



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMIA
POSTGRADO EN AGRONOMIA



Determinación del efecto de bacterias antagonistas y bioestimulantes comerciales sobre el control a *Ralstoniasolanacearum* Smith en plantas de pimentón (*Capsicum annuum* L.)

**Autor: Paola M. Rodolfo Acuña.
Tutora: Profa Yonis Hernández**

Resumen

Ralstoniasolanacearum Smith, causante de la marchitez bacteriana, es considerada uno de los patógenos de mayor relevancia, por su nivel de afectación y por el amplio número de especies de importancia económica que ataca, entre ellas, el Pimentón (*Capsicum annuum* L.), en este cultivo puede llegar a causar pérdidas económicas considerables ya que su control es difícil. En la búsqueda de alternativas para el manejo del patógeno y del cultivo, esta investigación tuvo como objetivo evaluar el potencial biocontrolador y bioestimulante de microorganismos bacterianos aislados de la rizósfera y filoplano de pimentón y de tres productos comerciales para tal fin, se colectaron muestras de plantas de pimentón ubicadas en zonas de producción agrícola del estado Carabobo, de las cuales se realizaron aislamientos; las bacterias obtenidas fueron confrontadas *in vitro* con *R. solanacearum*, seleccionando las cuatro más promisorias por su actividad antagonista para ser utilizadas en pruebas de umbráculo y campo, incluyendo además productos comerciales para determinar la capacidad de biocontrol y promotor del crecimiento en plantas de pimentón. Las bacterias más promisorias como biocontroladoras fueron identificadas por pruebas fenotípicas y moleculares. El diseño de experimentos fue un completamente aleatorizado tanto para los ensayos *in vitro* como en umbráculo. En el ensayo en campo el diseño fue un bloques al azar conformado por cuatro bloques donde la unidad experimental estuvo conformada por tres plantas. Para todos los ensayos se efectuó el ANAVAR con un nivel de significancia de 5% en aquellos casos donde no hubo una distribución normal de los errores se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal y Wallis. Las cuatro bacterias seleccionadas por mayor antagonismo *in vitro* contra *ralstoniasolanacearum* fueron tres de la rizósfera y una del filoplano, dos ubicadas en el género *Pseudomonas*, una en *Serratia* y otra en *Bacillus*. En umbráculo la mayor eficiencia como biocontrolador fue observada en los tratamientos conformados por la bacteria *Serratia* sp y el producto comercial Biorend® con un 91,6 % de eficiencia la de los demás tratamientos vario de 41,6% a 66,6% siempre superior al testigo que fue de 16,6% . En cuanto a la capacidad de promoción del crecimiento, en umbráculo, la mayoría de los tratamientos aumentaron la altura de planta, diámetro del tallo, número de hojas y rendimiento con respecto al testigo, *Serratia* sp fue la que indujo el mayor incremento en casi todas las variables consideradas, incrementando el rendimiento de frutos en un 108 %. Por otra parte, en el ensayo realizado en campo, algunos tratamientos se comportaron inferiores al testigo en los parámetros medidos, sin embargo, se evidenció un aumento en el rendimiento de los tratamientos conformados por las bacterias antagonistas. La capacidad de cada cepa bacteriana de producir enzimas quitinolíticas, sideróforos, ácido cianhídrico, indolacético y solubilizar fosfato fue diferente. La actividad quitinasa se detectó en *Serratia* y *Pseudomonas*, la capacidad de producción de sideroforos, ácido cianhídrico y solubilizar fosfato principalmente en las cepas de *Pseudomonas*. Con esta investigación se demostró el potencial de los microorganismos bacterianos para ser usados como biocontroladores y biofertilizantes.

Palabras clave: Control biológico, PGPR, Marchitez bacteriana, Mecanismos de acción, rendimiento

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	v
RESUMEN	vii
TABLA DE CONTENIDO	viii
INDICE DE CUADROS	x
INDICE DE FIGURAS	xi
INDICE DE ANEXOS	xi
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	3
Objetivo General	3
Objetivos Específicos	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
Generalidades del Pimentón.....	4
Clasificación taxonómica.....	4
Principales enfermedades del pimentón.....	5
<i>Ralstoniasolanacearum</i>	6
Epidemiología y ciclo de vida.....	7
Sintomatología.....	8
Patogénesis.....	9
Medidas de control.....	11
Bacterias promotoras de crecimiento.....	13
Mecanismos implicados en la actividad PGPR.....	15
Resistencia sistémica inducida.....	22
Bioestimulantes en la agricultura	23
Quitosano.....	23
Nutrición mineral como agente de defensa para las plantas.....	24
MATERIALES Y METODOS	26
Lugar de estudio.....	26
Pruebas de patogenicidad.....	26
Aislamiento de Bacterias de la rizosfera.....	27
Aislamiento de Bacterias del filoplano.....	27
Confrontación in vitro de los aislamientos bacterianos con <i>Ralstoniasolanacearum</i>	28
Confrontación in vivo de los aislamientos bacterianos con <i>Ralstoniasolanacearum</i>	28
Determinación en umbráculo del efecto sobre variables biométricas de las bacterias antagonistas más promisorias in vitro en el control de <i>Ralstoniasolanacearum</i>	29
Evaluación en condiciones de campo del efecto de bacterias antagonistas y productos comerciales sobre variables biométricas en el cultivo de Pimentón.....	31
Identificación de algunos de los mecanismos de biocontrol de acción realizado por de las bacterias antagonistas más promisoras in vitro.....	31

Solubilización de fosfato.....	31
Producción de ácido indolacético.....	32
Producción de ácido cianhídrico.....	32
Producción de Sideróforos.....	33
Actividad quitinolítica.....	33
Diálisis de quitina coloidal.....	33
Determinación cualitativa de actividad quitinasa.....	34
Identificación molecular de bacterias más promisorias <i>in vitro</i>	34
Identificación bioquímica de las bacterias más promisorias <i>in vitro</i>	35
Análisis estadístico.....	36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
Caracterización morfológica de <i>Ralstoniasolanacearum</i>	38
Patogenicidad de <i>Ralstonia solanacearum</i>	38
Aislamientos de bacterias de la rizosfera y filoplano.....	39
Confrontación <i>in vitro</i> de los aislamientos bacterianos con <i>Ralstoniasolanacearum</i>	40
Evaluación en condiciones de umbráculo de la capacidad antagonista de las bacterias más promisorias <i>in vitro</i> y de 3 productos comerciales (fitofortificantes y bioestimulantes) sobre <i>Ralstoniasolanacearum</i>	43
Determinación en umbráculo del efecto sobre variables biométricas de las bacterias antagonistas más promisorias <i>in vitro</i> en el control de <i>Ralstoniasolanacearum</i>	46
Evaluación en condiciones de campo del efecto de bacterias antagonistas y productos comerciales sobre variables biométricas en el cultivo de Pimentón	49
Producción de quitinasas.....	55
Producción de Ácido cianhídrico.....	57
Solubilización de fosfato.....	59
Producción de sideróforos.....	61
Identificación molecular de los microorganismos.....	63
Caracterización bioquímica y fisiológica de las cepas bacterianas.....	66
Conclusiones	68
Recomendaciones	69

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tratamientos aplicados a plantas de pimentón con bacterias antagonistas y productos comerciales para medir su efecto sobre el control a <i>Ralstoniasolanacearum</i> en condiciones de umbráculo.....	29
Cuadro 2. Tratamientos aplicados en plantas de pimentón en condiciones de umbráculo para medir el efecto de bacterias antagonistas y productos comerciales sobre variables biométricas.....	30
Cuadro 3. Tratamientos aplicados a plantas de pimentón en condiciones de campo con bacterias antagonistas y productos comerciales.....	31
Cuadro 4. Comparación de halo de inhibición de <i>R. solanacearum</i> producidos por las bacterias aisladas de la rizósfera.....	41
Cuadro 5. Comparación de halo de inhibición de <i>R. solanacearum</i> producido por las bacterias aisladas del filoplano.....	42
Cuadro 6. Porcentaje de eficiencia de biocontrol y comparaciones de medias de los tratamientos.....	44
Cuadro 7. Porcentaje de mortalidad de plantas por <i>R. solanacearum</i>	45
Cuadro 8. Comparación de respuesta de los tratamientos a variables biométricas en condiciones de umbráculo.....	49
Cuadro 9. Variación porcentual con respecto al testigo de variables biométricas y rendimiento en umbráculo.....	50
Cuadro 10. Variación porcentual con respecto al testigo de variables biométricas y rendimiento en umbráculo en plantas de pimentón con diferentes tratamientos.....	52
Cuadro 11. Tamaño de los halos e índice de solubilización a las 72 horas en medio Pikovskaya	61
Cuadro 12. Actividad PGPB de las cepas bacterianas.....	63
Cuadro 13. Secuencias de las cepas con bases de datos NBCI.....	64
Cuadro 14. Características fisiológicas y bioquímicas de las cepas bacterianas antagonistas a <i>Ralstoniasolanacearum</i>	66

INDICE DE FIGURAS

Figura 1A. Colonia de <i>Ralstoniasolanacearun</i> en medio de cultivo TZC.....	38
Figura 1B. Colonia de <i>Ralstoniasolanacearum</i> en medio de cultivo Agar nutritivo...	38
Figura 2 . Prueba de patogenicidad de <i>R. solanacearum</i>	39
Figura 3. Flujo bacteriano.....	39
Figura 4. Colonias aisladas del rizosfera y filoplano de plantas de pimentón.....	39
Figura 5. Efecto de antibiosis <i>in vitro</i> de la cepa R1 sobre <i>R. solanacearum</i>	40
Figura 6. Crecimiento de las cepas R23 y R7 sobre <i>R. solanacearum</i>	41
Figura 7. Efecto del rendimiento de los tratamientos sobre plantas de pimentón en campo.....	53
Figura 8. Producción de quitinasas, testigo positivo <i>Serratiamarcesens</i>	56
Figura 9.. Halos de hidrolisis formados por la producción de quitinasas.....	57
Figura 10. Producción de HCN.....	59
Figura 11A. Halos de solubilizacion de fosfato.....	60
Figura 11B. Halos de solubilización de fosfato.....	60
Figura 12. Producción de sideroforos.....	62
Figura 13. Amplificación del gen ADNr 16S de las bacterias antagónicas.....	64

INTRODUCCION

El pimentón (*Capsicum annuum*) pertenece a la familia Solanaceae, es originario de América tropical, específicamente entre México, Perú y Bolivia. El género (*Capsicum*) está ampliamente distribuido en todos los continentes, teniendo un gran margen adaptativo, inclusive siendo superior al de otras hortalizas como el tomate (*Solanum lycopersicum* Mill) y la berenjena (*Solanum melongera* L) (Nuez *et al.*, 2010).

Es una hortaliza de consumo mundial, estando presente en la cocina de la mayoría de los países en el mundo, a grandes rasgos su uso culinario es bien conocido como condimento, especia y colorante entre otros. Sin embargo, la importancia de este cultivo radica en que constituye una importante fuente nutricional y generadora de empleo, ya que requiere grandes cantidades de mano de obra para su manejo y cosecha (Bosland *et al.*, 2000).

En Venezuela se encuentra entre las cuatro hortalizas más consumidas por año, su popularidad aumenta constantemente debido a su valor alimenticio y mano de obra requerida dentro del proceso de producción, comercialización e industrialización. Una de las principales limitantes en la producción de este cultivo es la Marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*, patógeno de amplia distribución en zonas tropicales y templadas y, actualmente catalogada como la segunda bacteria fitopatógena más destructiva a nivel mundial. (Mansfield *et al.*, 2012)

Esta bacteria presenta gran variabilidad genética y es capaz de sobrevivir en el suelo por varios años, asociada a los restos de cultivo y a la rizosfera de plantas. Por presentar una fase saprofita en su ciclo de vida, la bacteria aumenta sus posibilidades de supervivencia en el suelo, incluso en ausencia de plantas hospedantes (Hayward, 1991).

La amplia gama de hospedantes, su distribución y alta variabilidad, hacen difícil el manejo de esta enfermedad. Las prácticas culturales adecuadas, rotación de cultivos, control biológico y el uso de hospedantes resistentes pueden brindar un mejor control de la misma (Barbosa *et al.*, 2011).

Una demanda creciente y un constante aumento de la población mundial exigen que la producción de alimentos por unidad de superficie cultivada de tierra aumente drásticamente, preferentemente con un mínimo de impacto sobre los ecosistemas naturales. Una forma de lograr un mayor rendimiento sería la reducción de las pérdidas de cultivos causadas por patógenos y plagas, que equivale a un estimado de 25 a 40% de la producción total. Con este fin deben implementarse estrategias sostenibles y respetuosas del medio ambiente para la protección de cultivos (Sobhy *et al.*, 2014)

Los microorganismos antagónicos usualmente provienen de la microflora autóctona o del entorno mismo del ser afectado, lo que permite que no existan desequilibrios dinámicos en la naturaleza al emplearlo. Esto último es el principal atributo en el empleo de biocontroles, ya que no sugiere ninguna modificación artificial, tal como los residuos de los químicos, ni probable alteración a las características naturales del organismo tratado (Guerrero, 2004).

El control biológico con el uso de bacterias promotoras del crecimiento es una alternativa para el manejo de patógenos habitantes del suelo, considerados de difícil control (Thanh, *et al.*, 2009). Las rizobacterias son conocidas por promover el crecimiento de plantas, así como la disminución de la cantidad de enfermedades (Van Loon *et al.*, 1998; Whipps, 2001). El control de enfermedades por la colonización de las raíces de las plantas realizados por bacterias antagonistas puede ocurrir directamente, por medio de competencia, espacio, nutrientes y nicho ecológico, por la producción de sustancias antimicrobianas o indirectamente, por medio de la inducción de resistencia sistémica (ISR) (Haas y Defago, 2005).

Tomando como referencia, el hecho que la Marchitez bacteriana es una limitante en la producción de hortalizas a nivel nacional, se realizó esta investigación, con el objeto de evaluar el efecto de cepas antagonistas aisladas de plantas de Pimentón y tres productos comerciales para el control *in vitro* e *in vivo* del patógeno, de igual manera evaluar el efecto de estas bacterias como promotoras de crecimiento, con el fin de contribuir en un futuro programa para el manejo fitosanitario de *Ralstonia solanacearum*

OBJETIVOS

GENERAL

Determinar el efecto de bacterias antagonistas y bioestimulantes comerciales sobre el control de *Ralstonia solanacearum* en plantas de pimentón (*Capsicum annuum* L)

ESPECIFICOS

1. Evaluar *in vitro* la capacidad antagonista a *Ralstonia solanacearum* de bacterias aisladas de la rizosfera y filoplano en plantas de pimentón.
2. Identificar mediante pruebas fisiológicas, bioquímicas y moleculares las bacterias antagonistas más promisoras *in vitro*.
3. Evaluar en condiciones de umbráculo la capacidad biocontroladora de las bacterias más promisoras *in vitro* y de bioestimulantes comerciales a *Ralstonia solanacearum*.
4. Determinar en umbráculo el efecto de las bacterias antagonistas más promisoras *in vitro* en el control de *Ralstonia solanacearum* sobre algunas variables biométricas en plantas de pimentón.
5. Evaluar en campo el efecto de productos comerciales y bacterias antagonistas, sobre variables biométricas en plantas de pimentón.
6. Identificar algunos de los mecanismos de biocontrol realizado por las bacterias antagonistas más promisoras en *in vitro*.

Marco teórico

Generalidades sobre el Pimentón (*Capsicum annuum* L.)

Las hortalizas tienen una función importante en la dieta del pueblo venezolano, por lo que son consideradas dentro del grupo de alimentos de consumo diario. Su cultivo es esencial debido al alto valor alimenticio que poseen, además de los ingresos económicos que generan por unidad de superficie. Entre las hortalizas de mayor consumo se encuentra el Pimentón (Montaño y Simoza, 2002). Este cultivo es miembro de las solanáceas una familia que incluye al tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), papa (*Solanum tuberosum* L.), y el tabaco (*Nicotiana Tabacum* L.); en general su uso culinario es bien conocido como condimento, especia, colorante y hortaliza. (Bosland *et al.*, 2000).

Clasificación taxonómica del Pimentón

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Capsicum*

La taxonomía dentro del género *Capsicum* es compleja debido a la gran variabilidad de formas existentes en las especies cultivadas y a la diversidad de criterios utilizados en la clasificación (Nuez *et al.*, 1996). El número total de especies que componen el género no está bien definido, probablemente entre 25 y 27. Sin embargo, existe un consenso sobre la existencia de cinco especies domesticadas: *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* y *C. pubescens*. (Vallejo *et al.*, 2004). La mayoría de las especies cultivadas del género *Capsicum* son originarias de América tropical encontrando formas silvestres a lo largo del macizo andino, desde México hasta el norte de Chile y noreste de la Argentina (Vallejo y Estrada, 2004).

La planta es de aspecto lampiño, tallos erguidos y crecimiento limitado, con altura y forma de desarrollo muy variables en función del cultivar y de las condiciones del

cultivo. Las hojas enteras, con un peciolo largo o bien casi sésil, tienen una forma lanceolada y ovalada, con el borde entero o ligeramente sinuado en la base. Las flores suelen nacer solitarias en cada nudo, con el pedúnculo torcido hacia abajo en la antesis. El cáliz, de una sola pieza, está formado por sépalos verdes que persisten y se endurecen hasta madurar el fruto. La corola es usualmente blanca lechosa, con la base de los pétalos formando un tubo muy corto. El fruto es una baya hueca con la superficie lisa y brillante, de color amarillo, anaranjado, verde o rojo y forma muy variable característica del cultivar. En el interior de la baya discurren 2 o 4 tabiques incompletos a lo largo de la pared del fruto, uniéndose solo en la base sobre la placenta, en esta región se insertan las semillas, aplastadas normalmente de 4 a 5 mm de color blanco amarillento (Nuez *et al.*, 2003).

Son una fuente rica de Vitamina A, la cual no se encuentra por sí en el fruto. El pimentón contiene provitaminas alpha, beta, gamma, carotenoides y criptoxanthinas las cuales pueden ser transformadas en Vitamina A, estos elementos le atribuyen propiedades anticancerígenas. También contiene una de las cantidades más ricas de vitamina C entre otros vegetales pudiendo contener seis veces más que una naranja (Bosland y Votava, 2000).

Los frutos contienen glucosa (90-98 %) y sacarosa. Un alto porcentaje (20-24 %) de materia seca correspondiente a fibra. Además, se encuentran ácidos volátiles, lípidos, aminoácidos, proteínas, ácidos orgánicos y sustancias minerales. (Vallejo *et al.*, 2004).

Su ciclo de cultivo es anual, la planta es de porte variable entre los 0,5 metros (en variedades de cultivo al aire libre) y más de 2 metros (gran parte de los híbridos cultivados en invernaderos); los requerimientos edafoclimáticos óptimos para su desarrollo son de 21 -24 °C, 50 -70 % HR, suelos franco –arenosos, pH entre 6,5 y 7 (Nuez *et al.*, 2010).

En Venezuela la producción de pimentón está localizada mayormente en la región Centro-occidental, donde los estados Lara, Falcón y Yaracuy aportan el 60% de la producción nacional. El 40% restante se localiza en Aragua, Carabobo, Guárico, Trujillo y la región nororiental del país (Montaño y Simoza, 2002)

Algunos de los cultivares mayormente utilizados en nuestro País son “Cacique” “Magistral” “Anaconda” y “Acero”

Principales enfermedades que afectan al pimentón en Venezuela.

Un variado grupo de patógenos se han reportado en el cultivo de Pimentón, entre ellos *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora* sp., *Fusarium oxysporum* y bacterias como *Ralstonia solanacearum*, y *Xanthomonas* spp.,(Pernezny *et al.*,2003) las cuales han mostrado un repunte en los últimos años especialmente en la zonas de Aragua y Carabobo.

Ralstonia solanacearum

Se caracteriza por ser una bacteria cosmopolita, extremadamente variable, adaptada a gran número de plantas, sobre las más variadas condiciones edafoclimáticas, principalmente en las regiones tropicales y sub-tropicales del mundo afectando a cientos de especies de plantas en 54 familias. La bacteria es responsable de considerables pérdidas en muchos cultivos hortícolas específicamente en solanáceas como la papa, tomate y pimentón donde deja inutilizadas grandes extensiones al ser un agente contaminante del suelo. (Rodríguez, 2007). Debido al impacto económico causado por este patógeno ha sido uno de los primeros en secuenciarse su genoma (Salanoubat *et al.*, 2002), actualmente está situada en el segundo lugar entre las diez especies bacterianas fitopatógenas más destructivas a nivel mundial. **b** Mansfield *et al.*, 2012

A nivel infra-subespecífico *R. solanacearum*, ha sido clasificado de acuerdo al rango de hospedante, distribución geográfica, patogenicidad, relaciones epidemiológicas y propiedades fisiológicas; los conceptos de raza y biovar, son los más utilizados con fines de clasificación (Hayward, 1991). Así, a través del tiempo fueron descritas 5 razas basadas primariamente en la gama de hospedante : La raza 1 afecta principalmente a las solanáceas como papa, tomate, tabaco, también otros cultivos como bananos diploides (*Musa paradisiaca*) amañí (*Arachis hypogaea* L.) entre otras, la raza 2 ataca bananos triploides (enfermedad del Moko) y otras especies del género *Musa* y *Heliconia*, mientras que la raza 3 afecta tomate y papa particularmente en ambientes fríos, pero no es altamente virulenta en otros cultivos de solanáceas, la raza 4 afecta al jengibre (*Zingiber officinale*) y la raza 5 a la mora (*Rubus ulmifolius*) (Arauz, 1998; Hayward, 1983; Buddenhagen *et al.*, 1962). Cinco biovars (I, II, III, IV y V) diferenciados

basándose en su habilidad para producir ácidos a partir de tres disacáridos (celobiosa, maltosa, lactosa) y la oxidación de tres alcoholes hexosa (dulcitol, manitol y sorbitol) (Goto, 1990).

R. solanacearum es una bacteria Gram-negativa, no fluorescente, las colonias pueden producir un pigmento castaño a marrón en medios de cultivo complejos (Denny y Hayward, 2001). No hidroliza gelatina o lo hace muy débilmente, ni almidón, reduce nitratos, produce gas, oxida glucosa, no crece a 4° C o a más de 40° C, no crece a pH 4 o 9. Es oxidasa y catalasa positiva, es un bacilo móvil de 0,5-0,7 µm x 1,5-2,5 µm con flagelo polar (uno o cuatros cuando se presentan), aeróbicos estrictos (EPPO, 2004).

Epidemiología y ciclo de vida

Para que la bacteria cause enfermedad primero debe penetrar en el hospedante. La mayoría de las cepas de *R. solanacearum* ingresan en la planta a través de heridas. (Denny, 2006). Esta bacteria puede encontrarse en plantas enfermas o en restos de cosecha, órganos de propagación vegetativa, sobre plantas hospederas silvestres y en el suelo (Agrios, 2005). La bacteria se dispersa principalmente a través del suelo, sobreviviendo en este medio por largos periodos de tiempo. Además, es posible su diseminación por medio del agua, equipo, materiales infectados y trasplante (Aphis y PPQ, 2004)

Altas poblaciones del patógeno en la superficie del suelo, pueden infectar plantas después de una lluvia o durante la misma. La evidencia más directa de una fase epifítica y la transmisión aérea es mediante la salpicadura del agua de lluvia considerándose entonces una importante fuente de propagación (Hayward, 1991).

La supervivencia de la bacteria es afectada por la temperatura, humedad y otros factores físicos y químicos del suelo, siendo más favorables las temperaturas altas de 28°C a 35°C. (Coutinho, 2005). En climas fríos (menos de 18°C), y en altitudes superiores a 2,500 msnm, la bacteria crece muy lentamente y convive con el cultivo, en infección latente, sin ocasionar daños aparentes ni síntomas visibles. Otros factores del suelo que afectan la capacidad del patógeno de causar enfermedad incluyen la profundidad, materia orgánica, los desechos de la planta hospedante y el tipo de suelo. (Denny, 2006).

La supervivencia es uno de los principales obstáculos que enfrenta un patógeno en el ciclo de la enfermedad. *R. solanacearum* es capaz de sobrevivir en el suelo en ausencia de plantas hospedante por varios años. (McCarter, 1991). Se ha reportado que la bacteria puede sobrevivir en agua pura a 20-25 ° C por más de 40 años (Denny, 2006). En países de Europa la bacteria puede pasar el invierno en el agua de riego en estrecha asociación con hospedantes de malezas acuáticas asintomáticas, contribuyendo así a la propagación del patógeno en todas las vías fluviales (Elphinstone *et al.*, 1998; Janse *et al.*, 1997)

Una vez introducido, el patógeno sobrevive a profundidades de 1 m o más, donde la competencia microbiana es baja. Su persistencia en el suelo se reduce por el frío extremo, y la presencia de microorganismos antagónicos, la supervivencia depende también de la raza involucrada; La raza 1 suele persistir durante muchos años en el suelo debido a la cantidad de plantas hospedantes que afecta, mientras que otras cepas tienden a persistir durante menos años. (Martin & Francés, 1985; Champoiseau *et al.*, 2009)

Sintomatología

En pimentón y tomate las hojas más jóvenes son las primeras que manifiestan síntomas de marchitamiento, normalmente en el momento más caluroso de día. Si las condiciones ambientales son favorables para el patógeno la planta entera se marchita rápidamente. Los tejidos vasculares del tallo muestran una coloración castaña y, al cortar, se observa exudado de color amarillo o blanco (McCarter, 1991). Gotuzzo(1975) reporta que en algunos casos la planta genera raíces adventicias a lo largo del tallo como defensa al déficit hídrico provocado por la obstrucción de los vasos.

Las etapas avanzadas de la enfermedad pueden incluir ocasionalmente maceración de la médula. En campo, el marchitamiento puede observarse en la tarde en las hojas terminales o en un lado de la planta. A la mañana siguiente no hay signos de marchitamiento y la planta parece sana. Dependiendo de la temperatura, humedad y agresividad del patógeno el marchitamiento completo de la planta ocurrirá entre 5 y 14 días después de que se presenten los primeros síntomas. El marchitamiento bacteriano

se puede distinguir de otras enfermedades porque el color de las hojas de plantas afectadas se mantiene verde, mientras otras marchiteces, como la de *Fusarium*, desarrollan un amarillamiento (Hong, 2011).

Se han utilizado varios métodos para detectar el patógeno. Una prueba simple para determinar si una planta está infectada con *R. solanacearum* es la prueba de exudado. La cual se realiza haciendo un corte transversal en el tallo observando el exudado blanquecino en la superficie del corte. Una variante de esto es colocar la superficie cortada del tallo en agua y en pocos minutos las bacterias saldrán a la corriente, resultando en hilos blanquecinos que emanan de la base del tallo (Hong, 2011).

Patogénesis

La marchitez bacteriana es una enfermedad de tipo vascular. Se caracteriza por la invasión primaria a los vasos del tejido xilemático, la cual se propaga invadiendo internamente el tejido vascular produciendo un taponamiento de los conductos, consecuentemente la planta sucumbe ante una falta de hidratación celular, ocasionando de esta forma un marchitamiento vascular y por ende sistémico (Robinson, 2006).

Está descrito que la bacteria es atraída quimiotácticamente (movimiento estimulado por sustancias químicas) hacia sus hospedantes por diversos aminoácidos, ácidos orgánicos y especialmente por exudados de la raíz (Álvarez, 2009) y que la concentración de oxígeno dentro de las células del hospedante también cumple importante función en la localización de la planta por parte del patógeno (Yao, 2007). Posteriormente, la penetración a la planta ocurre, generalmente, por la raíz, a través de heridas o en puntos de emergencia de pelos radicales o raíces laterales (se ha comprobado que también puede penetrar por las hojas a través de los estomas) (Caruso, 2005), (Carmeille *et al.*, 2003)

Una vez en el interior de su hospedante, la bacteria pasa una primera fase en el córtex y posteriormente invade los haces conductores del xilema, donde se multiplica hasta causar el marchitamiento y/o la muerte de la planta. Posteriormente, la bacteria se libera de la planta al suelo, el agua o restos vegetales donde puede sobrevivir hasta encontrar una nueva planta susceptible o reservorio (Álvarez, 2009).

La Severidad de la enfermedad que causa *R. solanacearum* es el resultado de múltiples factores que trabajan en conjunto. La producción de polisacáridos extracelulares (EPS) es importante para el desarrollo de la enfermedad, aunque su mecanismo de acción es incierto. El factor de virulencia más importante es el EPS1, polímero compuesto de N-acetil galactosamina, desoxi-L-ácido galacturónico y trideoxi-Dglucosa. Doce genes están involucrados en su biosíntesis. La oclusión y ruptura de los vasos del xilema debido a la alta presión osmótica es lo que probablemente ocasiona el marchitamiento (Agrios, 2005; Huang *et al.*, 1997; Hugouvieux *et al.*, 1996; Schell *et al.*, 1988).

Otro factor de virulencia son las enzimas extracelulares que degradan las paredes celulares de las plantas y aparentemente facilitan la entrada y diseminación de la bacteria. Las células del xilema, floema, corteza y medula adyacentes se desintegran rápidamente, especialmente en plantas herbáceas suculentas (Husain y Kelman, 1958). Los estudios histológicos de plantas de tomate y tabaco, invadidas por la bacteria, revelan la ruptura de las pectinas de la laminilla media y de las paredes celulares. Esta disociación de los tejidos conductores causa el marchitamiento que caracteriza la enfermedad. Las enzimas PME (Pectín metil esterasa) y PPG (poligalacturonasa) fueron encontradas tanto en tejidos de hospedantes enfermos como en filtrados de cultivos de *R. solanacearum* (Husain y Kelman, 1958). También, Allen *et al.*, (1991) determinaron la endogluconasa (Egl), y tres poligalacturonasas (PGs), que degradan la pectina, principal componente de la pared primaria de las plantas y de la laminilla media.

Para invadir a sus hospedantes *R. solanacearum* utiliza el sistema de secreción tipo III (SST3), esta máquina especializada es codificada por un grupo de unos 20 genes de respuesta de hipersensibilidad y patogenicidad, pueden inyectar proteínas efectoras directamente en las células hospedantes suprimiendo la respuesta inmune de la planta o activando efectores que disparan la inmunidad (Cunnac *et al.*, 2004, Jones y Dangl, 2006).

Dado que el ensamblaje del SST3 y la secreción de las proteínas del efector requieren mucha energía, los patógenos a menudo no expresan la SST3 hasta que entran en contacto con los tejidos del hospedante. Los genes SST3 en *R. solanacearum* son inducidos específicamente en respuesta al contacto célula bacteriana-planta (Aldon *et al.*, 2000).

Estudios recientes también mostraron que el regulador SST3 *hrpB* y algunos genes regulados por *hrpB* son inducidos en el crecimiento de bacterias dentro de las plantas infectadas (Jacobs *et al.*, 2012; Monteiro *et al.*, 2012). Por otro lado, la expresión de

genes asociados SST3 está regulado por una variedad de factores ambientales (por ejemplo, pH, fase de crecimiento, temperatura, nutrición; o densidad celular) de diferentes maneras en diferentes bacterias (Arlat *et al.*, 1992, Wei *et al.*, 1992, Van Dijk *et al.*, 1999, Tang *et al.*, 2006; Stauber *et al.*, 2012).

Medidas de control

El control de *R. solanacearum* es difícil debido a que es un patógeno que habita principalmente en el suelo, tiene un amplio rango de hospedantes, larga sobrevivencia en el suelo, y amplia variación biológica (Martin y French, 1985). No se ha encontrado un método de control que sea 100% eficaz, aunque en lugares donde se ha establecido el patógeno, se ha observado algún nivel de control mediante el uso de una combinación de diversos métodos (EPPO, 2004; Champoiseau *et al.*, 2010). Estos métodos incluyen prácticas culturales, control químico, control biológico y resistencia (Martin y French, 1985, Champoiseau *et al.*, 2010).

Con prácticas como la preparación del suelo se intenta limitar la introducción o reducir la población del patógeno. En los campos infestados, deben elegirse cultivares resistentes o moderadamente resistentes. Los cultivares moderadamente resistentes proporcionan el mejor método para el control; en cultivos como el tomate están comercialmente disponibles; Sin embargo, tienden a ser limitados en uso a ciertas regiones geográficas (McCarter, 1991).

También se recomienda añadir enmiendas al suelo con productos como timol, amonio entre otros (Saddler, 2005, Ji *et al.*, 2007, Santos *et al.*, 2006). Uno de los métodos más simples para evitar la enfermedad es plantar en condiciones más frescas y / o secas que serían menos favorables para el desarrollo de la enfermedad Denny *et al.*, 2006.

El uso de plantas no hospedantes para la rotación ha ayudado a reducir la incidencia de marchitez bacteriana en el campo. Estos cultivos no-hospedantes incluyen sorgo y maíz (Denny, 2006). La alta humedad del suelo puede aumentar la población de la bacteria, por lo que se sugiere plantar en campos bien drenados. La contaminación puede reducirse mediante la aplicación de prácticas estrictas de saneamiento, tales como agua de riego, trasplantes, maquinaria y estacas libres del patógeno. El riego excesivo

aumentará la población de patógenos; Por lo tanto el riego debe ser minimizado y basado en los requerimientos de agua (Wang y Lin, 2005).

Otras estrategias como el control biológico pueden ayudar al desarrollo de medidas alternativas de manejo. Las investigaciones en los últimos años sobre métodos de control de la marchitez bacteriana han estado dirigidas principalmente hacia la evaluación de microorganismos antagonistas aplicados a la semilla o a las raíces de las plantas antes de la siembra (Díaz *et al.*, 1999).

El control biológico ha ganado importancia recientemente ya que disminuye la aplicación de agroquímicos evitando el deterioro de los suelos y la acumulación de residuos químicos en el ambiente. Esta estrategia es la utilización intencionada de organismos vivos para reducir las actividades y las poblaciones de uno o más patógenos de plantas (Ceballos, 2009).

Los microorganismos antagonistas (bacterias, levaduras y hongos) tienen la capacidad de ejercer un efecto de control biológico sobre diferentes patógenos de interés y se han empleado para controlar diversas enfermedades en plantas. En los últimos años, el control biológico ha sido objeto de estudio demostrando ser efectivo en el control de enfermedades (Álvarez, 2012).

Los microorganismos antagónicos usualmente provienen de la microflora autóctona o del entorno mismo del hospedante, lo que permite que no existan desequilibrios dinámicos en la naturaleza al emplearlo. Esto último es el principal atributo en el uso de biocontroladores, ya que no sugiere ninguna modificación artificial, tal como los residuos de los productos químicos, ni probable alteración a las características naturales del organismo tratado (Guerrero, 2004). Para seleccionar a los microorganismos antagonistas se deben considerar las siguientes características generales (Díaz y Pons de Labrador, 1974):

- Efectivos a bajas concentraciones.
- Fáciles de reproducir en medios de cultivo económicos.
- Efectivos para controlar un amplio rango de patógenos.
- Preparados para ser distribuidos en una forma fácil.

- No tóxicos para los seres humanos.
- Resistentes a los pesticidas.
- Compatible con otros tratamientos (químicos y físicos).
- No patogénico para las plantas.
- Activos contra el patógeno de múltiples formas.

Bacterias promotoras de crecimiento.

Kloeppler & Schroth (1978) introdujeron el término de rizobacterias, definiéndolas como la comunidad bacteriana que coloniza competitivamente las raíces de la plantas, estimulan su crecimiento y reducen la incidencia de enfermedades. Posteriormente 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) (Jha *et al.*, 2012)

Las PGPR son bacterias que habitan la rizósfera, región que fue descrita por Hiltner en 1904 como el área del suelo influenciada por los exudados de la raíz, la rizósfera incluye el área unida a la raíz que se extiende a pocos milímetros de la superficie del sistema radicular, ésta se caracteriza por albergar una gran variedad de microorganismos en comparación con el resto del suelo (Do Carmo *et al.*, 2011). Los exudados rizosféricos incluyen aminoácidos, ácidos grasos, nucleótidos, ácidos orgánicos, fenoles, reguladores de crecimiento, esteroides, azúcares y vitaminas (Albareda *et al.*, 2006). Las rizobacterias compiten por estos metabolitos y por el sitio que ocupan sobre la raíz de la planta; siendo las uniones entre las células epidérmicas y el área donde emerge la raíz los sitios más poblados (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

Por otra parte, Bashan y Holguin (1998) propusieron que el término PGPR debería actualizarse, ya que muchas de las bacterias que ejercen efectos beneficiosos en las plantas pueden desarrollarse fuera del sistema rizosférico, y por lo tanto este término es restrictivo. Dada la enorme expansión en el estudio de estas bacterias, actualmente se propone la separación en dos grupos: las PGPB o Bacterias Promotoras del Crecimiento de las Plantas que afectan estrictamente el crecimiento vegetal, y las “biocontrol-PGPB”, cuando se refiere a bacterias que controlan fitopatógenos, ya sea produciendo sustancias inhibitorias o incrementando la resistencia natural de la planta. Los primeros

estudios sobre PGPR se centraron más en el control biológico de enfermedades de las plantas que en la promoción del crecimiento, (Kloepper *et al.*, 1989).

El número de especies de bacterias identificadas como PGPR ha aumentado recientemente como consecuencia de los numerosos estudios que abarcan una gama más amplia de especies de plantas y debido a los avances en la taxonomía bacteriana y en el progreso en la comprensión de los diferentes mecanismos de acción de las PGPR. Dentro de las PGPR encontramos bacterias pertenecientes a un gran número de géneros bacterianos como *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* y *Bacillus* (Kloepper *et al.*, 1989).

En general, las PGPR promueven el crecimiento de las plantas directamente ya sea facilitando la adquisición de nutrientes (nitrógeno, fósforo y minerales esenciales), modulando los niveles hormonales de las plantas, o indirectamente disminuyendo los efectos inhibidores de diversos patógenos sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas en forma de agentes de biocontrol (Glick, 2012).

Las PGPR emplean una amplia variedad de mecanismos moleculares para mejorar el crecimiento, producción y la condición fitosanitaria de las plantas, (Malik & Sindhu, 2011). Las sustancias que promueven el crecimiento vegetal pueden influir directa o indirectamente sobre el metabolismo y fisiología de la planta (Saleem *et al.*, 2007). Los mecanismos directos son aquellos en los cuales, los microorganismos actúan sobre la planta, uno de ellos es la producción de promotores de crecimiento vegetal (también llamados fitohormonas), como auxinas, giberelinas y citoquininas. La producción de estos metabolitos también genera una mejor regulación de estomas, lo que evita su deterioro el cual está asociado a depresión del crecimiento y síntomas de marchitamiento en la planta. Promueven un desarrollo radical más ramificado jugando un papel fundamental en la absorción del agua y en el mejoramiento de la nutrición al aumentar su acceso a los nutrientes en el suelo (Rivieros, 2008). Adicionalmente, pueden promover el crecimiento vegetal mejorando la disponibilidad de nutrientes en el suelo mediante solubilización de fósforo, fijación de nitrógenos y producción de sideróforos (Bobadilla y Rincón, 2008). Igualmente se ha demostrado que pueden disminuir la resistencia a la conductividad hidráulica, lo cual le da a las plantas una mayor tolerancia a periodos de sequía (Rivieros, 2008).

Los mecanismos indirectos son aquellos con los cuales los microorganismos afectan el crecimiento de fitopatógenos, permitiendo un mejor desarrollo de las plantas hospedantes (Van Loon, 2007), pueden eliminar a los fitopatógenos a través de la producción de sustancias inhibitorias como enzimas líticas, antibióticos, sideróforos o bacteriocinas, este mecanismo es conocido como biocontrol (Do Carmo, 2011). También contrarrestan a los patógenos a través del incremento de la respuesta de defensa de las plantas, a través de la estimulación de la resistencia sistémica inducida (ISR por sus siglas en inglés: Induced Systemic Resistance) (Van Loon, 2007).

MECANISMOS IMPLICADOS EN LA ACTIVIDAD PGPR

Fitoestimulación.

Las fitohormonas son moléculas orgánicas que regulan la expresión de genes implicados en el crecimiento y desarrollo vegetal, estos compuestos son sintetizados en diferentes estructuras de la planta y su acción varía en función de los cambios ambientales que modifican la expresión génica del organismo (Aguilar-Piedras *et al.*, 2008).

Las fitohormonas son mensajeros químicos que influyen en la capacidad de las plantas para responder a su entorno, influyen en los procesos fisiológicos de las plantas y en el crecimiento por alteración del balance hormonal (Asghar *et al.*, 2004, Kang *et al.*, 2006). Son compuestos orgánicos generalmente eficaces a concentraciones muy bajas. Los botánicos reconocen cinco grupos principales de hormonas vegetales: (i) Auxinas (ii) giberelinas, (iii) etileno, (iv) citoquininas, y (v) ácido abscísico. Sólo los primeros cuatro están involucrados en la fitostimulación por rizobacterias. Actúan mejorando el crecimiento de las plantas debido a su efecto positivo sobre la división y crecimiento celular, germinación de las semillas, formación de la raíz y elongación del tallo (Taiz y Zeiger 2000; Khalid *et al.*, 2006).

Biofertilización

Hasta ahora el manejo nutricional tradicional para mantener una productividad alta en los cultivos ha sido principalmente mediante el uso de fertilizantes; sin embargo en las

últimas décadas los rendimientos no han aumentado proporcionalmente con el aumento de la fertilización, lo que resulta en una poca eficiencia en el uso de productos sintéticos y aumento del riesgo de daños ambientales (Zhang *et al.* 2010).

El potencial de las PGPR para aumentar el crecimiento de las plantas y su participación en los ciclos de carbono, Nitrógeno, azufre y fósforo aumentan su eficacia en agricultura sostenible. La aplicación de PGPR para incrementar la disponibilidad de nutrientes para las plantas es una práctica importante y necesaria (Freitas *et al.*, 2007) y es muy útil para aumentar la concentración de nutrientes de ciertos elementos esenciales como N,P, K, Ca, Mg, Zn, Fe y Mn (Dursun *et al.*, 2010)

Biofijacion de nitrógeno

El nitrógeno es el principal nutriente limitante para el crecimiento de las plantas (Munees y Mulugeta, 2014, Chapin y Aerts, 2000). Es un componente esencial de los nucleótidos, lípidos de membrana y aminoácidos (proteínas enzimáticas y estructurales) (Marschner, 1995). La mayor parte de este elemento está en forma gaseosa (N₂) inaccesible a animales y plantas (Pujic y Normand, 2009). La fijación biológica del nitrógeno atmosférico es una actividad microbiana importante para el mantenimiento de la vida en la tierra a través de la fotosíntesis realizada por organismos fotosintéticos. Alrededor de 175 millones de toneladas de nitrógeno atmosférico se reintroducen anualmente en el ciclo de vida a través de la fijación biológica. Este tipo de fijación del nitrógeno se limita a los procariotas que poseen (a diferencia de la planta) un complejo enzimático (la dinitrogenasa) que cataliza la reducción del nitrógeno atmosférico en amoníaco (Weiens *et al.*, 2010) Las bacterias fijadoras de nitrógeno incluyen tanto procariotas rizosféricas libres (por ejemplo *Achromobacter*, *Acetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Azomonas*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Dexia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas* y *Xanthobacter*) (Tilak *et al.*, 2005) y procariotas simbióticas rizosféricas que fijan el nitrógeno sólo en asociación con ciertas plantas. Este último grupo comprende rizobios (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Allorhizobium*) asociados a plantas leguminosas y cepas Frankia, bacterias filamentosas esporuladas asociadas con plantas actinorricas (Gray y Smith, 2005) Los miembros de este grupo forman nódulos en las

raíces de plantas leguminosas como: soya (*Glycine max*), chícharo (*Pisum sativum*), mani y alfalfa (*Medicago sativa*). El amonio generado por estas bacterias puede ser usado por las plantas hospedantes como fuente de nitrógeno, dando a cambio la fuente de carbono requerida por las bacterias (Fernández *et al.*, 2010)

En condiciones normales, los microorganismos fijadores se benefician del nitrógeno sin excreción de compuestos nitrogenados. Pero a su muerte y después de la descomposición, el nitrógeno está disponible para las plantas proporcionando un promedio de 25 kg Nha por año. En la mayoría de los ecosistemas y a través de este proceso, los microorganismos fijadores participan en la acumulación de compuestos nitrogenados con el tiempo (Vitousek *et al.*, 2002). Este proceso es entonces suficiente para mantener el stock de compuestos nitrogenados en el ecosistema y restaurar las pérdidas.

Solubilización de fosfatos.

El fósforo después del nitrógeno es el segundo elemento mineral en el que la deficiencia limita crucialmente el crecimiento de la planta (Nisha *et al.*, 2014). Representa aproximadamente el 0,2% del peso seco de la planta y es un componente esencial de los ácidos nucleicos, fitina y fosfolípidos. Desempeña un papel importante en la fotosíntesis, la respiración, el almacenamiento, transferencia de energía, división celular y la elongación (Sagervanshi *et al.*, 2012). Es esencial para la formación de semillas que contiene el mayor contenido de fósforo de la planta, la cual lo absorbe en formas mono y dibásicas (H_2PO_4), $(HPO_4)_2$ (Keneni *et al.*, 2010; Ramos Solano *et al.*, 2008). Desafortunadamente, la gran proporción de fósforo del suelo (aproximadamente 95-99%) está en forma de fosfatos inorgánicos u orgánicos insolubles, fosfatos de inositol, fosfomonoésteres y fosfotriésteres) no asimilables por la planta (Pérez-Montano *et al.* 2014, Khan *et al.*, 2007). El fósforo (altamente reactivo) se inmoviliza por precipitación con cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} en suelos alcalinos y con Fe_3+ y Al_3+ en suelos ácidos (Hesham y ElKomy, 2005). Por lo tanto, cuando se aplica a un suelo agrícola, gran proporción del fosfato inorgánico soluble, se inmoviliza rápidamente no estando disponible para la planta (Vikram y Hamzehzarghani, 2008).

Algunas PGPR poseen la capacidad de solubilizar el fosfato insoluble en el suelo con el fin de ponerlo a disposición de la planta. Estas PGPR son referidas por el acrónimo en inglés "Phosphate Solubilizing Bacteria, PSB". El grupo PSB contiene a los géneros

Pseudomonas, Azospirillum, Bacillus, Rhizobium, Burkholderia, Arthrobacter, Alcaligenes, Serratia, Enterobacter, Acinetobacter, Azotobacter, Flavobacterium y Erwinia (Zaidi et al., 2009).

Las PSB producen el efecto solubilizante mediante la producción de ácidos orgánicos tales como ácido fórmico, propiónico, láctico, glicólico, fumárico, succínico (Vazquez et al., 2000), glucónico, 2-cetoglucónico, oxálico, cítrico, acético y málico (Zaidi et al., 2009). Estos ácidos reducen el pH del suelo y provocan la disolución del fosfato insoluble. Las bacterias solubilizadoras de fosfatos también son capaces de mineralizar el fosfato orgánico insoluble a través de la excreción de enzimas extracelulares tales como fosfatasas (catalizadores de la hidrólisis de ésteres fosfóricos), fitasas y liasas C-P (Weyens *et al.*, 2010). Cabe señalar que estos dos mecanismos (solubilización y mineralización) pueden coexistir dentro de la misma PBS (Tao *et al.*, 2008)

Quelación del hierro (Producción de sideróforos)

El hierro es esencial para toda forma de vida, está involucrado en funciones biológicas diversas y esenciales. Es el cofactor de muchas enzimas involucradas en la transferencia de electrones (respiración mitocondrial) o transferencia de oxígeno (hemoglobina), y en la desactivación del oxígeno radical (catalasas, peroxidasas) (Ganz, 2003). Es el cuarto elemento más abundante en la roca molida. No obstante esta cantidad de hierro está en la forma de iones férricos (Fe^{3+}) muy poco asimilada por los organismos vivos (bacterias, plantas, etc.) (Ammari y Mengel, 2006). Para superar esta dificultad y proporcionar hierro a la planta, las rizobacterias han desarrollado diversas estrategias de captación de hierro para sobrevivir y adaptarse a su medio ambiente. Una de estas estrategias es la producción de sideróforos.

El mecanismo de acción de los sideróforos inicia con la formación de un complejo sideróforo- Fe^{3+} , unido posteriormente a receptores de membrana dependientes de la limitación por hierro (Vacheron *et al.*, 2013), posteriormente el hierro es interiorizado y reducido en el citoplasma bacteriano al ión activo Fe^{2+} (Beneduzi et al., 2012).

Los sideróforos son producidos por una amplia variedad de microorganismos (bacterias y hongos) y algunas plantas (fito-sideróforos de gramíneas) (Van der Helm y

Winkelmann, 1994). *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y muchos hongos son capaces de producir estos compuestos quelantes de hierro (Zahir *et al.*, 2004). De acuerdo con la función química implicada en la quelación del hierro, los sideróforos se clasifican en tres clases: fenol / catecol, hidroxamato e hidroxicarboxílico. Hoy en día, se conocen más de 500 sideróforos y se determinaron las estructuras químicas de 270 de ellos (Hider y Kong, 2010). Varios estudios han demostrado los efectos beneficiosos de los sideróforos bacterianos sobre la mejora del crecimiento de las plantas, también están implicados en la quelación de otros metales de rizosfera con baja disponibilidad a las plantas como el zinc y el plomo (Dimkpa *et al.*, 2009).

Las PGPR con capacidad de producir sideróforos adquieren ventajas competitivas en la colonización de la raíz, competencia por el nicho ecológico e inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos por la baja concentración de Fe³⁺ disponible (Sunar *et al.*, 2013).

Ácido indolacético

El ácido indolacético (AIA) incluye a las hormonas vegetales pertenecientes al grupo de auxinas, que son moléculas señal involucradas en la regulación del desarrollo de las plantas, específicamente en la organogénesis, división celular, diferenciación celular y regulación de genes (Ryu y Patten, 2008). La estimulación del crecimiento de las plantas por las rizobacterias se asocia a menudo con su capacidad para producir AIA (Patten y Glick, 2002). La producción microbiana de AIA hace varias vías metabólicas (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003). Aunque algunas vías independientes del triptófano se han identificado en algunos microorganismos, el triptófano sigue siendo el más común y principal precursor de la biosíntesis del AIA. Las cuatro principales vías metabólicas dependientes del triptófano son: tryptophol, triptamina, ácido indol-3-pirúvico y vía indol-3-acetamida (Bartel, 1997). Varios estudios han demostrado que algunos microorganismos producen baja cantidad de auxinas en ausencia de L-triptófano, se convierten en fuertes productores de auxinas en presencia de él (Zahir *et al.*, 2004).

En bacterias, la producción de AIA ocurre a partir del triptófano por medio de la indol-acetamida que se encuentra implicada en la generación de tumores en la planta; existe

una ruta alternativa tomada por otras bacterias que involucra la utilización del ácido 3 indol pirúvico como intermediario (Fett *et al.*, 1987; Patten y Glick, 2002)

Controladores de estrés

Etileno

Algunas enzimas de las PGPR facilitan el crecimiento y desarrollo de las plantas mediante la disminución de los niveles de etileno. Tales bacterias ocupan la ACC - desaminasa, precursor del etileno y lo convierte en 2-oxobutanoato y NH₃.

Generalmente, el etileno es un metabolito esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Khalid *et al.*, 2006). Esta hormona es producida endógenamente en la mayoría de las plantas, y por diferentes procesos bióticos y abióticos en suelos; es importante para inducir múltiples cambios fisiológicos (Saleem *et al.*, 200). Bajo condiciones de estrés generado por factores como salinidad, sequía, metales pesados y patógenos, los niveles endógenos de etileno aumentan significativamente afectando negativamente al crecimiento en general de la planta. Altas concentraciones de etileno inducen defoliación y otros procesos celulares que pueden reducir el rendimiento de los cultivos (Saleem *et al.*, 2007; Bhattacharyya y Jha, 2012).

La degradación del ACC crea un gradiente de concentración entre el interior y exterior de la planta, favoreciendo su exudación y, por lo tanto, una reducción del nivel interno de etileno. Esto, en combinación con las auxinas que se pueden producir por el mismo microorganismo, genera un efecto considerable en importantes procesos fisiológicos como el desarrollo de sistemas radiculares (Glick *et al.*, 1994).

Producción de Ácido cianhídrico (HCN)

La cianogénesis bacteriana se considera como parte de la capacidad de biocontrol de tipos de cepas bacterianas que suprimen las enfermedades ocasionadas por patógenos en plantas de importancia económica (Blumer y Haas 2000; Siddiqui *et al.*, 2006). La producción de HCN se relaciona con la disponibilidad nutricional de los precursores de la vía; como son los aminoácidos glicina y metionina, o de exudados radiculares que contengan glucosidos cianogénicos (Owen y Zdor, 2001). El ácido cianhídrico no participa en el crecimiento, almacenamiento de energía o el metabolismo primario de

las bacterias, pero generalmente se considera como un metabolito secundario que posee un papel ecológico y confiere una ventaja selectiva a las cepas que lo producen (Vining, 1990).

El HCN es un compuesto altamente volátil tóxico que interfiere en la respiración celular al inhibir la enzima citocromo oxidasa en las mitocondrias. Esto, a su vez, impide la producción de ATP (adenosina-5'trifosfato), la molécula que transfiere energía en la célula. Por lo tanto, la célula se ve privada de energía, y como resultado, su crecimiento se suprime. Ayuda en la supresión de patógenos aeróbicos de la raíz (Schippers et al., 1990). (Castric 1977). El ácido cianhídrico en la rizósfera tiene diferentes efectos sobre diferentes tipos de plantas; no obstante, aún no está claro el papel de la producción de HCN en el control de patógenos radiculares.

Producción de quitinasas

La quitina es un homopolímero formado por residuos de N-acetil-D-Glucosamina con enlaces β -1,4. Es el recurso renovable más abundante después de la celulosa. Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza como un componente estructural de crustáceos, hongos, protozoos e insectos (Hoster *et al.*, 2005). La quitina y sus derivados presentan un especial interés por encontrarse involucrados en diferentes actividades biológicas como inmunoadyudantes, floculantes de lodos en aguas residuales y disminución del uso en agroquímicos. El uso comercial de la quitina se centra en la necesidad de desarrollar soluciones enzimáticas de quitinasas estables y de bajo costo, los residuos de mariscos han reportado ser una adecuada fuente de quitina, lo cual promueve aún más el valor económico de los productos marinos (Wang y Chang, 1997).

Las quitinasas son glicosilhidrolasas y se encuentran presentes en una gran variedad de organismos como bacterias, hongos, insectos, plantas y animales. Estas enzimas juegan papeles fisiológicos y ecológicos importantes. Los invertebrados requieren quitinasas para la degradación parcial de sus exoesqueletos viejos y las plantas las utilizan como un mecanismo de defensa contra microorganismos fitopatógenos (Hoster *et al.*, 2005). Las bacterias producen quitinasas principalmente para degradar quitina y usarla como fuente de energía. Adicionalmente, algunas bacterias quitinolíticas, son agentes potenciales para el control biológico de enfermedades de plantas causadas por diversos hongos fitopatógenos, pues hidrolizan la quitina presente en la pared celular del hongo.

Las bacterias fitopatógenas también pueden ser controladas por estas enzimas debido a que algunas presentan actividad lisozimal, lo cual permite la degradación de la pared celular bacteriana (De la Cruz *et al.*, 1992). Estas enzimas pueden ser producidas por muchas especies bacterianas, entre las más conocidas se encuentran los géneros *Aeromonas*, *Serratia*, *Myxobacter*, *Vibrio*, *Streptomyces* y *Bacillus* (Hoster *et al.*, 2005).

Los péptidos antimicrobianos contenidos en las bacterias quitinolíticas ejercen su actividad interactuando con la membrana celular del microorganismo desestabilizándola, con un posterior efecto de lisis celular, o causando poros transitorios que le permiten al péptido ingresar al citoplasma e interactuar con moléculas receptoras que alterarían funciones fisiológicas vitales para el microorganismo, entre estas moléculas estarían proteínas involucradas en la síntesis de componentes como la pared celular, ácidos nucleicos o la traducción de proteínas (Ng-Choi *et al.*, 2014; Maróti *et al.*, 2011; Marlow *et al.*, 2009; Liao *et al.*, 2003).

Resistencia sistémica inducida

La interacción de algunas PGPR con su planta hospedante puede reducir el número de enfermedades de la planta o la severidad de la sintomatología de la infección generada por algunas bacterias, hongos, virus, nemátodos y algunos insectos patógenos (Poupin *et al.*, 2013). Esto ocurre porque algunas de las rizobacterias desencadenan en las plantas un proceso de capacidad defensiva por periodos prolongados (“inmunidad”), conocido como resistencia sistémica inducida (ISR, por sus siglas en Inglés) (Lucas *et al.*, 2013). La ISR comparte muchas propiedades con la respuesta inmune innata, este proceso depende de la señalización del ácido jasmónico y etileno en la planta. La acumulación de estas moléculas coordinan a nivel sistémico la activación y el mejoramiento de la capacidad de defensa (Bordiec *et al.*, 2011); mediante mecanismos como: el reforzamiento de la pared celular, la producción de fitoalexinas antimicrobianas, las enzimas peroxidasa, quitinasa, β 1-3 glucanasa, fenilalanina amonio liasa, proteínas relacionadas con la patogénesis y producción de biosurfactantes (Sunar *et al.*, 2013). Algunos orgánulos y moléculas bacterianas inducen la ISR, tales como: lipopolisacáridos (LPS), flagelo, ácido salicílico, sideróforos, lipopéptidos cíclicos, el factor antifúngico Phl, molécula AHLs y los degradadores de compuestos volátiles producidos por *Bacillus subtilis*. A diferencia con otros mecanismos de biocontrol, para desencadenar el mecanismo ISR no se requiere que la cepa colonice la raíz de la planta

de forma extensiva, como ha sido reportado para *Bacillus altitudinis*, *B. cereus*, *B. subtilis* (Poupin *et al.*, 2013). Otros ejemplos de rizobacterias capaces de promover ISR en plantas son: *B. amyloliquefaciens*, *B. pasteurii*, *B. pumila*, *B. mycoide*, *B. sphaericus*, *Burkholderia phytofirmans*, *Rhizobium leguminosarum*; *P. putida* 89B-27 y *Serratia marcescens* (Bhattacharyya, 2012).

Bioestimulantes en la agricultura

En la actualidad el mayor desafío para la humanidad es la seguridad alimentaria de las generaciones actuales y futuras. Una demanda creciente y un constante aumento de la población mundial exige que la producción de alimentos por unidad de superficie cultivada de la tierra tenga que aumentar drásticamente, preferentemente con un mínimo de impacto sobre los ecosistemas naturales (George, 2011). Una forma de lograr un mayor rendimiento será la reducción de las pérdidas de cultivos causadas por patógenos y plagas, que se estiman de un 25 a 40% de la producción total. Para este fin, deben desarrollarse estrategias sostenibles y respetuosas del medio ambiente. (Sobhy, 2014)

Mejorar la presencia y la eficacia de los agentes de control biológico nativos podría ser una de esas estrategias, la inducción de resistencia en vegetales, puede promover resistencia a enfermedades en plantas, mediante el uso de diferentes inductores y compuestos naturales de las plantas. (Sobhy, 2014)

Quitosano

Uno de los productos con capacidad de inducir resistencia en plantas es el quitosano, el cual es un polisacárido natural derivado por N - desacetilación de la quitina, compuesto por dos tipos de unidades estructurales distribuidas de manera aleatoria (distribución Bernouliana) a lo largo de la cadena, la N-acetil-D-glucosamina y la D-glucosamina, las cuales se encuentran unidas entre sí por enlaces del tipo β (1 \rightarrow 4) glicosídicos. Es un componente importante de las conchas de los crustáceos: como camarones y cangrejos. En años recientes el quitosano y sus derivados han sido utilizados como alternativas para una agricultura sostenible (Larez, 2006)

Los mecanismos de acción por los cuales el quitosano (con distintos grados de acetilación), y por extensión sus derivados, ejercen dicha actividad no han sido dilucidados completamente; sin embargo, hay algunos mecanismos propuestos para

explicar acciones específicas, como por ejemplo: interacción electrostática entre el quitosano cargado positivamente (polielectrolito catiónico) y algunas bacterias con membranas celulares cargadas negativamente (Gram negativas como la *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus typhimurium*, etc.) alteran significativamente las propiedades de barrera de la membrana exterior del microorganismo (Helander *et al.*, 2001).

Algunos autores han propuesto que la formación del complejo polielectrolito que bloquea físicamente la membrana celular externa del microorganismo, impide el flujo normal de nutrientes/desechos, provocando la muerte bacteriana (Chung *et al.*, 2004).

La quitina y, especialmente, el quitosano parecen llamados a seguir incrementando fuertemente, y a corto plazo, su presencia como productos de origen natural en muchas áreas relacionadas con la agricultura. Las principales razones que permiten vislumbrar este futuro inmediato son: la relativa facilidad de acceso y los bajos costos de los materiales que permiten obtenerlos, la baja incidencia ambiental que parecen poseer para la aplicación de volúmenes grandes, la baja toxicidad para humanos y animales, la versatilidad de formas de usos (soluciones, hidrogeles, películas) y el amplio espectro de uso que han encontrado en la agricultura y actividades relacionadas, abarcando aspectos como enmiendas de suelo, protección de semillas, estimulación del crecimiento, inducción de mecanismos de defensa, protección de plantas contra fitopatógenos (raíces, hojas, frutos), bactericida, nematicida, matriz para la liberación de agroquímicos, protección postcosecha de frutos y vegetales (Larez, 2008)

Nutrición mineral como agente de defensa para las plantas

El papel de los nutrientes de las plantas que estamos más acostumbrados a considerar es aquel relacionado con sus funciones en el metabolismo, a través del cual afectan el crecimiento y el rendimiento de los cultivos. Sin embargo, la nutrición mineral también tiene efectos secundarios sobre el crecimiento y el rendimiento, a través de su influencia sobre el patrón de crecimiento, la morfología y la anatomía de la planta y sobre su composición química. Cambios inducidos por los nutrientes en estas características pueden representar aumento o disminución tanto de la resistencia como de la tolerancia de la planta a las enfermedades. El efecto específico que se produzca depende del

nutriente en consideración, la modificación específica en su disponibilidad o concentración (aumento o disminución), la naturaleza del patógeno y el genotipo vegetal (Marschner, 1995).

La nutrición mineral afecta la susceptibilidad a las infecciones bacterianas de la misma manera que afecta a las infecciones por hongos. El potasio (K) y el calcio Ca desempeñan un papel clave en la formación de una barrera eficaz a las infecciones. Cuando ambos elementos y a menudo, los niveles de nitrógeno (N) son deficientes, las plantas son más susceptibles a ataques bacterianos. (Datnoff *et al.*, 2007)

Las relaciones de las enfermedades con el contenido de K son más consistentes. En una revisión de 534 artículos de investigación se encontró que el K redujo enfermedades bacterianas y fúngicas 70 % del tiempo y de los insectos y ácaros 60 % del tiempo. A diferencia de otros nutrientes, esta inferencia puede hacerse para K debido a que un suministro adecuado por lo general resulta en un aumento de la resistencia al ataque de todos los parásitos y plagas. (Datnoff *et al.*, 2007)

Los fitofortificantes son productos que, sin ser fitosanitarios, permiten a la planta desarrollar defensas ante distintas enfermedades, así como fortalecer el estado general de la planta lo que la hace más resistente frente a plagas o situaciones de estrés (Santesteban *et al.*, 2008)

En la actualidad existe un creciente interés en el uso de los fortalecedores de plantas para aumentar o inducir la tolerancia de estas a estrés biótico o a abióticos. Por definición, un fortalecedor de plantas protege a las mismas mediante la estimulación de los mecanismos de resistencia, defensa ataque o por competencia del organismo por espacio y alimento (Sobhy, 2014) Idealmente los fortalecedores de plantas necesitan ser de bajo riesgo y proporcionar un beneficio adecuado, como un aumento en el rendimiento o el uso de riego reducido. Tradicionalmente, estos se conocen como protectores de la salud del cultivo, y ayudan al crecimiento vegetal mediante la prevención o ataque a organismos no deseados. (Cochran *et al.*, 2012)

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Ubicación y desarrollo del ensayo.

La investigación fue realizada en diferentes fases, la primera, *in vitro* y la segunda en umbráculo se realizaron en el laboratorio y umbráculo de Bacterias Fitopatógenas, Instituto de Botánica Agrícola de la Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Estado Aragua. Una fase de campo, en la unidad de producción Monverana C.A, Municipio Guaicaipuro estado Miranda y la identificación molecular de las bacterias y mecanismos de acción se llevó a cabo en el laboratorio de Virología Vegetal y Biotecnología del Centro de Microbiología ubicado en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

2. Obtención de *Ralstonia solanacearum*

Ralstonia solanacearum se tomó de la colección del laboratorio de Bacterias Fitopatógenas de la Facultad de Agronomía, UCV. Para comprobar su viabilidad se sembró mediante estriado por agotamiento en capsulas de petri con los medios agar nutritivo (AN) y cloruro de trifetil tetrazolio (TZC). Las colonias puras fueron guardadas en bolsas plásticas para evitar la contaminación con otros organismos y se realizaron observaciones diarias para ver el crecimiento de la bacteria.

Pruebas de patogenicidad

Para corroborar la patogenicidad de *Ralstonia solanacearum*, se prepararon suspensiones bacterianas de 48 horas de crecimiento sobre AN ajustadas a una concentración de 10^8 cel/mL (con la ayuda del tubo número 2 de la escala de Mc Farland) (Barret, 1975), las cuales fueron inoculadas mediante infiltración en tallos de plantas de pimentón sanas, homogéneas en tamaño y de buen vigor. Posteriormente se cubrieron con bolsas plásticas transparentes humedecidas con ADE durante 24 h, a fin de proporcionar condiciones de alta humedad relativa (100 %), luego fueron colocadas en umbráculo observándose diariamente hasta la aparición de síntomas.

Una vez manifestados los síntomas fue realizado el reaislamiento, para ello se tomaron trozos de tallos afectados, los cuales fueron lavados tres veces con agua destilada estéril y luego macerados en un mortero estéril con ADE. La siembra se realizó en medio TZC, tomando una ansada del macerado y haciendo un estriado por agotamiento, cuando

fueron observadas las colonias típicas se pudo confirmar la presencia del patógeno inoculado

3. Aislamientos de bacterias de la rizosfera

Para el aislamiento de las bacterias antagonistas de la rizosfera, se utilizó la metodología descrita por Gómez *et al.*, (2005), con algunas modificaciones. Para ello se colectaron plantas de zonas productoras de Carabobo, una vez trasladadas al laboratorio, las muestras fueron procesadas tomando 10 g de raíz, las cuales se maceraron en un mortero estéril añadiéndole 90 ml de solución salina para obtener la solución madre, posteriormente se realizó una solución seriada hasta 10^{-4} , y se extrajo con una pipeta 0,1 ml de cada de las diluciones para sembrarse por extensión en superficie en placas de Petri sobre los medios de cultivos AN y BK . Por cada dilución se realizaron 3 repeticiones.

Transcurridas 48 horas en condiciones de laboratorio, se observó el crecimiento bacteriano y fueron seleccionadas aquellas bacterias que crecieron desarrollando un halo de inhibición a otras bacterias, también las que presentaron un alto número de colonias y aquellas que al colocarlas en luz UV se observaran fluorescentes en el medio BK . De estas colonias se realizó un estriado por agotamiento en los medios antes mencionados con tres replicas por cada una, para obtener colonias aisladas y posteriormente cultivos puros que fueron confrontados *in vitro* con *Ralstonia solanacearum*.

Aislamiento de bacterias filosfericas

Para realizar el aislamiento de las bacterias provenientes de la filosfera se utilizó la técnica de maceración propuestas por Rose (1975) con algunas modificaciones, para ello se tomaron hojas sanas de plantas de pimentón, las cuales se lavaron de manera individual con agua destilada estéril, una fracción de las muestras fueron colocadas en beakers que contenían 50 ml y 100 ml de solución salina estéril y otras con una solución de tween 80 al 5%, ambas se agitaron durante 10 min y luego fueron colocadas sobre un agitador durante 24 h. Transcurrido ese período, se procedió a sembrar en los medios AN y BK. La selección de las bacterias más promisorias se realizó siguiendo la metodología descrita anteriormente.

4. Confrontación *in vitro* de los aislamientos bacterianos con *Ralstonia solanacearum*

Los aislamientos bacterianos seleccionados de las muestras de la rizosfera y filoplano fueron confrontados con el patógeno, según la metodología descrita por Mariano *et al* (2005) que consistió en preparar suspensiones bacterianas a partir de los aislamientos puros obtenidos previamente, ajustados a una concentración de 10^8 cel/ml con el tubo número 2 de la escala de Mc Farland (Barret, 1975). Luego se tomaron 10 μ L de las suspensiones con la ayuda de una micropipeta y se agregaron a discos de papel de filtro estériles de 9 mm de diámetro sobre placas de petri estériles previamente identificadas.

Fue preparada una suspensión de *Ralstonia solanacearum* ajustada a la misma concentración la cual se sembró por extensión en superficie a razón de 0,1ml en los medios AN y BK dejándose secar, seguidamente se colocaron 5 discos de papel de filtro en cada medio, previamente impregnados con las bacterias aisladas de la rizosfera y filosfera. Transcurridas 48 horas se observó y tomo nota de las bacterias que produjeron halo de inhibición, midiendo el mismo con una regleta desde el borde del disco hasta el final de halo, luego las bacterias fueron conservadas en tubos eppendorf para su uso en los ensayos *in vivo*.

5. Evaluación en condiciones de umbráculo de la capacidad antagonista de las bacterias más promisorias *in vitro* y de 3 productos comerciales (fitofortificantes y bioestimulantes) sobre *Ralstonia solanacearum*

Se utilizaron las tres (3) bacterias aisladas del rizoplano y una (1) del filoplano que produjeron los mayores halos de inhibición en las pruebas *in vitro* y tres productos comerciales BIOREND®, BIOCLEAN® y PHYTO-POS-K® (Cuadro 1) los cuales según las especificaciones, favorecen el desarrollo de los mecanismos de resistencia en las plantas. El ensayo se realizó en el umbráculo protegido contra insectos asignado al Laboratorio de Bacterias Fitopatógenas de la Facultad de Agronomía de la UCV. Se tomó nota de la temperatura y humedad relativa durante todo el ensayo. La metodología utilizada para este ensayo, fue la descrita por Mariano *et al* (2005) con algunas modificaciones y consistió en lo siguiente:

Se realizaron suspensiones de las bacterias seleccionadas de aproximadamente 48 horas de crecimiento sobre el medio AN, las cuales fueron ajustadas a una concentración de

10⁸ cel/ml según la escala de Mac Farland (Barret, 1975), utilizando agua destilada. Estas suspensiones se aplicaron en el sustrato de las plantas al igual que los productos comerciales a excepción del Phytophos-K que se aplicó foliarmente con una asperjadora.

Las aplicaciones se realizaron semanalmente a razón de 200 cc por planta y los productos se aplicaron según las dosis recomendadas por las casas comerciales. También se trataron plantas con agua corriente para tener un patrón de medidas de plantas sin síntomas (tratamiento testigo), 30 días después de las aplicaciones de los tratamientos se realizó la inoculación al suelo de *Ralstonia solanacearum* a la concentración de 10⁸ cel/ml. Semanalmente se efectuaron observaciones, tomando registro de las plantas que mostraran síntomas en cada uno de los diferentes tratamientos, el ensayo se llevó a cabo hasta que el 80% de las plantas testigo (solo agua) murieran por la marchitez bacteriana.

Cuadro 1. Tratamientos aplicados a plantas de pimentón con bacterias antagonistas y productos comerciales para medir su efecto sobre el control a *Ralstonia solanacearum* en condiciones de umbráculo.

Tratamiento	Descripción
T1	Plantas tratadas con la Bacteria 23
T2	Plantas tratadas con la Bacteria 1
T3	Plantas tratadas con la Bacteria F1
T4	Plantas tratadas con la Bacteria 7
T5	Plantas tratadas con Bioclean ®
T6	Plantas tratadas con Biorend ®
T7	Plantas tratadas con Phyto- Fos-k®
T8	Plantas tratadas con Agua
T9	Plantas tratadas con <i>Ralstonia solanacearum</i>

6. Determinación en umbráculo del efecto sobre variables biométricas de las bacterias antagonistas más promisorias *in vitro* en el control de *Ralstonia solanacearum*

Este ensayo se realizó en el umbráculo protegido contra insectos asignado al Laboratorio de Bacterias fitopatógenas de la UCV, se utilizaron plantas de Pimentón del híbrido Alliance las cuales se mantuvieron en bandejas de germinación hasta el

momento del trasplante (30 días) en el que se pasaron individualmente a bolsas de polietileno que contenían 10 Kg de sustrato estéril. Los tratamientos fueron conformados por las 4 bacterias con mayor antagonismo *in vitro* (Bacterias denominadas R1, R7, R23 y F1), tres de ellas como ya se mencionó, aisladas de la rizosfera y una del filoplano, y los productos BIOREND®, BIOCLEAN® y PHYTO POS-K®. Se empleó la metodología de Mariano *et al* (2005) modificada, preparando suspensiones bacterianas a una concentración de 10^8 cel/mL (Barret, 1975), utilizando cultivos puros de 48 horas de crecimiento. Al momento del trasplante se sumergieron las plántulas en las suspensiones bacterianas, una vez sembradas, los tratamientos fueron aplicados semanalmente (Cuadro 2) utilizando para el caso de las bacterias antagonistas un volumen de 200 mL por planta a la concentración previamente descrita y los productos comerciales a las dosis sugeridas por las casas comerciales. Se dejó un tratamiento control, al cual solo se le aplicó agua.

Cuadro 2. Tratamientos aplicados en plantas de pimentón en condiciones de umbráculo para medir el efecto de bacterias antagonistas y productos comerciales sobre variables biométricas

TRATAMIENTO	DESCRIPCION
T1	Aplicación en plantas de la Bacteria 7
T2	Aplicación en plantas de Biorend ®
T3	Aplicación en plantas de la Bacteria 1
T4	Testigo (Plantas tratadas con aguas)
T5	Aplicación en plantas de Phyto- Pos-k®
T6	Aplicación en plantas de la Bacteria F1
T7	Aplicación en plantas de la Bacteria 23
T8	Aplicación en plantas de Bioclean ®

Durante el ciclo del cultivo se realizaron mediciones semanales de: altura de las plantas, número de hojas, diámetro del tallo, número de frutos y rendimiento. La altura de las plantas fue medida utilizando una cinta métrica, midiendo desde el cuello hasta la yema terminal más alta (cm), el grosor del tallo se realizó con la ayuda de un vernier digital marca Neiko midiendo al nivel del cuello (mm). El número de frutos se obtuvo mediante la cosecha de los pimentones cuando se encontraban fisiológicamente maduros (comenzando el viraje), luego se pesaron los frutos totales obtenidos por tratamiento.

7. Evaluación en condiciones de campo del efecto de bacterias antagonistas y productos comerciales sobre variables biométricas en el cultivo de Pimentón.

El ensayo se realizó en la finca Monverana ubicada en la zona de Pozo de rosas estado Miranda. La aplicación de los tratamientos (Cuadro 3) se realizó inmediatamente después del trasplante a los 30 dds. Los productos comerciales y sus dosis fueron aplicados de la forma recomendada por las casas comerciales. Las suspensiones de las bacterias antagonistas se prepararon como fue descrito anteriormente, a razón de 200 cc por planta. Entre cada tratamiento se dejaron plantas que actuaron como borduras para evitar la contaminación entre tratamientos. Las variables biométricas medidas fueron altura de plantas, número de hojas, diámetro del tallo, numero de flores y frutos y rendimiento.

Cuadro 3. Tratamientos aplicados a plantas de pimentón en condiciones de campo con bacterias antagonistas y productos comerciales.

Tratamiento	Descripcion
T1	Plantas tratadas con Agua
T2	Plantas tratadas con la Bacteria R1
T3	Plantas tratadas con Biorend®
T4	Plantas tratadas con la Bacteri R7
T5	Plantas tratadas Bioclean®
T6	Plantas tratadas con la Bacteria F1
T7	Plantas tratadas con Phyto- Pos-k
T8	Plantas tratadas con la Bacteria 23

8. Identificación de algunos de los mecanismos de biocontrol de acción realizado por de las bacterias antagonistas más promisoras *in vitro*.

8.1. Solubilización de fosfato

Para detectar la capacidad de las bacterias como solubilizadoras de fosfato se sembraron en el medio de cultivo selectivo Pikovskaya el cual está compuesto por glucosa 10.0, Ca₃(PO₄)₂ fosfato de calcio 5.0, (NH₄)₂SO₄ sulfato de amonio 5.0, KCl cloruro de potasio 0.2, MgSO₄·7H₂O sulfato de magnesio 0.1, MnSO₄·2H₂O sulfato de

manganeso 0.0001, FeSO₄ sulfato ferroso 0.0001, extracto de levadura 0.5 y agar 15.0. El extracto de levadura y las diferentes sales proporcionan nitrógeno y otros nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano. La incubación se realizó durante quince días y la medición se efectuó a los 7 días. Aquellas con crecimiento en el medio y con la formación de un halo alrededor de las colonias fueron consideradas solubilizadoras y evaluadas mediante el índice de solubilización (IS) = diámetro del halo (mm)/diámetro de la colonia (mm). Como control positivo se utilizó la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* Cepa” B” de la colección del laboratorio de bacterias de la UCV

8.2. Producción de ácido indolacético (AIA)

Para cuantificar la producción de AIA de las rizobacterias se realizó una curva patrón tomando concentraciones de 0,5-1-2-3-4-5-10-15-20-25-30-35-40-45µg/mL de AIA (Sigma[®]) a partir de una solución stock de 3000 µg/mL. Luego se tomó 2 mL del reactivo de Salkowsky y 4 mL del medio Burk’s y se adicionó el volumen de la solución stock para obtener la concentración deseada, partiendo de un volumen final de 6mL (Cuadro 3). Se realizaron 3 réplicas por punto. Se dejó reposar por 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente y se leyeron las absorbancias de los patrones a 530 nm en espectrofotómetro marca Pharo 300 de Merck. Con los valores obtenidos se halló la ecuación que relaciona la concentración de AIA en función de la absorbancia.

Concentraciones de AIA para construir curva patrón µg/mL	Volumen a medir de la solución stock 3000 µg/mL (µL) Para construir curva patrón
0	0
0,5	1
1	2
2	4
3	6
4	8
5	10
10	20
15	30
20	40
25	50
30	60
35	70
40	80
50	100

Luego se realizó la medición de AIA producido por cada rizobacteria, para ello las cepas fueron inoculadas por triplicado en 25 mL del medio Burk's, seguidamente se agregó 100ppm de L- triptófano como inductor de AIA. Se incubaron en oscuridad por 48 h a 30°C en agitación constante a 120 rpm. Al finalizar se centrifugaron alícuotas de 10 mL por centrifugación a 8000 Xg por 20 min. La lectura se realizó utilizando el reactivo de Salkowsky (50 mL de ácido perclórico al 35 % y 1 mL de cloruro férrico 0.5M) en relación 2:1, tomando 4 mL del sobrenadante bacteriano y adicionando 2 mL del reactivo, dejándose reaccionar durante 30 min en oscuridad, para después medir la absorbancia de cada muestra en espectrofotómetro a 530 nm. El desarrollo de color rosa indicó la presencia de AIA, el cual puede ir desde rosa claro a intenso dependiendo la concentración.

8.3.Producción de ácido cianhídrico (HCN)

La evaluación de producción HCN se realizó empleando la técnica modificada de sellado de placas descrita por Kremer y Souissi (2001), las bacterias antagonistas fueron sembradas en agar tripticasa de soya suplementado 4,4 g/L de glicina. Se impregnó papel Whatman núm. 1 de 9 cm de ϕ estéril con una solución de picrato (ácido pícrico al 0.5% en una solución de carbonato de sodio al 2%) que se depositó en el interior de la tapa de las cajas de Petri con el inóculo bacteriano respectivo; las cajas se cerraron con las tapas que contenían el papel filtro, se sellaron con Parafilm "para evitar la volatilización del HCN producido y se incubaron a 28°C por 48 horas. Después del tiempo de incubación se observó el cambio de color del papel con picrato (amarillo a naranja) que se consideró como evidencia de la producción de HCN.

De acuerdo con la intensidad del cambio de color, se categorizó la producción según Sharma *et al.* (2011) como + amarillo-anaranjado; ++ anaranjado; +++ anaranjado-marrón; ++++ marrón; y +++++ marrón intenso.

8.4.Producción de Sideroforos

Se inocularon 10 μ L de cultivo bacteriano con concentración de 10^6 cel/mL en capsulas de Petri, con el medio cromo azurolS (CAS), el cual tiene un color verde-azulado conferido por la formación de un complejo CAS + Fe³ + hexadeciltrimetilamonio. Ante

una actividad quelantante fuerte, el hierro se une al quelantate en vez de al CAS, determinando que el color vire a amarillo-naranja. Por lo tanto la producción de sideroforos se detectará por la aparición de halos amarillos alrededor de la colonia bacteriana. Se dejaron incubar durante 24 horas a 37 °C, antes de realizar la lectura (Ramos y Barboza, 2005). La cepa 2321 de la colección de bacterias del IVIC fue utilizada como control positivo.

Capacidad para fijar nitrógeno

Crecimiento en medio sólido libre de nitrógeno

Los aislados bacterianos se sembraron por medio de la técnica de estriado en agar Ashby) que contenía 20 g de Mannitol, 0.200 g de Fosfato dipotásico, 0.200 g de Sulfato de magnesio 0.200, g de Cloruro de sodio 0.100 g de Sulfato de potasio, 5 g de Carbonato de calcio y 15 g de Agar (Atlas, 1995; Gage, 2004; Valdés et al., 2005) y se incubaron a 30 °C observando su crecimiento durante 7 días de incubación. Pasado el tiempo de incubación se evaluó el desarrollo y crecimiento en la superficie del medio. Se consideraron como microorganismos con capacidad de crecimiento en ausencia de nitrógeno a aquellos que crecieron sobre este medio de cultivo.

8.5. Actividad quitinolítica

Para determinar la actividad quitinolítica de las bacterias se preparó un medio a base de quitina coloidal como sustrato, pesando 1 g de quitina coloidal (Sigma) y añadiéndole 10 mL de HCl % se mantuvo en agitación continua a 4 °C durante 24 horas. Posteriormente se agregaron 250 mL de etanol frío al 70%, transcurrido el tiempo la mezcla fue centrifugada a 8000 rpm por 30 min a 4 °C. El sedimento se lavó con agua destilada estéril mediante centrifugación a 8000 rpm durante 3 min a 4 °C hasta que el olor a alcohol se eliminó completamente. La quitina coloidal obtenida tenía una suavidad, consistencia pastosa y se almacenó a 4 °C hasta su uso posterior (Agrawal y Kotasthane 2012).

Diálisis de quitina coloidal

La quitina coloidal que se utilizó como sustrato fue sometida a un proceso de diálisis para eliminar metabolitos de bajo peso molecular o impurezas que pueden inhibir la actividad de las enzimas quitinolíticas. Como primera medida se realizó un pre

tratamiento de las membranas de diálisis con una solución de NaHCO 100mM y EDTA 10mM a 60°C durante 2 horas, a continuación se repitió el paso anterior con la misma solución fresca. Luego, la solución fue reemplazada por agua destilada y se mantuvieron las mismas condiciones de tratamiento. Posteriormente, se realizaron cinco ciclos de lavado con agua destilada y se almacenaron las membranas a 4°C en agua destilada con cloroformo al 0.1% (v/v). En fragmentos de 20 cm de longitud de membrana pretratada se adicionaron aproximadamente 25mL de quitina coloidal, las membranas fueron selladas y ubicadas en un recipiente con agua destilada que se llevó a diálisis a 4°C durante 48 horas haciendo cambios periódicos del agua.

Determinación cualitativa de actividad quitinasa.

Para la determinación cualitativa de la actividad quitinasa-positiva se preparó un medio basal (MB) que contenía 0.3 g de MgSO₄.7H₂O, 3.0 g de (NH₄)₂SO₄, 2.0 g de KH₂PO₄, 1.0 g de ácido cítrico monohidratado, 15 g de agar, 200 µL de Tween 80, 4.5 g de quitina coloidal y 0.15 g de púrpura de bromocresol, el pH se ajustó a 4.7 y luego esterilizado en autoclave a 121 °C durante 15 min. El medio tibio se vertió en placas Petri, una vez solidificado se observó una coloración amarilla brillante, posterior a esto con una pipeta pasteur estéril se realizaron pozos de 0.5 cm en 4 bordes equidistantes en el medio de cultivo agregando en cada pozo 20 µL de los aislados bacterianos dejándose incubar en una estufa a 30°C hasta observar la formación de zona de color, que debe cambiar de amarillo brillante a un violeta intenso. La prueba se realizó por triplicado se utilizó *Serratia marcesens*, (G3), de la colección de bacterias como control positivo y el efecto quitinolítico se pudo observar mediante la formación de zona de color, que cambia de amarillo brillante a un violeta intenso (Agrawal & Kotasthane 2012).

9. Identificación molecular

9.1.Extracción de ácidos nucleicos

Para el aislamiento del ADN bacteriano se utilizó la técnica de Sambrook y Rusell con algunas modificaciones para lo cual se resuspendió la bacteria pura en 1 mL de Sulfato de magnesio 10 µM y centrifugo a 4500 g durante tres minutos, eliminando el sobrenadante. Se resuspendió en 300 µL de buffer Tris HCl 0,1 M pH 8 y adicionó 40 µL de lizosima (20 mg/ml) y 5 µL de ARNasa (7000 U/ml), seguidamente fueron incubadas a 37°C durante 5 minutos, a -20°C durante 10 minutos y finalmente a 80°C

durante 10 minutos, mezclando vigorosamente entre cada incubación. Se añadieron 5 μL de proteinasa K (20 mg/ml) e incubó a 60°C por 10 minutos invirtiendo manualmente (5 a 10 veces) posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 8000 g durante 1 minuto se tomó el sobrenadante sin tocar el botón y fue transferido a un tubo eppendorf adicionándole 150 μL de isopropanol absoluto frío -20°C y agitó suavemente.

Luego de una incubación a -20°C durante 30 minutos se centrifugó a 10.000 g por tres minutos, eliminó completamente el sobrenadante y limpio el botón con 300 μL de etanol 70% agitando por inversión y se volvió a centrifugar a 10.000 g durante 4 minutos eliminado perfectamente el sobrenadante. El pellet fue secado a 65°C por cinco minutos, resuspendido en 50 μL de agua pura desionizada estéril y refrigerado a -20°C para la amplificación.

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 50 μL conteniendo 1 μL de los primers, 0,5 μL de Taq polimerasa, 1 μL de dNTPs, 2 μL de MgCl_2 , 5 μL de PCR buffer, 4 μL de ADN y 35,5 μL agua desionizada destilada estéril. Se incluyó un control negativo sin muestra de ADN. La amplificación se realizó en un termociclador T3 (Biometra), con condiciones para la PCR descritas en el (Tab xx), y los primers utilizados fueron fD1 (ccgaattcgtcgacaacAGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y rP2 (cccggatccaagcttACGGCTACCTTGTTACGACTT)

Tabla XXX. Condiciones de PCR

95 $^{\circ}\text{C}$ x 8 minutos
95 $^{\circ}\text{C}$ x 2 minutos
42 $^{\circ}\text{C}$ x 30 segundos
72 $^{\circ}\text{C}$ x 4 minutos
72 $^{\circ}\text{C}$ x 10 minutos
Ir al paso 2 por 35 veces
4 $^{\circ}\text{C}$ infinito

Luego de la amplificación, se tomaron 5 μL de los productos de reacción para separarlos por electroforesis en gel de agarosa al 1.% suplementado con bromuro de

etidio (10 mg/mL), El tamaño aproximado de las bandas generadas se comparó con el marcador de peso molecular 1kb

Los productos de PCR del ADNr 16S fueron purificados con el Kit AccuPrep (Bioneer) las cepas se enviaron a secuenciar a MacroGen, Corea (www.macrogen.com). utilizando una modificación del método de terminación de la cadena de Sanger. Posteriormente, fueron analizadas utilizando el programa de edición de secuencias BioEdit

10. Características bioquímicas de las bacterias más promisorias *in vitro*.

Para la identificación de las bacterias más promisorias que resultaron antagonistas a los patógenos evaluados, se realizaron pruebas culturales, fisiológicas y bioquímicas, comprobando los resultados obtenidos con los del manual de Schaad *et al.*, (2001) y el Manual de Bergey's (Holt *et al.*, 1994). Algunas pruebas fueron: color de las colonias, requerimientos de oxígeno, tinción de Gram, tinción rojo Congo, catalasa, oxidasa, fluorescencia, licuefacción de gelatina, hidrólisis de almidón, pudrición de la papa, formación de colonias típicas en medio tween 80, hipersensibilidad en tabaco, producción de levan, crecimiento en YCA a 41 °C, arginina dihidrolasa, reducción de nitratos a nitritos, producción de sulfuro de hidrógeno, crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl, agar dextrosa rojo fenol, producción de ácido a partir de: arabinosa, galactosa, etanol, sorbitol, geraniol, polyethylene glicol.

11. Análisis estadísticos

El diseño de experimentos fué un completamente aleatorizado tanto para los ensayos *in vitro* como en umbráculo. El ensayo *in vitro* consto de N tratamientos con 3 repeticiones cada uno, la unidad experimental estuvo conformada por la capsulas de Petri. En el caso de los ensayos en umbráculo de biocontrol y promoción de crecimiento los mismos constaron de 9 y 8 tratamientos respectivamente con 12 y 15 repeticiones cada uno, donde cada planta representaba la unidad experimental. Para el ensayo en campo el diseño fue un bloques al azar conformado por cuatro bloques donde la unidad experimental estuvo conformada por tres plantas. Para todos los ensayos se efectuó el ANAVAR con un nivel de significancia de 5% utilizando el programa Statistix 9.0, en el caso de no haber una distribución normal de los errores se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal y Wallis.

Resultados y discusión

Caracterización morfológica de *Ralstonia solanacearum*

Al sembrar *R.solanacearum* en medio TZC se observaron colonias típicas, fluidas (mucoide) debido a la producción de polisacáridos extracelulares (EPS), superficie brillante, lisa, bordes irregulares y color blanco con rojo en el centro de las colonias (Figura 1A) y en agar nutritivo las colonias observadas fueron de color blanco lechoso, fluidas y mucoides (Figura 1B) Estos resultados coinciden con lo señalado por (Champoiseau *et al.*, 2009) y (Denny 2006), para la bacteria *R. solanacearum*

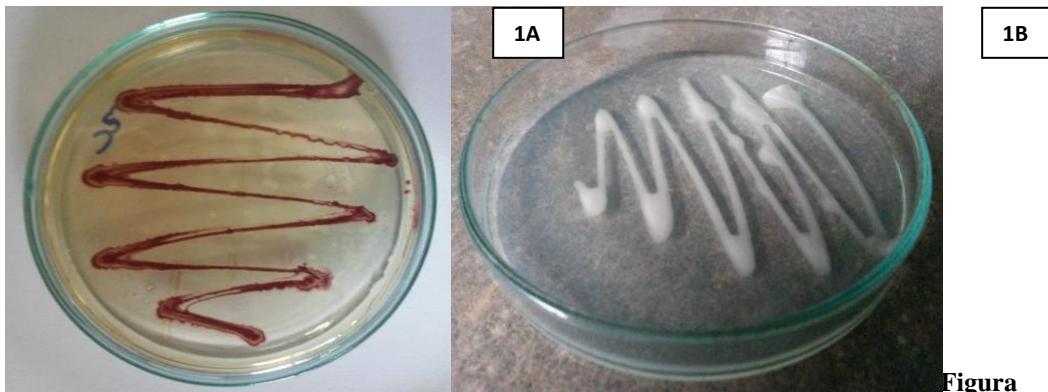


Figura 1A. Colonia de *Ralstonia solanacearum* en medio de cultivo TZC. (1B) Colonia de *Ralstonia solanacearum* en medio de cultivo Agar nutritivo

Patogenicidad de *Ralstonia solanacearum*

Las plantas mostraron síntomas de marchitez a las 48 horas de ser inoculadas (Figura 2) Al realizar la prueba de flujo bacteriano después de unos segundos se observó la presencia de la bacteria, que emanó de los haces vasculares en forma de un hilo continuo de color blanco (Figura 3) estos síntomas y signos son típicos de plantas afectadas por *R.solanacearum* (Escalona *et al.*, 2006) (Prea *et al.*, 2011).

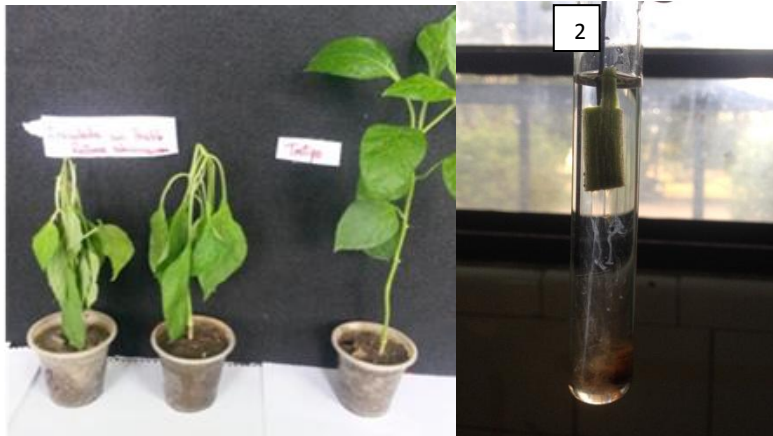


Figura 2. Prueba de patogenicidad de *R. solanacearum* en plantas de pimentón. Figura 3. Flujo bacteriano emanando de tallo de Pimentón

De los reaislamientos de la bacteria, en los medios de cultivos y TZC y AN, las colonias desarrolladas mostraron las características típicas de crecimiento de *Ralstonia solanacearum*. (Champoiseau *et al.*, 2009)

Aislamientos de bacterias de la rizosfera y filoplano.

En el proceso de aislamiento se pudo observar una densidad alta de microorganismos asociados a la raíz y filoplano del pimentón, se seleccionaron un total de 32 bacterias con posible potencial PGPB, 17 fueron aisladas de la rizósfera y 15 del filoplano (Figura 4)

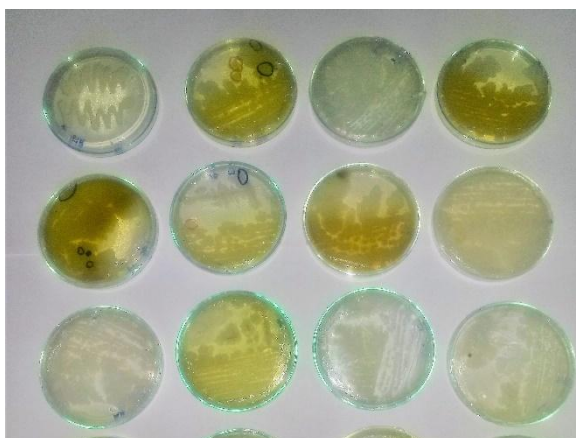


Figura 4. Colonias aisladas del rizosfera y filoplano de plantas de pimentón

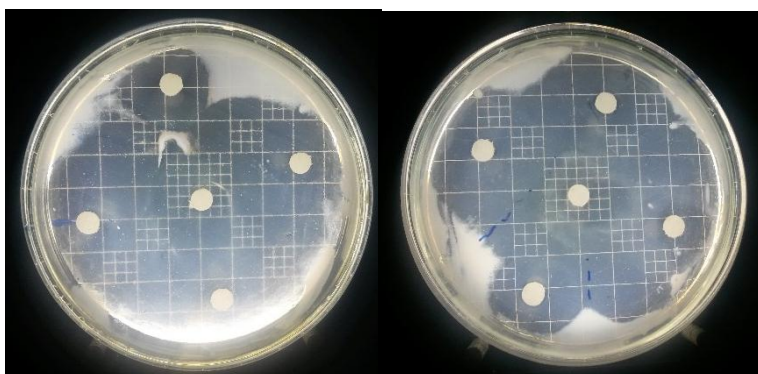
Reyes et al., 2006 describen al suelo como un hábitat complejo donde un gran número de poblaciones microbianas interactúan con los diversos sustratos, estando muchas de estas poblaciones asociadas a las raíces de las plantas en la zona rizosférica. Estas poblaciones microbianas son capaces de ejercer efectos específicos sobre el crecimiento vegetal como la producción de fitohormonas, disolución y mineralización de los fosfatos, fijación asimbiótica del nitrógeno atmosférico y producción de sideróforos y antibióticos (Vessey, 2003).

Xia *et al.*, 2015 obtuvieron un total de 336 cepas bacterianas endofíticas aisladas a partir de plantas de tomate, maíz, patilla y pimentón. Al respecto, Rodríguez *et al.*, 2016 demostraron el potencial de 136 aislamientos bacterianos provenientes de hojas, tallo, raíces y rizosfera de caña de azúcar.

Confrontación *in vitro* de los aislamientos bacterianos con *Ralstonia solanacearum*

Todos los aislamientos de la rizósfera produjeron actividad antagónica *in vitro* a *Ralstonia solanacearum*, al realizar la prueba no paramétrica Kruskal y Wallis, hubo diferencias significativas entre los tratamientos con respecto al control (Cuadro 1).

De las bacterias aisladas de la rizosfera se evidenció dos características distintivas que afectaron el desarrollo de *Ralstonia*, las cuales fueron, inhibición y crecimiento sobre el patógeno; solo la cepa R1 produjo halo de inhibición (Figura 5) mientras que el resto de las bacterias crecieron sobre *R. solanacearum*, impidiendo su desarrollo, (Figura 6) se puede inferir que los mecanismos usados por estos microorganismos fueron antibiosis y competencia respectivamente.



5

Figura 5. Prueba de biocontrol. Efecto de antibiosis *in vitro* de la cepa R1 sobre *R. solanacearum*

Las cepas R1, R23, R7 y R8 fueron las que mostraron mayor efecto de biocontrol sobre *R. solanacearum* con radios entre 4 cm a 6,12 cm. Los diferentes grados de actividad antagonista, se pueden atribuir a la capacidad de los aislamientos de producir compuestos antimicrobianos que actúan en el control de patógenos, una alta tasa de crecimiento y versatilidad metabólica. (Brown, 2010)

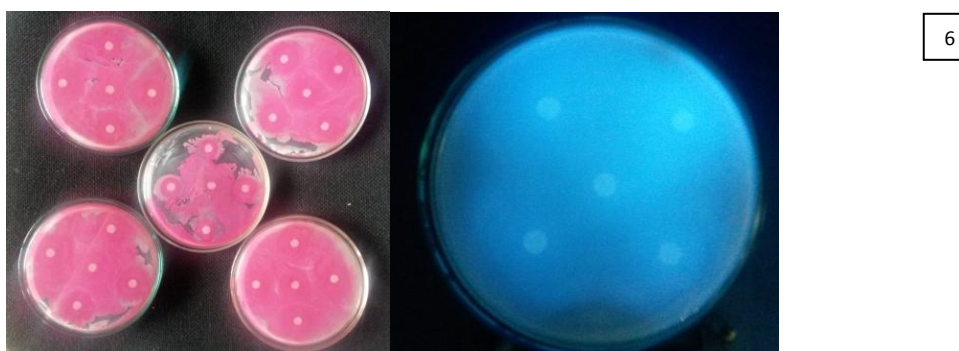


Figura 6. Prueba de biocontrol. Crecimiento de las cepas R23 y R7 sobre *R. solanacearum*

Con respecto a las bacterias aisladas del filoplano los radios obtenidos en las pruebas de antibiograma variaron de 0,7 cm a 2,7 cm (Cuadro 2) encontrándose diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. Todos los aislamientos obtenidos del filoplano crecieron sobre *Ralstonia solanacearum*, impidiendo su desarrollo, pero en menor proporción al compararlas con las bacterias aisladas de la rizósfera

Cuadro 1. Comparación de halo de inhibición de *R. solanacearum* producidos por las bacterias aisladas de la rizósfera

Aislados rizobactericos	Grupo	Promedio media aritmética (cm)
R7	A	6,12
R1	AB	5,1
R23	AB	4,96
R20	AB	4,86
R8	ABC	4,64
R22	ABCD	3,84
R9	ABCD	3,24
R3	ABCD	2,8
R13	ABCD	2,74

R10	ABCD	2,5
R26	ABCD	2,46
R6	ABCD	2,1
R14	ABCD	1,54
R27	BCD	1
R17	CD	0,74
R25	D	0,5
R19	D	0,4

P (0,05) Prueba no Parametrica Kruskal y Wallis . Cada valor acompañado de una letra hace referencia a un grupo específico

Cuadro 2. Comparación de halo de inhibición de *R. solanacearum* producido por las bacterias aisladas del filoplano

Aislados epifíticos	Grupo	Promedio media aritmética(cm)
F1	A	2,72
F2	AB	2,354
F21	AB	2,3
F15	AB	1,98
F17	AB	1,68
F19	AB	1,76
F4	AB	2,06
F18	AB	1,56
F7	AB	1,58
F20	AB	1,2
F3	AB	1,3
F30	AB	1,12
F31	AB	1,14
F8	AB	0,78
F5	B	0,72

P (0,05) Prueba no Parametrica Kruskal y Wallis . Cada valor acompañado de una letra hace referencia a un grupo específico

Con respecto al tema, Kurabachew y Wydra, 2013 evaluaron el potencial *in vitro* de 150 rizobacterias aisladas de plantas de tomate; 13 aislamientos redujeron el crecimiento del patógeno con zonas de inhibición de 5,4 a 21,5 mm, siendo las cepas correspondientes a los géneros *Bacillus* spp y *Pseudomonas* spp las que produjeron los mayores halos. Samad *et al.*, 2017 demostraron el efecto *in vitro* de los compuestos volátiles producidos por microorganismos y las interacciones beneficiosas entre PGPRs y plantas, lo que resulta en la inducción de resistencia sistémica contra elementos bióticos y abióticos, promoción del crecimiento e inhibición de patógenos fúngicos y bacterianos

Estos agentes de biocontrol pueden actuar principalmente, por antagonismo directo contra *R. solanacearum* o por inducción de resistencia sistémica como se muestra en trabajos conducidos para identificar el modo de acción de rizobacterias (Haas & Défago, 2005). *Ralstonia solanacearum* es un patógeno habitante del suelo y la efectiva colonización del sistema radicular por bacterias antagonistas puede evitar el ataque del patógeno y la posterior invasión del sistema vascular (Nguyen & Ranamukhaarachchi, 2010). Por lo tanto, la actividad antagonista presentada "*in vitro*" por las rizobacterias puede tener un papel importante en la reducción de la marchitez bacteriana.

Los géneros *Pseudomonas* spp., y *Bacillus* spp., han sido ampliamente reportados debido a la capacidad de inhibir el desarrollo de diversos fitopatógenos, por la producción de metabolitos como fenazinas, 2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG), pirrolnitrina (Prn), pioluterina (Plt) para *Pseudomonas* sp., (Baehler et al, 2005), y la producción de Iturina A y surfactina zwittermicina y kanosamina para el género *Bacillus* sp. (Kinsella et al, 2009; Asaka-Shoda; 1996); los cuales actúan inhibiendo el crecimiento o el metabolismo de patógenos como *Fusarium* spp., *Ralstonia solanacearum*, *Phytophthora capsici*, y *Rhizoctonia solani* (Idris et al, 2007, Sang et al, 2008)

Por otra parte, el control de patógenos con bacterias epífitas ha sido subestimado, especialmente si es comparado con el uso de bacterias endofíticas y de las rizobacterias, Filho *et al.*, (2010) exponen que el interés de su estudio está relacionado con la capacidad de estos microorganismos para ocupar nichos ecológicos en el filoplano y su amplio efecto antagónico contra patógenos. Los bio-surfactantes, antibióticos, bacteriocinas, síntesis de compuestos orgánicos volátiles (VOCs), sideróforos, competencia por espacio y nutrientes están relacionados con los efectos antagónicos de las bacterias epífitas sobre el crecimiento del fitopatógenos (Beattie y Lindow, 1999), sin embargo estudios recientes demuestran que las bacterias epífitas también actúan como inductores de la resistencia sistémica inducida (ISR) en plantas lo cual puede derivar en control de patógenos sistémicos . Filho *et al.*, (2010)

En el 2015 Caicedo y colaboradores evaluaron la capacidad de bacterias del filoplano de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* para reducir la gravedad de *Xanthomonas citri*. Estos efectos se asociaron con la alteración en la fijación bacteriana y la formación de

biofilm, factores que se sabe que contribuyen a la virulencia Xcc. Por otra parte, se demostró que las bacterias son capaces de intervenir en la comunicación célula - célula (quorum sensing) de *Xanthomonas*, representando de esta manera, una herramienta muy valiosa en el proceso de control biológico

Evaluación en condiciones de umbráculo de la capacidad antagonista de las bacterias más promisorias *in vitro* y de 3 productos comerciales (fitofortificantes y bioestimulantes) sobre *Ralstonia solanacearum*

Para los ensayos *in vivo* fueron seleccionadas las bacterias *Bacillus* sp, *Serratia* sp, *Pseudomonas* sp y *Pseudomonas aeruginosa*, por su eficacia *in vitro*, junto con los tratamientos ya preestablecidos. Los primeros síntomas de marchitamiento se observaron siete días después de la inoculación con *Ralstonia solanacearum* (Segunda semana de observación) en los tratamientos Phyto pos-k®, Bioclean®, *Pseudomonas* y *Pseudomonas aeruginosa*, en contraste con los tratamientos *Serratia* sp y Biorend® en el que el periodo de incubación se retrasó de 14 a 21 días respectivamente después de la inoculación. Durante la realización del ensayo la temperatura y humedad relativa del umbráculo oscilo diariamente entre 28 y 35°C y de 100% a 60%, respectivamente, presentando un promedio semanal de 29,3°C y 76,2 % de Hr.

Se encontraron diferencias altamente significativas entre los tratamientos, siendo *Serratia* sp y Biorend® los que ejercieron el mayor efecto bactericida, con una eficiencia de biocontrol de 91,6% cada uno, (Cuadro 3). La cepa *Bacillus* sp mostró una eficiencia de biocontrol de 66,6 % mientras que *Pseudomonas* y Bioclean® alcanzaron un 58,3%, los tratamientos conformados por Phyto Pos-K y *Pseudomonas aeruginosa* fueron los que ejercieron menor efecto biocontrolador con un 41,6% y 50 % respectivamente

Con respecto al porcentaje de mortalidad, los tratamientos conformados por *Serratia* sp y Biorend® fueron los que presentaron los valores más bajos, afectando solo un 8,3 % de las plantas inoculadas con *Ralstonia* (Cuadro 4) en contraste con *Pseudomonas aeruginosa* y Phyto Pos-K en los que la mortalidad alcanzó 50% y 58,3% respectivamente, el tratamiento a base de *Bacillus* sp obtuvo 33,3% de mortalidad mientras que *Pseudomonas* sp y Bioclean® fué de 41,6%. En cuanto al tratamiento que

consistió solo en la inoculación de la bacteria patógena (Control positivo) obtuvo el mayor número de plantas afectadas, alcanzando un 83,3% de plantas muertas.

Cuadro 3. Porcentaje de eficiencia de biocontrol y comparaciones de medias de los tratamientos

	Porcentaje de eficiencia de biocontrol	Grupo
SERRATIA T1	91,6	298.33 A
BIOREND® T6	91,6	293.11 A
BACILLUS SP	66,6	343 . 79 AB
PSEUDOMONAS SP	58,3	355 . 55 AB
BIOCLEAN®	58,3	323 . 09 AB
PSEUDOMONAS AERUGINOSA	50	355.55 AB
PHYTO- POS-K	41,6	374 . 37 AB
TESTIGO	16,6	413.5 B

P(0,05) Prueba no Paramétrica de Kruskal y Wallis. Cada valor acompañado de una letra hace referencia un grupo específico.

a

Cuadro 4. Porcentaje de mortalidad de plantas por *R. solanacearum*

Tratamiento	Porcentaje de mortalidad
<i>Serratia</i> sp	8,3
<i>Bacillus</i> sp	33,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50
<i>Pseudomonas</i> sp	41,6
Bioclean®	41,6
Biorend®	8,3
Phyto pos-k®	58,3
Agua	0
Testigo	83,3333333

Todas las cepas bacterianas ejercieron un efecto reduciendo la incidencia de la enfermedad, no obstante, no hubo correlación entre los valores obtenidos *in vitro*. La cepa *Pseudomonas* sp obtuvo mayores valores de crecimiento sobre *Ralstonia in vitro* sin embargo fue moderadamente efectiva al ser usada en los ensayos *in vivo*, *Serratia* sp tuvo menos efecto inhibitorio que *Pseudomonas* sp *in vitro*, sin embargo, fue significativamente más efectiva en los ensayos en plantas. Esta inconsistencia en los resultados ha sido observada en otros estudios (Maji et al., 2014) Aunque los ensayos en laboratorios pueden ser rápidos, sencillos y económicos los resultados dependen de la disponibilidad de nutrientes en el medio requeridos para que las bacterias antagonistas produzcan sustancias inhibitoras (Chen et al., 2003, McSpadden Gardener et al. 2005)

Singh et al., 2016 evaluaron el efecto de aislados de suelo rizosférico en tomate encontrando que las cepas de *B. amyloliquefaciens* DSBA-11 y DSBA-12, *B. cereus*, *B. subtilis* y *B. pumilus* disminuyeron significativamente la incidencia de la marchitez bacteriana en el tomate y aumentaron el crecimiento de la planta. Encontrando una eficacia máxima de biocontrol en los tratamientos de DSBA-11 y DSBA-12 de *B. amyloliquefaciens*, este efecto pudo ser atribuido a la producción de antibióticos por bacterias antagonistas en la rizósfera que suprimió la población de la bacteria patógena.

El género *Bacillus* es considerado como uno de los colonizadores más comunes de las plantas (Mahaffee y Kloepper, 1997), desempeñando un papel importante en el biocontrol de patógenos vasculares (Weber et al., 2007; Narayanasamy, 2013), el cual destina a la síntesis de antibióticos entre el 4–5% de su genoma (Stein, 2005). Entre los antibióticos producidos por este microorganismo, se encuentran lipopéptidos cíclicos de las familias de las surfactinas, iturinas y fengicinas, compuestos antimicrobianos, que causan daño en la membrana celular de los patógenos ocasionando vacuolización (Ongena and Jacques, 2008).

La introducción de bacterias antagonistas autóctonas de plantas de pimentón confirió una disminución del tiempo de incubación, incidencia y severidad en los ensayos realizados por Yanti *et al.*, 2017 Los aislados bacterianos demostraron 100% de eficiencia de biocontrol hasta terminar el ensayo. Wydra y Semrau (2005) también informaron una reducción comparable de la enfermedad asociada con los agentes de biocontrol *Bacillus* spp. y *Pseudomonas fluorescens* señalando al ácido cianhídrico, sideróforos y la inducción de resistencia como posibles mecanismos de acción para el biocontrol. Wydra y Semrau (2005) también reportaron la reducción de *R. solanacearum* asociada a los agentes de control biológico *Bacillus* spp y *Pseudomonas fluorescens*.

Chandrasekaran y colaboradores realizaron un estudio de meta -análisis sobre el impacto de los bicontroladores en *Ralstonia solanacearum* confirmando que las bacterias antagonistas redujeron significativamente la severidad de la marchitez bacteriana en comparación con las plantas no tratadas en más del 49% de los casos. Especies de *Pseudomonas* spp. tuvieron mayor efecto biocontrolador que cepas del género *Bacillus* spp.; *P. fluorescens* redujo significativamente la incidencia de la

Como se ha mencionado las PGPR pueden competir con éxito a *R. solanacearum* por los nichos y nutrientes tales como compuestos orgánicos que pueden ser necesarios para la reactivación de propágulos y / o posterior proliferación y colonización de raíz por el patógeno (Dijk y Nelson, 2000, Fravel *et al.*, 2003). Un aspecto importante de esta competencia es la colonización adecuada, que se ha relacionado con el biocontrol. En este estudio se podría señalar como una hipótesis la capacidad colonizadora de *Serratia* sp sobre las raíces y la supresión de la enfermedad, aunado a una alto potencial de esta cepa como competidora.

Por otra parte, el tratamiento 6 correspondiente al producto comercial a base de quitosano, Biorend® desempeñó un control eficiente sobre el patógeno. El efecto antimicrobiano de este biopolimero ha sido ampliamente estudiado y comprobado a través del tiempo, sin embargo, su mecanismo de acción todavía no ha sido bien dilucidado. Una de las principales razones para que el quitosano posea actividad antimicrobiana es la presencia de un grupo amino con carga positiva a pH inferior a 6.3 (carbono 2) el cual interactúa con las cargas negativas de la pared celular de los microorganismos, generando un rompimiento o lisis de estas estructuras, que lleva a la pérdida de compuestos proteicos y otros constituyentes intracelulares Rabea *et al.*, 2003 Además, el quitosano tiene propiedad quelante, lo que permite que este biopolímero se pueda ligar selectivamente a metales presentes en las estructuras externas de los microorganismos, inhibiendo así la producción de toxinas Cuero *et al.*, 1999. También se ha reportado que el quitosano puede inhibir enzimas debido a la interacción quitosano-ADN que altera la síntesis de ARN mensajero. (Valencia ,2015)

Recientemente, se han llevado a cabo varios estudios sobre la actividad antibacteriana del quitosano contra algunas bacterias como: *Xanthomonas* sp. patógena a *Euphorbia pulcherrima*, *X. axonopodis* pv. *Poinsettiicola* y *Pectobacterium carotovora* Además Algam *et al.*, reveló que el quitosano tiene fuerte actividad antibacteriana *in vitro* sobre *Ralstonia solanacearum*. (Valencia 2015)

El hadrami *et al.*, 2010 resaltan el poder del quitosano y sus derivados para actuar como potentes inductores, potenciando una batería de respuestas celulares tanto localmente alrededor de los sitios de infección como sistemáticamente para alertar a partes sanas de la planta. Estos incluyen los eventos de señalización temprana, así como la acumulación

de metabolitos relacionados con la defensa y proteínas tales como fitoalexinas y proteínas PR.

Li *et al.*, 2013 proponen que el modo de acción del quitosano es probablemente más complejo de lo inicialmente formulado, implicando una serie de eventos que pueden conducir en última instancia al proceso de muerte, no restringiéndose a una única molécula diana sino a una secuencia de eventos moleculares "no dirigidos" que tienen lugar simultáneamente o sucesivamente. Sin embargo, los mecanismos complejos por los cuales estos procesos están acoplados o interrelacionados no han sido completamente comprobados.

El tratamiento 5, compuesto en su mayoría, a base de fermentos de lactobacillus, Bioclean® alcanzó un porcentaje de biocontrol de 58,8 % este producto es utilizado como fitofortificante y actúa potenciando los mecanismos de defensa en las plantas. Las bioproteínas y los ácidos orgánicos constituyentes son elaborados por una bacteria perteneciente al género *Lactobacillus*. Los ácidos orgánicos producidos estimulan a la planta para hacer frente al estrés biótico generado por el ataque de hongos y bacterias fitopatógenos. Para efectos de este ensayo este tratamiento produjo un control medianamente eficaz, sin embargo se pudo observar en las plantas una fuerte etiolación y desprendimiento de las hojas, Toralba, 2012 y Santiago et al., 2010 en pruebas *in vitro* contra *Ralstonia solanacearum* y varias especies fúngicas, constatan el poder de los fermentos de lactobacillus como antagonista.

El tratamiento conformado por los nutrientes Foforo (P) y Potasio (K) (Phyto- Fosk®) logró un porcentaje de eficiencia de biocontrol de 41,6% el menor valor de todos los tratamientos a excepción del control. A pesar que investigaciones realizadas comprueban que el manejo nutricional de los cultivos es una herramienta útil para el control de enfermedades, no fue suficiente para evitar la infección y desarrollo de la enfermedad.

Determinación en umbráculo del efecto sobre variables biométricas de las bacterias antagonistas más promisorias *in vitro* en el control de *Ralstonia solanacearum*

Los resultados obtenidos mostraron que la mayoría de los tratamientos aumentaron el rendimiento, altura de planta, diámetro del tallo y número de hojas con respecto al testigo, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre algunos tratamientos hasta la semana 7 de medición (Cuadro 5) .*Serratia* sp fue la que indujo el mayor incremento en casi todas las variables consideradas, lo que se reflejó en un aumento del rendimiento de frutos en un 108 % con respecto al testigo (Cuadro 6) . Las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas* sp aumentaron el rendimiento en un 72% y 61% respectivamente y *Bacillus* sp 49%. En cuanto a los productos comerciales, el que tuvo mejor comportamiento fue el fertilizante foliar a Phyto Pos-K obteniendo un 67% de rendimiento mientras que Biorend y Bioclean 22% y 2% respectivamente

Cuadro 5. Comparación de respuesta de los tratamientos a variables biométricas en condiciones de umbráculo.

N° DE HOJAS		DIAMETRO DEL TALLO		LONGITUD DE PLANTA	
Tratamiento	Media	Tratamiento	Media	Tratamiento	Media
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34.4 A	<i>Serratia</i> sp	8.98 A	<i>Serratia</i> sp	44.7 A
<i>Serratia</i> sp	33.3 A	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8.96 A	Phytopos-k®	43.5 A
<i>Bacillus</i> sp	31.0 AB	Bioclean®	8.94 A	<i>Bacillus</i> sp	43.3 A
Phytopos-k®	30.2 ABC	<i>Bacillus</i> sp	8.75 AB	Biorend®	42.3 AB
Biorend®	30.0 ABC	Biorend®	8.52 AB	<i>Pseudomonas</i> sp	41.7AB
<i>Pseudomonas</i> sp	28.3 BC	<i>Pseudomonas</i> sp	8.27 AB	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41.5AB
Testigo	26. BC	Phytopos-k®	8.25AB	Testigo	37.8 BC
Bioclean®	25.9 C	Testigo	7.06 B	Bioclean®	35.8 C

Con respecto a las otras variables evaluadas se evidencio que *Pseudomonas aeruginosa* y *Serratia* sp influyeron satisfactoriamente. De manera general se observó que la aplicación de todas las cepas bacterianas logro estimular longitud de la planta, numero de hojas y grosor del tallo al compararlas con el testigo (Cuadro 6). Igualmente, los productos comerciales en su mayoría ejercieron un efecto sobre las variables medidas, pero en menor proporción con respecto a las cepas bacterianas, a excepción del producto Bioclean® que en las variables longitud de planta y numero de hojas se comportó menor que el testigo

(Cuadro 6) Variación porcentual con respecto al testigo de variables biométricas y rendimiento en umbráculo

TRATAMIENTO	DIAMETRO DEL TALLO	LONGITUD DE LA PLANTA	Nº DE HOJAS	RENDIMIENTO
<i>Pseudomonas</i> sp	8,5	3,9	6,8	61,85
Biorend®	17,5	10	11,6	22,4
<i>Bacillus</i> sp	15,8	12,4	14,9	49,1
Phyto pos-k	11,8	13,7	12,7	68
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21,1	16,3	27,1	72,3
<i>Serratia</i> sp	17	18,7	23,8	108,4
Bioclean®	14	-4,3	-4,08	2

Al respecto, Sánchez *et al.*, 2014 evaluaron el efecto de rizobacterias del género *Pseudomonas* en el cultivo de Lechuga, el experimento en invernadero evidenció que las cepas *Pseudomonas fluorescens* FR1, *Pseudomonas* sp. FR2 y UVLO27 incrementaron de manera significativa la biomasa y el desarrollo de las plantas

El aumento de masa seca, mediado por bacterias, es comúnmente reportado como una respuesta a la inoculación, lo que permite un mejor acceso de los nutrientes del suelo a la planta (Sharan y Nehra, 2011). Por otra parte, la capacidad de absorción de las raíces promovida por rizobacterias se basa en la posible conversión de los exudados radiculares en sustancias promotoras de crecimiento vegetal como auxinas y citoquininas (Cassán *et al.*, 2014). En diversos estudios, se ha encontrado que las bacterias del género *Pseudomonas* sp. poseen la propiedad de producir estas sustancias, cuya principal ventaja es inducir la iniciación radicular e incrementar la formación de raíces y pelos radiculares (Diyansah *et al.*, 2014).

Martínez *et al.*, 2013 demostraron que cepas del género *Bacillus* presentan propiedades bioquímicas y fisiológicas relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal mejorando la germinación de semillas de tomate, mientras que en las plántulas incrementaron la biomasa. En cuanto al crecimiento de las plántulas de pimentón, las cepas mostraron un efecto positivo ambas variables evaluadas.

Por otra parte, el género *Serratia* sp se ha utilizado como un promotor del crecimiento y biocontrolador en plantas, Amaresan *et al.*, 2011 evaluaron el efecto de cepas de

Serratia, *Bacillus* y *Arthorobacter* en pimentón y tomate demostrando la promoción del crecimiento en las plantas y el potencial de biocontrol. El fenómeno promotor del crecimiento es atribuible a la capacidad de los aislados de producir AIA, el AIA influye positivamente en el crecimiento y desarrollo de las raíces, aumentando así la absorción de nutrientes (Khalid et al., 2004).

Evaluación en condiciones de campo del efecto de bacterias antagonistas y productos comerciales sobre variables biométricas en el cultivo de Pimentón

Los resultados obtenidos muestran que las bacterias *Bacillus* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* spp y Bioclean® ejercieron un efecto inferior al tratamiento control (agua) en las variables longitud de plantas, número de flores, y número de frutos mientras que *Serratia*, Biorend® y Phyto Pos-K® incrementaron estos valores con respecto al testigo (Cuadro 7). Por otra parte, en contraste a los resultados previos, se evidenció un aumento por parte de todas las cepas bacterianas en el rendimiento del fruto con respecto al testigo, *Bacillus* spp incremento este valor 55% mientras que *Serratia*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Pseudomonas* spp influyeron positivamente en un 31,1%, 30,3% y 19,8% respectivamente. En cuanto a los productos comerciales se evidencio un aumento del rendimiento con valores desde 6,6% hasta 23,7%. A pesar que la mayoría de las cepas bacterianas se comportaron de manera similar, en general, hubo una respuesta positiva a la inoculación con respecto al testigo. Aunque esta mejora en las variables biométricas no fue estadísticamente significativa, los resultados muestran un mayor rendimiento para los tratamientos inoculados, lo cual puede representar una contribución importante para los productores. (Figura 7)

Cuadro 7. Variación porcentual con respecto al testigo de variables biométricas y rendimiento en umbráculo en plantas de pimentón con diferentes tratamientos

TRATAMIENTO	LONGITUD DE LA PLANTA	Nº DE FLORES	Nº DE FRUTOS	RENDIMIENTO
<i>Bacillus</i> sp	-2,7	-12,8	-17,9	55
Biorend®	1,6	6,1	4,3	6,6
<i>Pseudomonas</i> sp	-16,1	-15,9	-17,9	19,8
Bioclean®	-9,7	-11,3	-12	12,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5,8	-15,9	-8	30,3
Phyto pos-k®	6,1	9,2	16	23,7

<i>Serratia sp</i>	0,8	15,2	5,3	31,1
--------------------	-----	------	-----	------

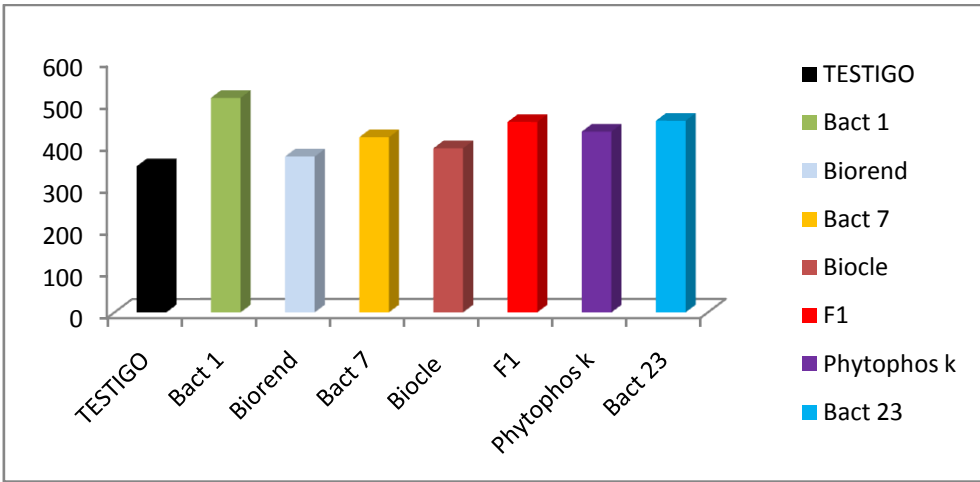


Figura 7. Efecto del rendimiento de los tratamientos sobre plantas de pimentón en campo.

Pérez, 2011 indica que el rendimiento puede ser considerado como el atributo principal para la producción de cualquier cultivo. Un factor decisivo para aumentar el rendimiento es el cuaje del fruto, este requiere de la conjunción de dos factores: un estímulo inicial que provoque el crecimiento del ovario y su capacidad de acumular metabolitos y una disponibilidad suficiente de éstos. Esta disponibilidad es crítica durante la fase de abscisión y determina el cuajado final del fruto. Es el cuajado, o amarre de frutos y no la floración el factor que determina la cosecha en los frutales.

Las auxinas y citocininas están implicadas en el amarre del fruto. Esta participación se ha demostrado utilizando inhibidores de su síntesis o su acción, además, se ha descrito que el amarre se puede aumentar mediante la aplicación de hormonas, los biofertilizantes pueden contener compuestos hormonales en su contenido, lo cual puede ayudar o influir en mayor amarre de fruto (Torres 2002).

Arikan y Pirlak 2016, evaluaron el efecto de cepas de *Bacillus* sobre el rendimiento y propiedades del fruto de fresa, aplicaciones florares incrementaron el rendimiento encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, incrementando el cuaje del fruto entre 50% y 70% pudiendo atribuir este efecto a la

capacidad de estas bacterias de estimular la producción de auxinas, citocininas y giberelinas .Davies 2004).

Para explicar la relación entre las auxinas y giberelinas en el cuaje del fruto Tiwari *et al.*, 2011 realizaron un estudio en el cultivo de pimentón reconociendo la importancia de la auxina como señal temprana, estos resultados indican que en *C. annuum*, al igual que en *Arabidopsis* y tomate, la auxina es el principal inductor actuando en parte, al inducir la biosíntesis de la giberelina. Curiosamente, la giberelina no contribuye significativamente al tamaño final del fruto, pero parece desempeñar un papel importante en la prevención de la abscisión de las flores y frutos, un factor determinante de la pérdida de producción en pimentón y un proceso fácilmente inducido por las condiciones ambientales y de crecimiento (Pressman *et al.*, 1998) . Al mismo tiempo, la giberelina junto con la auxina parece equilibrar la división y expansión celular durante el crecimiento de fruto. Tiwari *et al.*, 2011

Diversos autores han demostrado la capacidad *in vitro* de *Bacillus* de producir AIA, con la utilización de triptófano como inductor en el medio de cultivo (Ali *et al.*, 2009). Rodríguez 2013 evaluó el efecto de *Bacillus subtilis* en tomate, demostrando que la inoculación de las plantas incidió en el incremento de las longitudes del tallo y raíz, así como los pesos del tallo y la raíz. *Bacillus subtilis* ha sido reportado como promotor de crecimiento vegetal efectivo cuando ha sido inoculado en plantas de calabacín (*Cucurbita pepo*) (Maldonado *et al.*, 2008), tomate, pimentón y cebolla (*Allium cepa*) (Izzeddin y Medina, 2011),

Por otra parte, los miembros del género *Bacillus* tienen la capacidad de formar esporas bacterianas, las cuales son resistentes a condiciones de estrés y permiten la supervivencia del microorganismo (Ahemad y Kibret, 2014). Se ha demostrado que *Bacillus* se encuentra entre las bacterias con capacidad para formar biopelículas que se usan en manejos de agroecosistemas. Esta formación es importante, ya que disminuye el riesgo de susceptibilidad de las bacterias que las conforman ante condiciones medioambientales adversas. La capacidad de formar biopelículas en la superficie de la planta puede constituir una ventaja competitiva (Cairns *et al.*,2014)

Yanti *et al.*, 2017 midieron el efecto de 42 cepas aisladas de pimentón, cinco de ellas mostraron la habilidad de aumentar crecimiento y producción, incrementando la altura, número de hojas, rendimiento del fruto y disminuyendo el tiempo de floración. De

acuerdo con Nguyen y Ranamukhaarachchi (2010) aislados rizobactericos resultaron en el mayor peso en frutos de tomate y pimentón comparados con el control. El uso de rizobacterias para aumentar el rendimiento y la protección de los cultivos es un enfoque prometedor en los sistemas modernos de agricultura sostenible.

La divergencia en los resultados obtenidos en campo y umbráculo demuestra que el efecto promotor del crecimiento de estos microorganismos puede variar por múltiples razones, entre ellas, competencia por la colonización de la rizósfera y a la quimioatracción que ejercen los distintos exudados radicales producidos por las plantas que además promoverían la interacción planta-microorganismo (Kumar *et al.*, 2011). También se puede ver desfavorecida por factores abióticos que influyen en la supervivencia de los microorganismos, como la humedad del suelo, régimen de temperatura, pH, textura, O₂, disponibilidad de nutrimentos y factores bióticos como antagonismo microbiano y la competencia (Loredo – Osti *et al.*, 2004) durante el desarrollo de esta investigación hubo presencia sobre el cultivo de los patógenos *Cercospora spp*, *Alternaria spp* y al finalizar el ensayo *Xanthomonas*, lo que indica que quizás no hayan sido las condiciones óptimas durante todo el tiempo del estudio, otro factor que pudo haber repercutido en las variables medidas es la capacidad de los microorganismos de adaptarse a diferentes ecosistemas, las cepas bacterianas inoculadas en campo, (Pozo de rosas, Estado Miranada) fueron aisladas de plantas de Pimentón recolectadas en una unidad de producción ubicada en Mariara (Carabobo) esta zona es similar en condiciones climáticas al lugar donde se realizó el ensayo en umbráculo, en el que el rendimiento fue considerablemente mayor que en campo . Las temperaturas en Mariara varían de 16°C a de 30,6 °C lo que contrasta con las condiciones climáticas de Pozo de rosas, (Estado Miranda) con temperaturas que oscilan entre los 8 C° y 30 C°

Algunos mecanismos de acción realizados por las bacterias en estudio

Producción de quitinasas

Los resultados indicaron que tres de las cuatro cepas evaluadas mostraron actividad quitinolítica, (Figura 9). La bacteria *Serratia* sp, fue la que ejerció mejor efecto, al producir los mayores halos a las 72 horas de evaluación, *Pseudomas aeruginosa* y *Pseudomonas* sp también mostraron actividad quitinolítica mientras que la cepa *Bacillus* sp fue la única que no mostró crecimiento ni halo de hidrolisis. (Figura 9). La actividad quitinasa se corroboró con un cambio de color de amarillo a púrpura alrededor del inóculo sembrado, (Figura 8) esto se debe a la degradación de quitina en N-acetil glucosamina .

El sistema quitinolítico de *Serratia marcescens* ha sido ampliamente estudiado. (Kolstad, 2013) *S. marcescens* produce varias quitinasas GH18-ChiA, ChiB, ChiC1 y ChiC2, la última resultante de una modificación postraduccional de ChiC1. Estas enzimas tienen diferentes mecanismos de acción, que permiten una hidrólisis más eficiente de la quitina (Beier, 2013), (Suzuki et al., 2002). Por otra parte (Rodríguez, 2013) evaluó el efecto quitinolítico de 16 cepas bacterianas correspondiente en su mayoría al género *Bacillus*, ninguna de las cepas evaluadas tuvo efecto quitinolítico, lo cual coincide con esta investigación en la cual la cepa *Bacillus* sp fue la única con un resultado negativo.

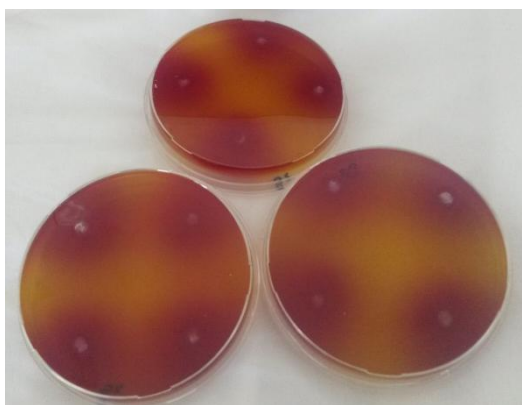


Figura 8. Producción de quitinasas, testigo positivo *Serratia marcescens*

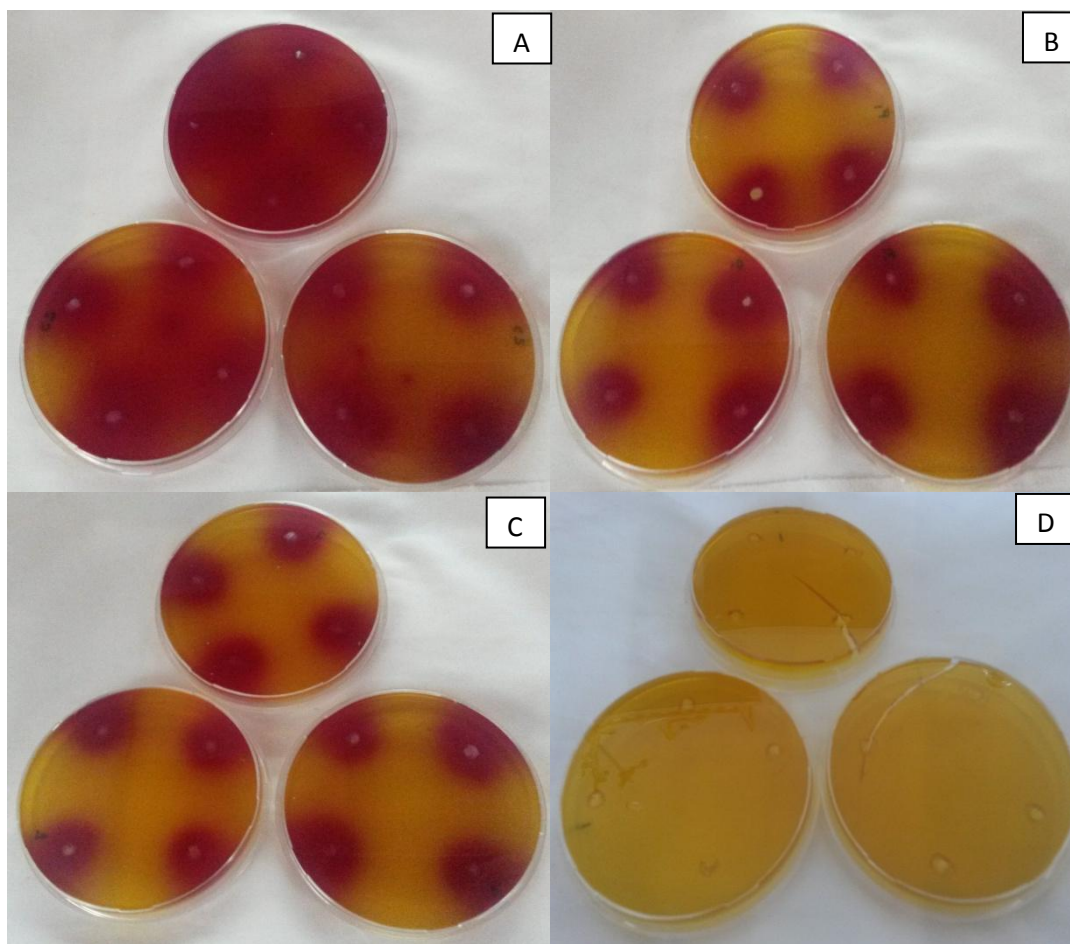


Figura 9. Halos de hidrolisis formados por la producción de quitinasas. (A) *Serratia* sp. (B) *Pseudomonas aeruginosa*. (C) *Pseudomonas* sp. (D) *Bacillus* sp.

Producción de Ácido cianhídrico (HCN).

las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas* sp fueron positivas para la producción de ácido cianhídrico obteniendo una coloración naranja-café, número tres en la escala cualitativa. Las cepas *Serratia* sp y *Bacillus* sp sembradas en el medio no produjeron cambios en la coloración del papel, lo que se considera negativa para la producción de HCN (Figura 10)

(Kundan et al., 2015) señalan que el HCN es sintetizado principalmente por especies de *Pseudomonas* y *Bacillus* actúa como un agente eficaz para el control biológico de las malezas, también puede inhibir la cadena de transporte de electrones y el suministro de energía a la célula, lo que lleva a la muerte de las mismas. Por otra parte (Jan et al., 2011) comentan que el ácido cianhídrico producido por la *P. aeruginosa* es un

compuesto muy importante involucrado en el efecto antagonista de inhibición del crecimiento micelial de hongos fitopatógenos.

(Deshwal y Kumar, 2013) indican que bacterias como *Pseudomonas* ejercen beneficios sobre la planta por la producción de metabolitos como HCN. De igual manera Kamei *et al.*, 2014 señalan que este metabolito secundario puede conferir una estrategia de biocontrol y es comúnmente producido por bacterias del género *Pseudomonas* lo cual concuerda con los resultados de esta investigación en el que solo las bacterias de este género mostraron resultados positivos a la producción de HCN.

Por otra parte, se han realizados investigaciones en las que se rechaza la hipótesis del HCN como biocontrolador, no obstante puede regular la disponibilidad del fosfato. Uno de los estudios iniciales sobre *Pseudomonas* productoras de HCN, concluyó que el HCN podría ser tóxico para patógenos de plantas (Voisard *et al.*, 1989), sin embargo, estos experimentos no excluyen la actividad de otros compuestos antimicrobianos producidos por estas bacterias. Pal *et al.*, (2000) concluyeron que el HCN era un agente de control biológico poco efectivo y que los productos bacterianos, como los pigmentos y los antibióticos, eran mucho más eficaces contra los patógenos fúngicos

Rijavec y Laspanje (2016) formularon una hipótesis en la que la función ecológica del HCN se basa en la liberación de elementos del sustrato mineral. Estudios recientes sobre la meteorización mineral en ambientes naturales (Frey *et al.*, 2010; Lapanje *et al.*, 2012; Wongfun *et al.*, 2014) indican que las bacterias productoras de HCN pueden promover la movilización de elementos de minerales formadores de rocas. Llegando a la conclusión que, al afectar la solubilidad de estos elementos, el HCN indirectamente también puede interferir con la disponibilidad de fósforo.

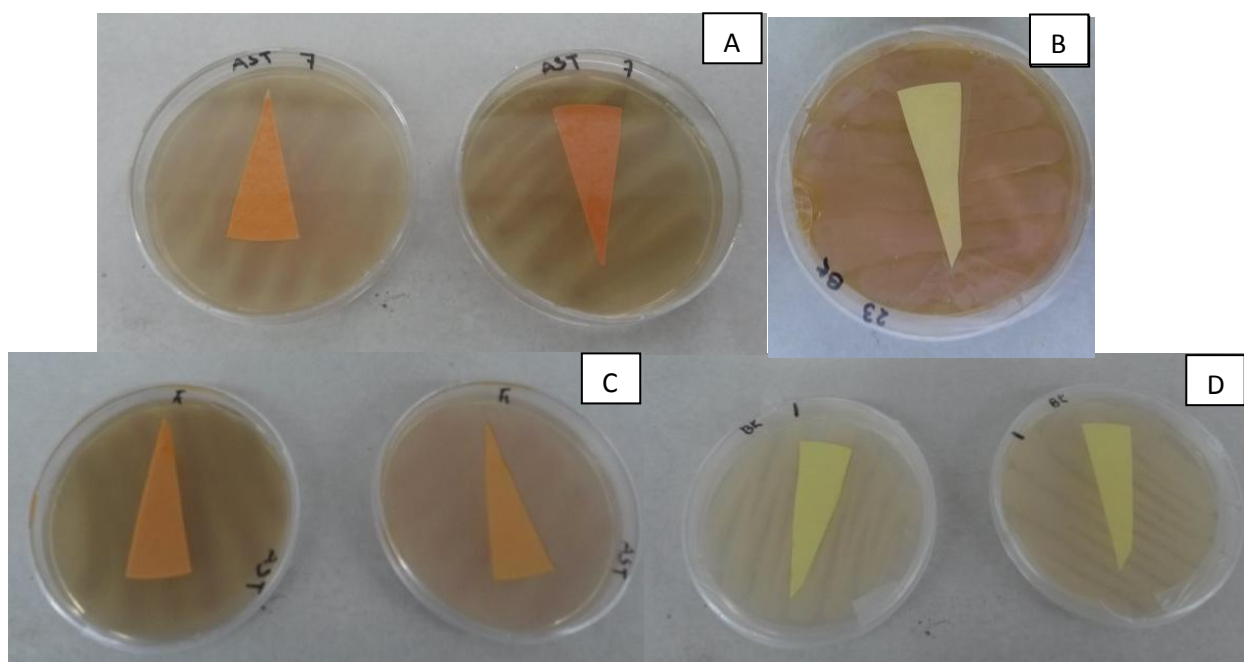


Figura 10. Cambio de color del papel Whatman debido a la producción de HCN Figuras(A y C). (A) *Pseudomonas* sp. (B) *Serratia* sp. (C) *Pseudomonas aeruginosa*. (D) *Bacillus* sp.

Solubilización de fosfato

Las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas* sp mostraron capacidad solubilizadora de fosfato en el medio tricálcico (Figura 11) con índices de 7,75 y 6,18 mm respectivamente considerándose “altas solubilizadoras ” (Cuadro 8) .La relación del halo y el índice de solubilización indica procesos de producción de fosfatasas, fitasas y ácidos orgánicos, así como la acidificación del medio dada por la disminución del pH (Rodríguez *et al* ., 2012) Por otra parte las bacterias *Serratia* sp y *Bacillus* sp no mostraron efecto solubilizador en el medio . Deshwal *et al* (2011) encontraron que cepas de *Pseudomonas* mejoraron el crecimiento de plantas en cultivo de soya. Billah y Bano (2015), en un ensayo de compostaje, reportaron incrementos de hasta 40% en la cantidad de P disponible cuando el compost fue inoculado con una cepa de *Pseudomonas* sp.

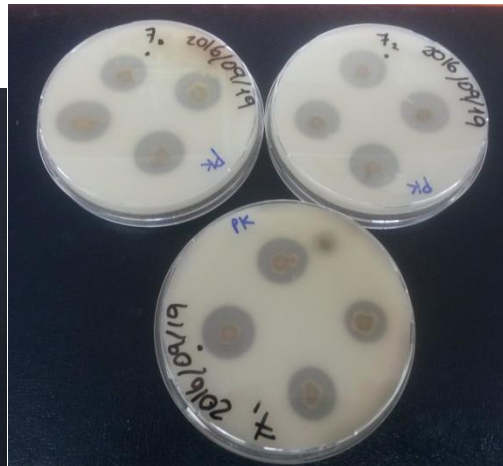
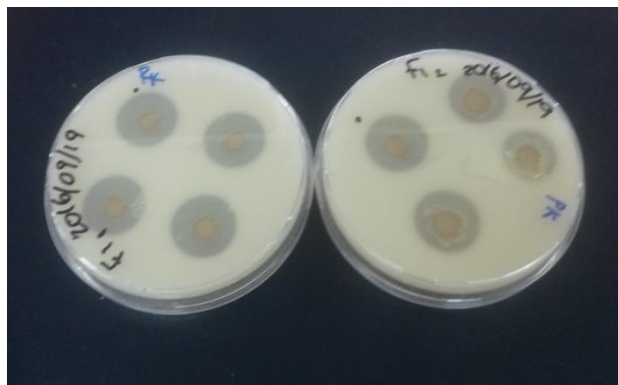


Figura 11 A. . Halos de solubilizacion de fosfato .(A) *Pseudomonas aeruginosa*. (B) *Pseudomonas* sp.

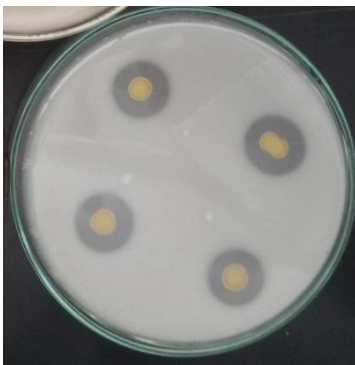


Figura 11. Halos de solubilizacion de fosfato. Testigo positivo *Pseudomonas aeruginosa* cepa "B"

Corrales *et al.*, 2014 demostraron el efecto solubilizador de 11 cepas de *Bacillus*, que mostraron diferentes índices de solubilización, los autores comentan que la ausencia o halos de solubilización pequeños en el medio de cultivo Pikovskaya no indica necesariamente que el microorganismo no posea esta capacidad; los sitios de aislamiento y el ambiente donde se encuentran las bacterias también influye en su capacidad solubilizadora, ya que existen mecanismos inductores o de represión genética reguladas por la disponibilidad de fósforo.

La solubilización de fosfato inorgánico es uno de los principales mecanismos de promoción del crecimiento por bacterias asociadas a las plantas. En la rizosfera, las bacterias secretan ácidos orgánicos que dan como resultado la solubilización del fosfato a partir de complejos insolubles, lo que lo hace disponible para la absorción de las plantas (Richardson *et al.*, 2009). Uno de los mecanismos de solubilización de fosfato

más importantes en bacterias es la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular que da como resultado la acidificación del suelo o los medios (Puente *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2014). Estos ácidos orgánicos pueden quelar el catión unido al fosfato con sus grupos hidroxilo y carboxilo (Kpombrekou y Tabatabai, 1994)

Según Chen *et al.*, 2006 la producción de ácidos orgánicos es el mejor mecanismo para la solubilización del fosfato, debido a que estos acidifican la célula microbiana y la periferia permitiendo la liberación del fosfato mediante la quelación de los cationes unidos a éste por el grupo hidroxilo y carboxilo presentes en los ácidos orgánicos entre ellos ácido fórmico, cítrico, oxálico, acético, propiónico, láctico, gluconico, fumárico y succínico. Zadeh *et al.*, (2010) observaron una relación proporcional entre pH ácidos y la solubilización del fosfato entre cepas de *Pseudomonas sp.* en cultivos de 8 días en medio líquido Pikovskaya.

Cuadro 8. Tamaño de los halos e índice de solubilización a las 72 horas en medio Pikovskaya

Especie	Medida d halos a las 72 horas	Índice de solubilizacion
<i>Pseudomonas sp.</i>	4,71875	7,75560897
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5,28125	6,1889808
<i>Serratia sp.</i>	0	0
<i>Bacillus sp.</i>	0	0

Producción de sideróforos

Los resultados indicaron que las bacterias *Bacillus sp*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas sp.* mostraron una respuesta positiva para la producción de sideroforos a las 48 horas de medición (Figura 12) que se pudo observar mediante la formación de un halo amarillo- naranja alrededor de la colonia, el cromo azurol sulfonato (CAS) tiene la capacidad de formar un complejo con el hierro con un color azul a pH cercano a 5.6 cuando la bacteria crece sobre el medio CAS, la disponibilidad de Fe disminuye drásticamente debido a que la mayor parte se encuentra quelado al CAS. La bacteria toma el Fe sintetizando éstas moléculas denominadas sideróforos los cuales tienen mayor afinidad por el Fe que el mismo CAS, cuando el complejo se disocia se genera un cambio en la coloración del medio de cultivo el cual es indicativo de la capacidad bacteriana para sintetizar sideróforos (Sanchez, 2011) Las bacterias del género

Pseudomonas mostraron cualitativamente mayor producción de sideroforos al presentar halos de mayor tamaño, seguida por *Bacillus*. La cepa *Serratia* sp. no presento cambios en el medio CAS a las 48 horas, resultando negativo para esta prueba (Figura 12)

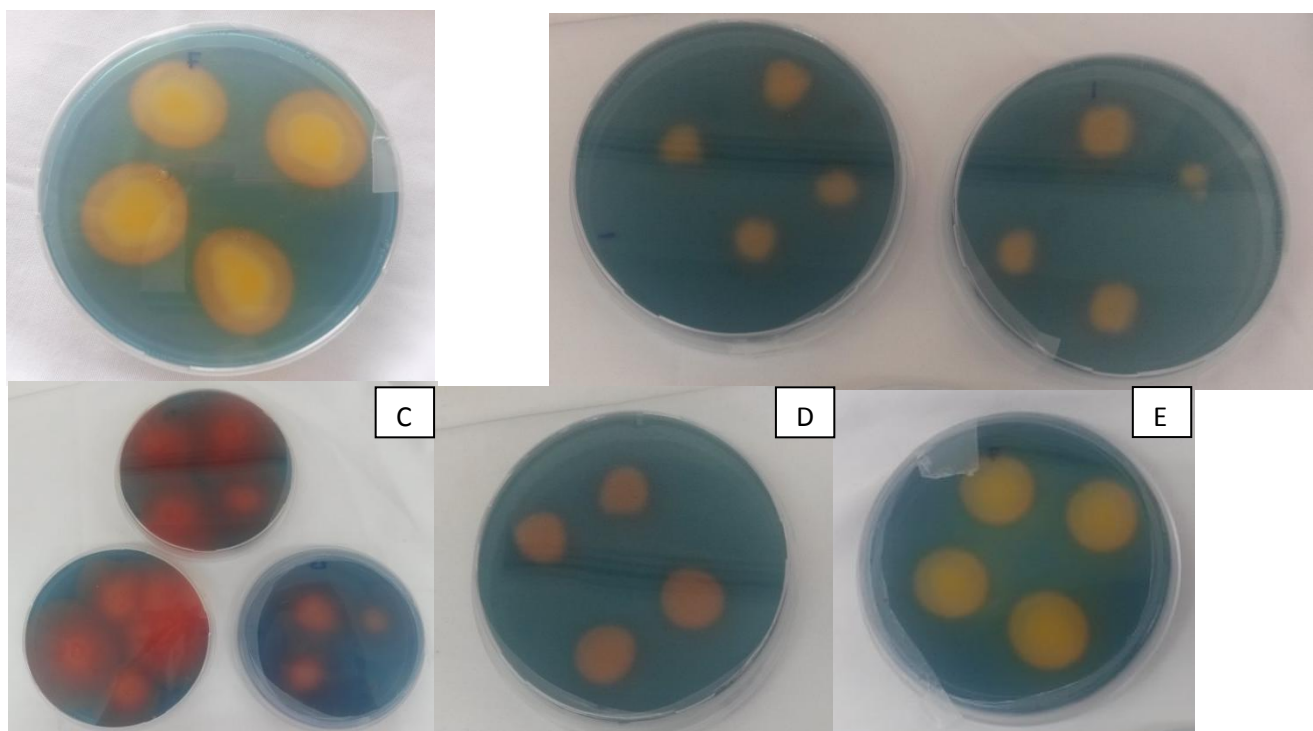


Figura 12. Producción de sideroforo (A) *Pseudomonas* sp. (B) *Bacillus* sp. (C) *Serratia* sp. (D) Testigo positivo cepa 2321. (E) *Pseudomonas aeruginosa*. Observe la formación de colonias amarillo-naranja que indican la producción de sideroforos.

Según Goswami y colaboradores 2016, la mayor proporción de bacterias productoras de sideróforos generalmente pertenecen al género *Pseudomonas*, siendo las especies más estudiadas *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas aeruginosa*, que liberan los sideroforos del tipo piobelina y pioverdina (Haas y Défago, 2005). Estas bacterias actúan mejorando la cantidad de hierro en la planta, inhibiendo el crecimiento de otros microorganismos con la liberación de antibióticos, y obstaculizando el crecimiento de patógenos al limitar el hierro disponible, generalmente hongos, que no pueden absorber el complejo hierro-sideróforo (Shen, Hu, Peng, Wang, y Zhang, 2013)

Este tipo de mecanismos ha sido utilizado como biocontrol, Sasirekha *et al.*, 2016 aislaron una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* y evaluaron la capacidad de producir sideroforos dando positiva en el medio CAS. Al probar su actividad antagonista *in vitro* contra *Rhizoctonia solani* y *Colletotrichum gloeosporioides* en medio B de King con

presencia y ausencia de FeCl₃, se observó una reducción significativa en el crecimiento de *R. solani* con la suplementación de FeCl₃ en comparación con el control (sin FeCl₃), lo que sugiere papel del antagonismo mediado por sideróforos. La actividad antifúngica no fue influenciada por FeCl₃ en el caso de *C. gloeosporioides*, sugiriendo la presencia de otros mecanismos antagónicos.

Cuadro 9. Actividad PGPB de las cepas bacterianas

	<i>Serratia sp</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas sp</i>	<i>Bacillus sp</i>
Produccion de AIA				
Solubilizacion de fosfatos	-	+	+	-
Produccion de sideroforos	-	+	+	+
HCN	-	+	+	-
Produccion de quitinasas	+	+	+	-

Mediante los resultados obtenidos y como se puede observar en el cuadro 9 las bacterias evaluadas en los diferentes medios poseen algunos mecanismos de acción que les confieren la capacidad de estimular crecimiento en plantas además de características propias de microorganismos biocontroladores; como es el caso de la producción de sideroforos realizada principalmente por las dos bacterias del género *Pseudomonas*. *Serratia sp* y *Pseudomonas* produjeron enzimas líticas como quitinasas relacionadas principalmente con el biocontrol de patógenos fúngicos. Por otra parte las cepas del género *Pseudomonas* fueron las únicas capaces de producir HCN se demostró la capacidad de las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas sp* como las únicas solubilizadoras de fosfato también la capacidad de biosintetizar sustancias promotoras de crecimiento, como las auxinas dando positivas las bacterias las bacterias XX, FFF Y KKDJ.

Identificación molecular de los microorganismos

Los resultados de análisis moleculares arrojaron que las cepas R1 y R23 pertenecen a los géneros *Bacillus sp.* y *Serratia sp.* con un porcentaje de similitud de 99 % (Cuadro

10) al ser comparadas con la base de datos del genbank. En el estudio de las cepas R7 Y F1, la comparación de las secuencias obtenidas indicó que los microorganismos pertenecen al género *Pseudomonas*, la secuenciación de los fragmentos evidenció un 99 a 100% de similitud con este género de esta manera fue posible la inferencia taxonómica, aunque para la cepa F1 se pudo plantear la hipótesis de identidad a nivel de especie identificándose como *Pseudomonas aeruginosa*. Se logró visualizar las bandas después de la amplificación mediante la electroforesis en gel de agarosa. (Figura 13)

Cuadro 10. Secuencias de las cepas con bases de datos NBI

Cepas Bacterianas	Descripción	% de de género
R1	<i>Bacillus</i> sp.	99
R23	<i>Serratia</i> sp.	99
R7	<i>Pseudomonas</i> sp	99
F1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100

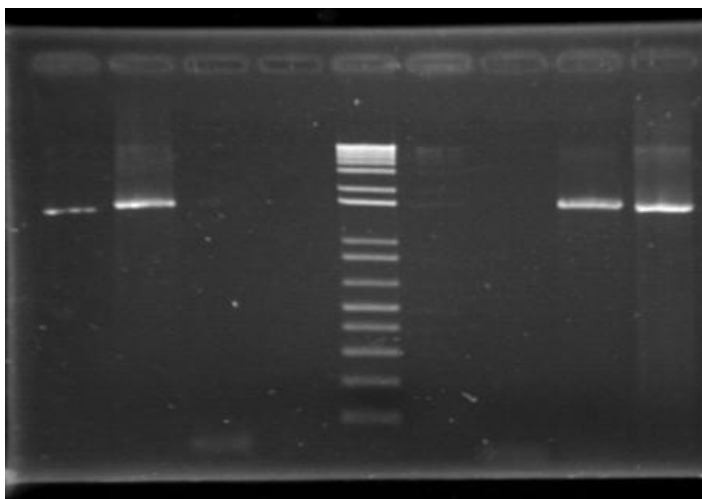


Figura 13. Amplificación del gen ADNr 16S. Línea 1 cepa R1. Línea 2: Cepa R23, Línea 5: Marcador de peso molecular 100pb, Línea 8: Cepa R7, Línea 9: Cepa F1

En relación con las bacterias identificadas Kumar *et al.*, 2015, Goswami *et al.*, 2016, Kundan *et al.*, 2015 mencionan que los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Serratia* presentan características de PGPR. Las bacterias del género *Pseudomonas* están

distribuidas ampliamente en suelos agrícolas y sus propiedades han sido discutidas siendo una de las PGPR más promisorias por la capacidad de presentar diferentes mecanismos de acción. Las cepas de *Pseudomonas* son capaces de solubilizar fósforo y aumentar su disponibilidad a las plantas Oteino *et al.*, 2015. Algunas cepas pueden producir sideróforos que presentan una alta afinidad para la absorción del hierro B. Sasirekha *et al.*, 2016 estos compuestos son capaces de aliviar los efectos negativos de los patógenos sobre las plantas.

Por otra parte, las cepas del género *Bacillus*, son unas de las más abundantes en la rizósfera, y su actividad PGPR ha sido estudiada por la alta capacidad de sintetizar metabolitos, que afectan fuertemente el ambiente, al aumentar la disponibilidad de nutrientes en las plantas. Especies de *Bacillus* han sido utilizadas como biofertilizantes proporcionando efectos directos en el crecimiento debido a la producción de hormonas (Rojas *et al.*, 2013) capacidad de Solubilización de fósforo (Sivasakthi *et al.*, 2014), y aumentar la eficiencia en la fijación de nitrógeno, entre otros. También es conocida por su actividad como biocontroladora, diferentes mecanismos se han discutido en este contexto, entre ellos, la producción de compuestos antimicrobianos ("antibióticos"), antivirales y nematocidas, también la estimulación de la resistencia sistémica inducida por plantas (ISR, Doornbos *et al.*, 2012) (Erlacher *et al.*, 2014).

La cepa R23 fue identificada como *Serratia* sp, a estos microorganismos se les han atribuido propiedades con potencial biocontrolador, principalmente por la producción de quitinasas (Wang *et al.*, 2013) (Veliz *et al.*, 2017) por otra parte también es conocido su rol en la promoción de crecimiento debido a la capacidad de algunas cepas como *Serratia marcescens* de producir amoníaco, ácido indolacético, solubilizar fosfato entre otras (Devi *et al.*, 2016)

Caracterización bioquímica y fisiológica de las cepas bacterianas

Las pruebas bioquímicas y fisiológicas formaron parte de una herramienta más para la identificación de las bacterias, los resultados obtenidos coincidieron con la identificación molecular

Cuadro 11. Características fisiológicas y bioquímicas de las cepas bacterianas antagonistas a *Ralstonia solanacearum* Mill

Pruebas culturales, fisiológicas y bioquímicas	Cepas Bacteria			
	<i>Serratia</i> sp	<i>Pseudomonas</i> sp	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	<i>Bacillus</i> sp
KOH al 3%	+	+	+	-
Requerimiento de Oxígeno	Aeróbica	Anaeróbica facultativa	Anaeróbica facultativa	Aeróbica
Oxidasa	+	+	+	-
Catalasa	+	+	+	+
Fluorescencia en BK	-	+	+	-
Tween 80	+	+	+	+
Levan	-	-	-	-
Hidrólisis de almidón	-	-	-	+
Licuefacción de gelatina	+	+	+	+
Producción de H ₂ S	+	-	-	-
Crecimiento a NaCl 7%	+			
Crecimiento a NaCl 10%	+	+	+	+
Acido a partir de:				
Lactosa	+			+
Sorbitol	+	-	-	-
Xylosa	+	+	+	+
Sucrosa	+	-	-	+
Arabinosa	+	-	-	+
Trehalosa	+	-	-	+
Celobiosa	+	-	-	+
				+

Las características fisiológicas y bioquímicas de las cepas R7 y F1 identificadas como *Pseudomonas* sp y *Pseudomona aeruginosa* fueron positivas para las pruebas: fluorescencia en medio B de King, KOH, oxidasa, licuefacción de la gelatina y crecimiento a NaCl 7%, con respecto a hidrolisis del almidón dio negativa, y no produjeron ácidos a partir de los carbohidratos: Sorbitol, sucrosa, arabinosa, trehalosa y celobiosa y crecimiento a 41°C (Cuadro 11). Mediante los resultados obtenidos y coincidiendo con lo señalado por Schaad *et al.*, (2001) y Bergey 1989 se puede inferir que la cepa R7 es *Pseudomonas aeruginosa*.

La bacteria R1 fue positiva para las pruebas diferenciales de; hidrolisis de almidón, crecimiento en NaCl al 7% y producción de ácidos a partir de arabinosa y Xylosa, (Cuadro 11) lo cual concuerda con lo descrito por Bergey 1989 y Schaad *et al.*, (2001)

en el género *Bacillus*, sin embargo, los resultados obtenidos no fueron suficiente para llegar a especie. Con respecto a la bacteria R23 identificada como *Serratiasp* presentó características fisiológicas y bioquímicas que coinciden con el género como; crecimiento en tween 80, en NaCl al 7% y 10% y producción de ácidos a partir de Sucrosa, lactosa, xylosa, arabinosa y sorbitol (Cuadro 11) no obstante no fue posible llegar a la especie

Conclusiones

1. Se aisló una diversa cantidad de microorganismos bacterianos provenientes de la rizosfera y filoplano de plantas de pimentón.
2. Las cepas más promisorias *in vitro* fueron las bacterias denominadas R7, R8, R1, R23 aisladas de la rizosfera y F1, F2 y F21 aisladas del filoplano
3. Mediante métodos moleculares y pruebas bioquímicas se identificaron los microorganismos más eficientes en las pruebas *in vitro*. Se encontró que las cepas R7 pertenece al género *Pseudomonas* sp, F1a *Pseudomonas aeruginosa*, R1 a *Bacillus* sp y R23 a *Serratia* sp.
4. Los tratamientos conformados por *Serratia* sp (T6) y Biorend® (T2) mostraron los mejores resultados de biocontrol *in vivo*
5. *Serratia* sp y *Pseudomonas* indujeron el mayor incremento del rendimiento con respecto al testigo en condiciones de umbráculo.
6. Las cepas bacterianas, especialmente *Bacillus* spp incrementaron el rendimiento en campo con respecto al testigo, sin embargo en menor proporción al ensayo realizado en umbráculo
7. Las bacterias solubilizadoras de fosfatos, productoras de HCN y de sideróforos más eficientes fueron las del género *Pseudomonas* sp.
8. La bacteria con mayor potencial quitinolítico fue *Serratia* sp
9. Los protocolos utilizados permitieron demostrar el potencial de los microorganismos para ser usados como biocontroladores y biofertilizantes y la efectividad que puedan tener sobre el biocontrol, nutrición y el crecimiento de las plantas de pimentón.

Recomendaciones

Realizar ensayos de biocontrol en zonas productoras de Tomate y Pimentón con presencia de *Ralstonia solanacearum*.

Evaluar el efecto en umbráculo y campo de un consorcio bacteriano conformado por las bacterias *Serratia* sp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus* sp y *Pseudomonas* sp.

Se sugiere hacer una comparación de los microorganismos con respecto a diversos tratamientos en los que se haga aplicación de abonos químicos y determinar en qué proporción pueden ser reemplazados los agroquímicos cuando se hacen inoculaciones con las cepas bacterianas

Utilizar primers específicos para cada genero con el fin de lograr una identificación molecular másprecisa.

Evaluar la versatilidad *in vitro* e *in vivo* de las PGPB(Bacterias promotoras de crecimiento en plantas) con diferentes patógenos de importancia económica .

Referencias bibliográficas.

Abo-Elyousr KAM, Ibrahim YE, Balabel NM. Induction of disease defensive enzymes in response to treatment with acibenzolar-S-methyl (ASM) and *Pseudomonas fluorescens* Pf2 and inoculation with *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2 (phylotype II) J Phytopathol. 2012;160:382–389. doi: 10.1111/j.1439-0434.2012.01915.x.

Agrawal T, Kotasthane A. Chitinolytic assay of indigenous Trichoderma isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. Springerplus. 2012; 73(1): 2-3.

Aguilar-Piedras J, Xique-Vásquez M, García S, Baca BE (2008) Producción del ácido indol-3-acético en *Azospirillum*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 50: 29-37.

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, ISSN: 1018-3647, DOI: 10.1016/j.jksus.2013.05.001

Albareda M, Dardanelli MS, Sousa C, Megías M, Temprano F, Rodríguez-Navarro D (2006) Factors affecting the attachment of rhizospheric bacteria to bean and soybean roots. *FEMS Microbiol. Lett.* 259: 67-73.

Aldon D, Brito B, Boucher C, Genin S. A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. *EMBO J.* 2000;19:2304–2314. [[PubMed](#)] [

Ali, B., Sabri, A. N., Ljung, K. & Hasnain, S. 2009. “Quantification of indole-3-acetic acid from plant associated *Bacillus* spp. and their phytostimulatory effect on *Vigna radiata* (L.)”. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(3): 519–526, ISSN: 0959-3993, 1573-0972, DOI: 10.1007/s11274-008-9918-9

Allen, C., Huang, Y., y Sequeira, L. 1991. Cloning of genes affecting Polygalacturonase production in *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4: 147-154

Álvarez MB. Biology of *Ralstonia solanacearum* Phylotype II in host and non-host environments. (PhD Thesis), Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Valencia, España. 2009.

Amaresan, Natarajan & Velusamy Jayakumar & Krishna Kumar & Nooruddin Thajuddin .2011. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria and their effect on tomato (*Lycopersicon esculentum*) and chilli (*Capsicum annum*) seedling growth. *Ann Microbiol* (2012) 62:805–810 DOI 10.1007/s13213-011-0321-7

Antoun H and Kloepper JW (2001) Plant growth promoting rhizo-bacteria. In: Brenner S and Miller JH (eds) *Encyclopedia of Genetics*. Academic, New York, pp 1477-1480.

APHIS-PPQ. 2004. Minimum sanitation protocols for offshore geranium cutting production. 27 p. Published Dec., 1. USDA, APHIS, PPQ. Pest Detection and Management Programs, Riverdale, M. D.

Arauz, L. 1998. Fitopatología un Enfoque Agroecológico. San José de Costa Rica. pp 90- 110.

Asaka O, Shoda M. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-Off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14. Applied and Environmental Microbiology 1996; 62 (11): 4081–4085

Aslantas R, Karakurt H, Kose M, Ozkan G, Cakmakci R (2009) Bazı bakteri ırklarının çilekte fide üretimine etkileri. III. Ulusal Üzümsü Meyveler Sempozyumu Kahramanmaraş, pp. 50–58

astric PA (1977) Glycine metabolism by *Pseudomonas aeruginosa* : hydrogen cyanide biosynthesis. J Bacteriol 130:826–831

B. LI 1,* , C.L. SHAN1 , M.Y. GE 1 , L. WANG1 , Y. FANG2 , Y.L. WANG3,* , G.L. XIE1 and G.C. SUN3,* 2013. Antibacterial Mechanism of Chitosan and its Applications in Protection of Plant from Bacterial Disease. Asian Journal of Chemistry; Vol. 25, No. 18 . 10033-10036

B.R. Glick Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications Hindawi Publishing Corporation, Scientifica (2012).

Baehler E, Bottiglieri M, Tarr M, Maurhofer M, Keel C. Green fluorescent protein-based reporters to monitor balanced production of antifungal compounds in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Journal of Applied Microbiology 2005; 99 (1): 24–38.

Bakthavatchalu sasirekha^a y shivakumar srividya. 2016. siderophore production by *pseudomonas aeruginosa* fp6, a biocontrol strain for *rhizoctonia solani* and *colletotrichum gloeosporioides* causing diseases in chilli. agriculture and natural resources volume 50, issue 4, july 2016, pages 250-256

Barbosa da Silveira, Elineide; Michereff, Sami Jorge; Andrade Tavares, Luciana; Ramos Marian Caracterización de aislamientos de *Ralstonia solanacearum* con base en componentes Epidemiológicos. Interciencia, vol. 36, núm.4, abril, 2011, pp. 281-285.

BEATTIE, G.A.; LINDOW, S.E. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. Phytopathology, v.89, p.353-359, 1999.

Beier S, Bertilsson S (2013) Bacterial chitin degradation—mechanisms and ecophysiological strategies. Front Microbiol 4: 149

Bhattacharyya PN, Jha DK (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. World J. Microbiol. Biotechnol. 28: 1327-50.

Billah, M., Bano, A. (2015) Role of plant growth promoting rhizobacteria in modulating the efficiency of poultry litter composting with rock phosphate and its effect on growth and yield of wheat. Waste Manage. Res. 33, 63–72.

Blumer, C., y D. Haas, 2000. “Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis”. Arch. Microbiol., 173: 170-177.

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. J Exp Bot 62: 595-603

Bosland, P. W. ;VOTAVA, E. (2000). Peppers: vegetable and spice Capsicums. CAB International, p.204 .

BROWN, D. 2010. A mathematical model of the Gac/ Rsm quorum sensing network in Pseudomonas fluorescens. Biosystems. 101:200-212.

Cairns, L. S., Hobley, L. & Stanley-Wall, N. R. 2014. "Bio±lm formation by Bacillus subtilis: new insights into regulatory strategies and assembly mechanisms". Molecular Microbiology, 93(4): 587–598, ISSN: 0950-382X, DOI: 10.1111/ mmi.12697

Cassán, F.; Vanderleyden, J.; Spaepen, S. 2014. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus Azospirillum. Journal of Plant Growth Regulation. 33(2): 440-459.

Champoiseau PG, Jones JB and Allen C. 2009. Ralstonia solanacearum race 3 biovar 2 causes tropical losses and temperate anxieties. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2009-0313-01-RV.

Champoiseau, P. G., Jones, J. B., Momol, T. M., Pingsheng, J., Allen, C., Norman, D. J., ... Caldwell, K. (2010). Ralstonia solanacearum Race 3 biovar 2 causing brown rot of potato, bacterial wilt of tomato and southern wilt of geranium [Online]. Available at http://plantpath.ifas.ufl.edu/rsol/NRI_Project/Projectssummary.html (Accessed 25 June 2010), American Phytopathological Society. Madison, WI.

Chen, Y., Rekha, P., Arunshen A. , Lai, W. and Young, C. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Appl. Soil Ecol. 34:33-41.

Compant S, Reiter B, Sessitsch A, Nowak J, Clément C, Barka EA. Endophytic colonization of Vitis vinifera L. by plant growthpromoting bacterium Burkholderia sp. strain PsJN. 2005b. Applied and Environmental Microbiology 71(4):1685-93.

Coutinho, T. A. 2005. Introduction and prospectus on the survival of *R. solanacearum*. Pages 29-38 in: Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. Allen, C., Prior, P., and Hayward, A. C., eds. APS press, St. Paul, M. N.

crop pests *Phil. Trans. R. Soc. B* 2014 **369**.

Cuero, R.G.; Osuji, G.; Washington, A. (1991). Ncarboxymethylchitosan inhibition of aflatoxin production: role of zink. Biotechnology Letters. 13, 441-444

Cunnac S, Occhialini A, Barberis P, Boucher C, Genin S (2004) Inventory and functional analysis of the large Hrp regulon in *Ralstonia solanacearum*: identification of novel effector proteins translocated to plant host cells through the type III secretion system. *Mol Microbiol* **53**: 115–128

Davies PJ (2004) The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In: Davies PJ (ed) Plant hormones. Biosynthesis, signal transduction, action. Kluwer, Dordrecht, pp 1–15

De La Cruz J, Hidalgo-Gallego A., Lora JM, Benitez T, Pintor-Toro JA, Liobell A. (1992). Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. *European Journal of Biochemistry*, 206:859-867

Denny TP and Hayward AC. 2001. Gram-negative bacteria. Pp:151-173. *In*: Schaad NW, Jones JB and Chun W (eds.). *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. American Phytopathological Society. St Paul, MN, USA. 398p.

Denny TP. 2006. Plant pathogenic *Ralstonia* species. Pp:573-644. *In*: Gnanamanickam SS (ed.). *Plant-Associated Bacteria*. Springer. Printed in the Netherlands. 710p

Deshwal VK and Kumar P, 2013. Production of Plant growth promoting substance by Pseudomonads. *Journal of Academia and Industrial Research*. Volume 2, Issue 4.

Deshwal, V.K. 2012. *Pseudomonas aeruginosa* as biological control agent against plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Int. J. Plant, Animal Env. Sci.* 2(1): 14-17.

Dey R, Pal KK, Tilak KVBR. Plant growth promoting rhizobacteria in crop protection and challenges. *In*: Goyal A, Manoharachary C, editors. *Future challenges in crop protection against fungal pathogens, fungal biology*. Springer; New York, NY, USA: 2014. pp. 31–58.

Dijk, K.V., Nelson, E.B., 2000. Fatty acid competition as a mechanism by which *Enterobacter cloacae* suppresses *Pythium ultimum* sporangium germination and damping-off. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5340–5347

Dinesh Singh^{1*}, Dhananjay Kumar Yadav¹, Garima Chaudhary¹, Virendra Singh Rana² and Raj Kumar Sharma. 2016. Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* for Biocontrol of Bacterial Wilt of Tomato Incited by *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*

Dipanwita Saha^{1,*}, Gargi Dhar Purkayastha¹ and Aniruddha Saha². 2012. Biological Control of Plant Diseases by *Serratia* Species: A Review or a Case Study. *Frontiers on Recent Developments in Plant Science* Vol. 1, 2012, 99-115

Diyansah, B.; Aini, L; Hadiastono, T. 2014. The effect of PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* On Leaf Mustard Plant (*Brassica juncea* L.) Infected by TuMV (*Turnip Mosaic Virus*). *Journal of Tropical Plant Protection*. 1(1): 30-38.

Do Carmo FL, dos Santos HF, Martins EF, Van Elsas JD, Rosado AS, Peixoto RS (2011) Bacterial structure and characterization of plant growth promoting and oil degrading bacteria from the rhizospheres of mangrove plants. *J. Microbiol.* 49: 535-43.

Dobbelaere S, Vanderleyden J and Okon Y (2003) Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *CRC Crit Rev Plant Sci* 22:107-149.

El Hadrami, Abdelbasset Lorne R. Adam, Ismail El Hadrami, and Fouad Daayf. *Mar Drugs*. Chitosan in Plant Protection 2010; 8(4): 968–987. Published online 2010 Mar 30. Doi

Elphinstone JG. 2005. The current bacterial wilt situation: A global view. Pp:9-28. *In*: Allen C, Prior P and Hayward AC (eds.). *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia*

solanacearum Species Complex. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. 528p

Fibach-Paldi S, Burdman S, Okon Y (2012) Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* 326: 99-108.

Fravel, D., Olivain, C., Alabouvette, C., 2003. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytol.* 157, 493–502

Glick, B.R., Jacobson, C.B., Schwarze, M.M.K. and Pasternak, J.J. (1994) 1-Aminocyclopropae-1-carboxylic acid deaminase play a role on plant growth by *Pseudomonas putida* GR12-2, in *Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria* (eds M.H. Ryder, P.M. Stephens and G.D. Bowen), CSIRO, Adelaide, pp. 150–152.

Goto, M. 1990. *Fundamentals of bacterial plant pathology*. Academic Press. New York. 341pp.

Gotuzzo, E. A. 1975. Bacterias.p 3-360. In Fernandez Valiela (Eds) *Introducción a la Fitopatología*. Vol II. Colección Científica del INTA, Buenos Aires, Argentina.

Gray EJ and Smith DL (2005) Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biol Biochem* 37:395-412.

Haas, D., Défago, G., 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology* 3, 307e319.

hapingo Serie Horticultura. 14 (1). Pp. 55-59.

Hayward AC, 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* 29, 65–87.

Hayward, A.C 1983. *Pseudomonas*: the non-fluorescent *Pseudomonas* In: *Plant Bacterial Diseases. A diagnostic guide*. P.C. Fahy and G.J. Perly. (Eds). Academic Press. Sydney pp107-140.

Hernandez, E. 2013. Identificación, caracterización y evaluación de rizobacterias para el control de hongos fitopatógenos de semillas de *Jatropha curcas* L. Instituto politécnico nacional. Centro de desarrollo de productos bióticos. Mexico

Holt, J. Krieg, N. Sneath, P. Staley, J. Williams, S. 1994. *Bergey's Manual of*. Editorial Williams y Wilkins. 786pp.

Hoster F, Schmitz JE, Daniel R. (2005). Enrichment of chitinolytic microorganisms: Isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66:434–442

Huang, Q., y Allen, C. 1997. A nexo-poly- α -D-galacturonosidase, PehB, is required for wildtype virulence in *Ralstonia solanacearum*. *J. Bacteriol.* 179:7369-7378.

Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., Nasser, W., y Reverchon, S. 1996. Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annu Rev Microbiol.*; 50:213–257

Husain, A., y Kelman , A.1958. The role of pectic and cellulolytic enzymes in pathogenesis by *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 48: 377-386.

Idris H, Labuschagne N, Korsten L. Screening rizobacteria for biological control of Fusarium root and crown rot of sorghum in Ethiopia. *Biological control* 2007; 40 (1): 97-106.

Izzeddin N., Medina L. (2011). Efecto del control biológico por antagonistas sobre fitopatógenos en vegetales de consumo humano. *Salus online. Antagonistas y fitopatógenos en vegetales.* 15(3): 8-18

J. C. Caicedo *, S. Villamizara , M. I. T. Ferroa , K. C. Kupperb and J. A. Ferroa.2016. Bacteria from the citrus phylloplane can disrupt cell–cell signalling in *Xanthomonas citri* and reduce citrus canker disease severity. *Plant Pathology.* 65, 782–791

Jacobs et al. (2012) Jacobs JM, Babujee L, Meng F, Milling A, Allen C. The *in plantatranscriptome* of *Ralstonia solanacearum*: conserved physiological and virulence strategies during bacterial wilt of tomato. *MBio.* 2012;3(4) doi: 10.1128/mBio.00114-12. [[PubMed](#)] [[Ref list](#)]

Janse JD, Van Den Beld HE, Elphinstone J, Simpkins S, Tjou-Tam-Sin NNA and Van Vaerenbergh J. 2004. Introduction to Europe of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, race 3 in *Pelargonium zonale* cuttings. *Journal of Plant Pathology* 87:147-155.

Jha CK, Patel B, Saraf M (2012) Stimulation of growth of *Jatropha curcas* by the plant growth promoting bacterium *Enterobacter cancerogenus* MSA2. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 891-99.

Ji P, Allen C, Sanchez-Perez A *et al.* , 2007. New diversity and diagnostic challenges associated with *Ralstonia solanacearum* strains in Florida. *Plant Disease* 91, 195–203.

Jones DL, Darrah PR (1994) Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere. *Plant Soil* 166:247–257

Jones JD, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323–329

Kamensky M, Ovadis M, Chet I, Chernin L (2003). Soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases. *Soil Biol. Biochem.* 35: 323-33

Kamilova F, Kravchenko LV, Shaposhnikov AI, Azarova T, Makarova N, Lugtenberg B (2006) Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 250-256.

Khalid A, Arshad M, Zahir ZA (2004) Screening plant growth promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J Appl Microbiol* 46:473–480

Khalid, A., Akhtar, M.J., Mahmood, M.H., Arshad, M., 2006. Effect of substrate-dependent microbial ethylene production on plant growth. *Microbiology* 75, 231–236.

Khan, M. S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M., and Wani, P. A. (2010). Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi—current perspective. *Arch. Agric. Soil Sci.* 56, 73–98. doi: 10.1080/03650340902806469

- Kinsella K, Schulthess C, Morris T, Stuart J. Rapid quantification of *Bacillus subtilis* antibiotics in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry* 2009; 41 (2): 374–379
- Kloepper and Schroth, 1981 J.W. Kloepper, M.N. Schroth. Relationship in vitro antibiosis of plant growth promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora *Phytopathology*, 71 (1981), pp. 1020–1024
- Kloepper JW, Schroth MN (1978) Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. *In* Angers (ed), *Proc. 4th Int. Conf. Plant Path. Bact. vol. 2*. INRA, Gibert-Clarey, Tours, France. pp. 879-82.
- Kurabachew, H, and Wydra, K (2013). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria and their potential as bio-protectant against tomato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Biol Control*. 67, 75-83.
- KURABACHEW, HENOK. 2013. Evaluation of isolates of *Pseudomonas fluorescens* as biocontrol agent against potato bacterial wilt caused by *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* . ADDIS ABABA UNIVERSITY. 68p.
- Liau, C. H., Lu, J. C., Prasad, V., Hsiao, H. H., You, S. J., Lee, J. T., & Chan, M. T. (2003). The sweet pepper ferredoxin-like protein (pflp) conferred resistance against soft rot disease in *Oncidium* orchid. *Transgenic Research*, 12(3), 329-336.
- Loredo-Osti, C., Lopez – Reyes, L., y Espinoza-Victoria, D. 2004. Bacterias promotoras del crecimiento Vegetal asociada con gramíneas: Una revisión. *Terra Latinoamericana*. 22(2):225-239
- Lucas JA, García-Villaraco A, García-Cristobal J, Algar E, Gutierrez-Mañero J (2013) Structural and functional study in the rhizosphere of *Oryza sativa* L. plants growing under biotic and abiotic stress. *J. Appl. Microbiol.* 115: 218-35.
- Lugtenberg B, Kamilova F (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 541-56.
- Mahaffee, W. and Kloepper, J. 1997. Temporal changes in the bacterial communities of soil, rhizosphere, and endorhiza associated with field-grown cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Microbial Ecology*, 34:210–223
- Maji S, Chakrabartty PK. Biocontrol of bacterial wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum* by isolates of plant growth promoting rhizobacteria. *Aust J Crop Sci.* 2014;8:208–214.
- Maldonado E., Ochoa L., Tlapal B. (2008). Efecto del acido acetil salicílico y *Bacillus subtilis* en la infección causada por Cucumber mosaic virus en calabacita. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 14 (1). Pp. 55-59.
- Maldonado E., Ochoa L., Tlapal B. (2008). Efecto del acido acetil salicílico y *Bacillus subtilis* en la infección causada por Cucumber mosaic virus en calabacita. *Revista C Arian, Seima y Pirlak* Effects, Lütfi. 2017. Effects of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on Growth, Yield and Fruit Quality of Sour Cherry (*Prunus cerasus* L.) Faculty of Agriculture, Department Horticulture, Selçuk University, Konya, Turkey. DOI 10.1007/s10341-016-0278-6

Malik DK, Sindhu SS (2011) Production of indole acetic acid by *Pseudomonas* sp: effect of coinoculation with *Mesorhizobium* sp. Cicer on nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum*). *Physiol. Mol. Biol. Plants* 17: 25-32.

[Mansfield J¹](#), [Genin S](#), [Magori S](#), [Citovsky V](#), [Sriariyanum M](#), [Ronald P](#), [Dow M](#), [Verdier V](#), [Beer SV](#), [Machado MA](#), [Toth I](#), [Salmond G](#), [Foster GD](#) 2012 **Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology.** [Mol Plant Pathol](#). Aug;13(6):614-29. doi: 10.1111/j.1364-3703.2012.00804.

Marlow, V. L., Haag, A. F., Kobayashi, H., Fletcher, V., Scocchi, M., Walker, G. C., & Ferguson, G. P. (2009). Essential role for the BacA protein in the uptake of a truncated eukaryotic peptide in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 191(5), 1519-1527

Maróti, G., Kereszt, A., Kondorosi, E., & Mergaert, P. (2011). Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. *Research in Microbiology*, 162(4), 363-374.

MARTÍN C. y E.R. FRENCH. 1985. La marchitez bacteriana de la papa. Boletín de Información Técnica. No. 13. CIP. Lima Perú. pp. 1-16

Martínez, Luna Ramón A. Martínez Peniche, Montserrat Hernández Iturriaga, Sofía M. Arvizu Medrano y Juan R. Pacheco Aguilar* 2013. caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento Rev. Fitotec. Mex. Vol. 36 (1): 63 - 69, 2013

McCarter, S. M. 1991. Bacterial wilt. Pages 28-29 in: Compendium of tomato diseases. Jones, J. B., Jones, J. P., Stall, R. E., and Zitter, T. A., eds. APS Press Publisher: St. Paul, M. N.

Montaño, N. y J. Simoza. 2002. Efecto de combinaciones de humus de lombriz roja (*Eisenia foetida* L.) y fertilizantes químico en el rendimiento de tres cultivares de pimentón (*Capsicum annuum* L.). *UDO Agrícola* 2 (1): 79-83.

[Monteiro](#) et al. (2012) [Monteiro](#) F, Genin S, Van Dijk I, Valls M. A luminescent reporter evidences active expression of *Ralstonia solanacearum* type III secretion system genes throughout plant infection. *Microbiology*. 2012;158:2107–2116. doi: 10.1099/mic.0.058610-0

Murugesan Chandrasekaran,¹ Dharaneedharan Subramanian,² Ee Yoon,¹ Taehoon Kwon,¹ and Se-Chul Chun. 2016. Meta-analysis Reveals That the Genus *Pseudomonas* Can Be a Better Choice of Biological Control Agent against Bacterial Wilt Disease Caused by *Ralstonia solanacearum* *Plant Pathol J*; 32(3): 216–227

Narayanasamy, P. Detection and identification of bacterial biological control agents. p. 201-294. En: Narayanasamy, P. (Ed.). *Biological Management of Diseases of Crops*, Ed. Springer, Dordrecht, 2013a, 691 p.

Ng-Choi, I., Soler, M., Güell, I., Badosa, E., Cabrefiga, J., Bardaji, E., & Feliu, L. (2014). Antimicrobial Peptides Incorporating Non-Natural Amino Acids as Agents for Plant Protection. *Protein and Peptide Letters*, 21(4), 357-367.

Nguyen MT and Ranamukhaarachchi SL. 2010. Soil-borne antagonists for biological control of bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* in tomato and pepper. *J Plant Pathol* 92 (2): 395-406.

Nuez, F., Ortega, R., Costa, G. 2010 El cultivo de pimientos chiles y ají. Mundi prensa Barcelona. Editorial AEDOS. pp 135-136.

Ongena M, Jacques P. Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends in Microbiology 2008; 16 (3): 115-125.

Owen, A., y R. Zdor, 2001. "Effect of cyanogenic rhizobacteria on the growth of velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) and corn (*Zea mays*) in autoclaved soil and the influence of supplemental glycine". Soil Biol. Biochem., 33: 801-809.

Perera González, Santiago D. (1), Hernández Hernández, Julio M. (2), Siverio de la Rosa, Felipe (3). 2010 EVALUACIÓN DE LA EFICACIA *in vitro* DE PRODUCTOS NATURALES Y QUÍMICOS EN EL CONTROL DE ESPECIES FÚNGICAS QUE AFECTAN AL CULTIVO DEL PLÁTANO EN CANARIAS. Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Medio Ambiente del Gobierno de Canarias. Laboratorio de Sanidad Vegetal.

Pernezny, K. L., P. D. Roberts, J. F. Murphy, and N. P. Goldberg. 2003. Compendium of Pepper Diseases. 1st Ed. APS Press, St. Paul, MN, U.S.A.. p 23-31
PGPB

Podile AR and Kishore GK (2006) Plant growth-promoting rhizo-bacteria. In: Gnanamanickam SS (ed) Plant-Associated Bacteria. Springer, Netherlands, pp 195-230.

Poupin MJ, 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*. PLoS One 8: 69435.

Puente, M. E., Bashan, Y., Li, C. Y., and Lebsky, V. K. (2004). Microbial populations and activities in the rhizosphere of rock-weathering desert plants. Root colonisation and weathering of igneous rocks. *Plant Biol.* 6, 629–642. doi: 10.1055/s-2004-821100

Qing-Yun Xue & Guo-Chun Ding & Shi-Mo Li & Yang Yang & Cheng-Zhong Lan & Jian-Hua Guo & Kornelia Smalla. Rhizocompetence and antagonistic activity towards genetically diverse *Ralstonia solanacearum* strains – an improved strategy for selecting biocontrol agents. Appl Microbiol Biotechnol DOI 10.1007/s00253-012-4021-4

Raaijmakers JM, Bonsall RE, Weller DM (1999) Effect of population density of *Pseudomonas fluorescens* on production of 2,4-diacetylphloroglucinol in the rhizosphere of wheat. Phytopathology 89:470–475. doi:10.1094/PHYTO.1999.89.6.470

Rabea, E.I.; Badawy, M.E.T.; Stevens, C.V.; Smaghe, G.; Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. Biomacromolecules. 4, 1457–1465

REYES, I. ALVARES, L. EL AYUOBI H. VALERY A. 2008. Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. Bioagro vol 20(1). Páginas 37

Richardson, A., Barea, J.-M., McNeill, A., and Prigent-Combaret, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321, 305–339. doi: 10.1007/s11104-009-9895-2

Roberto Lanna Filho(1), Reginaldo da Silva Romeiro(2) and Eduardo Alves(1) .2010.Bacterial spot and early blight biocontrol by epiphytic bacteria in tomato plants. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.45, n.12, p.1381-1387, dez.

Robinson, RA; Ramos, AH. s.f. 2006 Estudios de la marchitez bacteriana (*R.solanacearum*) en Kenya. s.n.t. s.p.

Rodriguez, Cristian. 2013. evaluación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal en tomate (*Solanum lycopersicum*) variedad santa clara, aislados de residuos lignocelulósicos de higuierilla (*ricinus communis*) . universidad católica de manizales centro de investigación, proyección y desarrollo instituto de investigación en microbiología y biotecnología agroindustrial especialización en microbiología industrial manizales

Rodriguez, D. 2007. Determinación de biovares y razas de *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith, asociados a la marchitez bacteriana, en los cultivos de tomate *Solanum lycopersicon* L. y chile pimienta *Capsicum annum* L. en el oriente de Guatemala. Tesis de maestria. Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Agronomía Instituto de Investigaciones Agronómicas. Guatemala

Rodriguez, Cristian. 2013. EVALUACIÓN DE MICROORGANISMOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL EN TOMATE (*Solanum lycopersicum*) VARIEDAD SANTA CLARA, AISLADOS DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS DE HIGUERILLA (*Ricinus communis*)

Rodríguez-Gómez Odalys, Aguilera-Rodríguez Isabel, PérezSilva Rosa María. Adaptation of a Colorimetric Micro Method for Quantification Soluble Phosphorus in Microbial Cultures. *Revista Cubana de química*. 2012; XXV (1). 23

Sabriye Yazici 1 , Yusuf Yanar1 * and Isa Karaman2. 2011. Evaluation of bacteria for biological control of early blight disease of tomato. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(9), pp. 1573-1577, 28 February, 2011

Sadler, G.S. 2005. Management of Bacterial Wilt Disease. P.121 – 132: In Allen, C Prior, P and Hayward, A.C (Eds). *Bacterial Wilt Disease and Ralstonia solanacearum Species Complex*, The American Phytopathological Society. St.Paul Minnesota, USA

Saharan, B; Nehra, V. 2011. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A critical Review. *Life Sciences and Medicine Research*. 2011:1-30. Disponible online: <http://astonjournals.com/lsmr>.

Saleem M, Arshad M, Hussain S, Bhatti AS (2007) Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34: 635-48.

Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S., Bhatti, A.S., 2007. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J. Indian Microbiol. Biotechnol.* 34, 635–648.

Samad, Hafiz Tahir1,2, Qin Gu1 , Huijun Wu1 , Waseem Raza1 , Asma Safdar1 , Ziyang Huang1 , Faheem Uddin Rajer1 and Xuewen Gao1. 2017. Effect of volatile compounds produced by *Ralstonia solanacearum* on plant growth promoting and systemic resistance inducing potential of *Bacillus* volatiles. Tahir et al. *BMC Plant Biology*. 17:133

Sánchez, Diana., López, Ana., García, Maria., Romero, Felipe., Perdomo ,Ruth y Rebeca Bonilla Buitrago Efecto de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal solubilizadoras de fosfato en *Lactuca sativa* cultivar White Boston. Rev. colomb. biotecnol., Volumen 16, Número 2, p. 122-128, 2014. ISSN electrónico 1909-8758. ISSN impreso 0123-3475. Sánchez, Diana., López, Ana., García, Maria., Romero, Felipe., Perdomo ,Ruth y Rebeca Bonilla Buitrago

Sánchez,Diana.2011. EFECTO DE LA INOCULACIÓN CON BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL SOBRE EL CULTIVO DE TOMATE (*Solanum Lycopersicum* var. Sofía) BAJO INVERNADERO

Sang M, Chun S, Kim K. Biological control of Phytophthora blight of pepper by antagonistic rhizobacteria selected from a sequential screening procedure. Biological Control 2008; 46(3): 424- 433.

Schaad, N., Jones, J. and Chun, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3^{era} ed. The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota. USA. 371pp

Siddiqui, I.A.; S.Sh. Shaukat, I.H.Sheikh, y A. Khan, 2006. "Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the suppression of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in tomato". World J. Microb. Biot., 22: 641-650

Sobhy, I. Erb, M; Yonggen, Lou y Ted .Turlings.2014. The prospect of applying chemical elicitors and plant strengtheners to enhance the biological control of Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Molecular Microbiology, 56 (4), 845–857.

Sunar K, Dey P, Chkraborty U, Chakreborty B (2013) Biocontrol efficacy and plant growth promoting activity of *Bacillus altitudinis* isolated from Darjeeling hills. J. Basic Microbiol. 10: 1002-1014.

Sutanu Majil* and P. K. Chakrabartty2 . 2014.Biocontrol of bacterial wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum* by isolates of plant growth promoting rhizobacteria . AJCS 8(2):208-214 (2014)

Suzuki K, Sugawara N, Suzuki M, et al. (2002) Chitinases A, B, and C1 of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *Escherichia coli*: enzymatic properties and synergism on chitin degradation. Biosci Biotechnol Biochem 66: 1075–1083.

Toralba-Ubaub, L.L L.Ugay, V.P wPotential of *Lactobacillus bulgaricus* and *L. plantarum* for biological control of Moko disease of 'Cavendish' banana, caused by *Ralstonia solanacearum* Yobuuchi et al. [2012]

Torres, G. J. 2002 Productos biológicos para una agricultura sostenible. Revista Arroz. Bogotá Vol. 50 N°439 18 - 20.

Vaaje-Kolstad G, Horn SJ, Sørli M, et al. (2013) The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens*-a model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. FEBS J 280: 3028–3049.

Valencia, German . 2015.EFECTO ANTIMICROBIANO DEL QUITOSANO: UNA REVISIÓN DE LA LITERATURA.Scintia Agroalimentaria ISSN: 2339-4684 Vol. 2 (2015) 32-38

Vallejo, F y Estrada, E . 2004. Producción de hortalizas de clima cálido Universidad Nacional de Colombia. pp 107-134.

Van Loon LC (2007) Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 119: 243-54

Vining, L.C., 1990. "Functions of secondary metabolites". *Annu. Rev. Microbiol.*, 44: 395-427.

Voisard C, Keel C, Haas D, Defago G (1989) Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO J* 8:351–358

Weber, O.B., Muniz, C.R., Vitor, A.O., Freire, F. and Oliveira, V.M. 2007. Interaction of endophytic diazotrophic bacteria and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* on plantlets of banana 'Maça'. *European Journal of Plant Pathology*, 298: 47–56.

Wydra K, Semrau J. 2005. Phenotypic and molecular characterization of the interaction of antagonistic bacteria with *Ralstonia solanacearum* causing tomato bacterial wilt. In: Zeller W, Ulrich C. (eds). 1st International Symposium on Biological Control of Bacterial Plant Diseases, Darmstadt, Germany.

YANTI, Yulmira., ASTUTI, FUJI., TRIMURTI, HABAZAR., AND CHAINUR RAHMAN 2017. Screening of rhizobacteria from rhizosphere of healthy chili to control bacterial wilt disease and to promote growth and yield of chili. *BIODIVERSITAS*. Volume 18, Number 1, January 2017 E-ISSN: 2085-4722 Pages: 1-9

Zadeh P, Rastin N, Rahmani H, Khavazi K, Soltani A, Nejati R, Miransari M. Plant growth-promoting activities of fluorescent *Pseudomonads*, isolated from the Iranian soils. *Acta Physiologiae Plantarum* 2010; 32 (2):281–288

Zhang F, Shen J, Zhang J, Zuo Y, Li L, Chen X (2010) Rhizosphere

Zhou TT, Li CY, Chen D, Wu K, Shen QR, Shen B. *phlF*⁻ mutant of *Pseudomonas fluorescens* J2 improved 2,4-DAPG biosynthesis and biocontrol efficacy against tomato bacterial wilt. *Biol Control*. 2014;78:1–8. doi: 10.1016/j.biocontrol.2014.07.006.