moenne-Loccoz, Y.; Muller, D.; Legendre, L.; Wisniewski-Dye, F.; Prigent-Combaret, C. 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*. 4: 356 <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00356>
- Valdivia-Urdiales, B.; Sánchez-Yáñez, J.M.; Peña-Cervantes, E.; Fernández-Brondo, J.M. 1999. Efecto de la inoculación con *Glomus* spp y *Pseudomonas putida* en trigo. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 41(4): 231-237. <https://www.researchgate.net/publication/320841966>
- Valenzuela-González, F.; Casillas-Hernández, R.; Villalpando, E.; Vargas-Albores, F. 2015. The 16S RNA gene in the study of marine microbial communities. *Ciencias Marinas*. 41(4): 297-313. <https://doi.org/10.7773/cm.v41i4.2492>
- Valverde, A.; Burgos, A.; Fiscella, T.; Rivas, R.; Velázquez, E.; Rodríguez-Barrueco, C.; Cervantes, E.; Chamber, M.; Igual, J.M. 2006. M. Differential effects of co-inoculations with *Pseudomonas jessenii* PS06 (a phosphate-solubilizing bacterium) and *Mesorhizobium ciceri* C-2/2 strains on the growth and seed yield of chickpea under greenhouse and field conditions. *Plant Soil*. 287: 43-50. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9057-8>
- Vance, C.P.; Uhde-Stone, C.M Allan, D.L. 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants securing a nonrenewable resource. *New Phytologist Foundation*. 157(3): 423-447. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00695.x>
- Vilchez, S.; Manzanera, M. 2011. Biotechnological uses of desiccation-tolerant microorganisms

- for the rhizoremediation of soils subjected to seasonal drought. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 91: 1297-1304. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3461-6>
- Wakelin, S.A.; Warren, R.A.; Harvey, P.R.; Ryden, M.H. 2004. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. *Biology and Fertility of Soils*. 40: 36-43. <https://doi.org/10.1007/s00374-004-0750-6>
- Wakita, J.; Shimada, H.; Itoh H.; Matsuyama, T.; Matsushita, M. 2001. Periodic colony formation by bacterial species *Bacillus subtilis*. *Journal of the Physical Society of Japan*. 70: 911-919. <https://doi.org/10.1143/JPSJ.70.911>
- Wang, J. ; Zhou, C. ; Xiao, X.; Xie, Y.; Zhu, L.; Ma, Z. 2017. Enhanced iron and selenium uptake in plants by volatile emissions of *Bacillus amyloliquefaciens* (BF06). *Applied Sciences*. 7(85): 1-21. <https://doi.org/10.3390/app7010085>
- Weisburg, W.G.; Barns, S.M.; Pelletier, D.A.; Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 173(2): 697-703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
- Whitelaw, M.A. 1999. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. *Advances in Agronomy*. 69: 99-151. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60948-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60948-7)
- Whitman, W.B.; Goodfellow, M.; Kämpfer, M.; Busse, H.; Trujillo, M.E.; Ludwig, W.; Susuki, K. 2012. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 5. Ed. Springer Verlag, N.Y., USA. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-0-387-68233-4>
- Zaidi, A.; Khan M.S.; Ahemad, M.; Oves, M.; Wani, P.A. 2009. Recent advances in plant growth promotion by phosphate-solubilizing microbes. *Microbial Strategies for Crop Improvement*. Springer-Verlag, Berlin. p. 2. https://doi.org/10.1007/978-3-642-01979-1_2
- Zúñiga, D.; Gutiérrez-Correa, M. 1982. Dinámica poblacional de diazótrofos libres fijadores de nitrógeno en la rizósfera de *Sicyos baderoa*. *Zonas Áridas*. 2: 79-86.