



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
POSTGRADO EN AGRONOMÍA



RIZOBACTERIAS EN EL CONTROL DE PATÓGENOS FÚNGICOS
FOLIARES Y SU EFECTO SOBRE ALGUNOS PARÁMETROS
BIOMÉTRICOS EN EL CULTIVO DE GERBERA (*Gerbera jamesonii*
Bolus ex Hooker)

Autor: Ing. Agr. Rafael Edgerd Ramón Mejias Herrera

Tutor: Yonis Hernández

Maracay, marzo 2018

Trabajo de grado presentado como requisito final para optar al título de ***Magister Scientiarum*** en Agronomía orientación Protección Vegetal.

Dra. Yonis Hernández
Tutor

Dra. María S. González
Comité asesor

VEREDICTO

DEDICATORIA

Primeramente, al **Gran Poder Dios, la Virgen de la Candelaria y del Carmen** mis guías espirituales.

A mis padres, **Neidas Herrera Rojas y Luis Alberto Mejías** por ser las personas que más AMOR me han dado en este mundo y a las que más amo, por creer en mí y darme su apoyo durante todas las fases de mi vida, especialmente mi mamá que es el ser más maravillosos y hermoso que Dios me puso en la tierra para hacerme la vida más placentera.

A mi abuelita **Carmen Rojas de Herrera** por ser mi segunda madre y a la memoria de mi abuelito **Edgar Benito Herrera** que desde el cielo me cuida y protege.

A la memoria de dos personas importante para mi vida que desde el lugar donde están me siguen guiando y cuidando, mi abuelita **Columba Funes** y un gran amigo **Tomas León**

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, a Dios a la Virgen de la Candelaria y del Carmen por guiarme y permitirme vivir en el momento y la hora exacta.

A mis padres, por ser un ejemplo vivo de que el amor sincero, incondicional y puro existe.

A mis hermanos, cuñada y sobrinito (LAJ), por el apoyo, especialmente la realización de la tesis universitaria.

A mi hermana, amiga, confidente Paola Rodulfo, su apoyo durante toda la realización de la tesis fue determinante.

A mi gran cómplice Cesar Hurtado por el cariño y apoyo. Gracias, por tanto.

AL Laboratorio de Bacterias Fitopatógenas de la **Facultad de Agronomía** de la **Universidad Central de Venezuela**,

Reconocimiento especial a mi tutora Profesora Yonis Hernández, por regalarme su amistad, cariño y buenos consejos personales y profesionales.

A los investigadores Edgloris Marys, Eduardo Rodríguez y Alexander Mejía por su apoyo, consejo, tutoría y amistad sincera.

A mis asesores María S. González y Rosana Figueroa por estar siempre dispuesto a colaborar con el desarrollo de la tesis.

A mis amigos y hermanos Aura, H., Maria L. Mailyn M., Yinerby Q., Alexander, P., Junior, M., Pedro, P., Bella, P., Vanesa, A., Jose, C., Veronica, R., Alejandro F. y todos aquellos que me brindan paz y amor.

A mis querías secretarias del PostGrado de agronomía. Zully, Jaqueline, Karina y Catiaris por su apoyo y comprensión durante mi estadía.

Ing. José Manuel de Freitas y Gustavo Moro por el apoyo y colaboración en la realización de la tesis

“El aprendizaje es un tesoro que seguirá a su dueño a todas partes”
Proverbio chino

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	vii
ÍNDICE DE CUADROS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
RESUMEN	xii
INTRODUCCIÓN.....	14
OBJETIVOS.....	17
General.....	17
Específicos	17
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	18
Gerbera (<i>Gerbera jamesonii</i>).....	18
Generalidades del cultivo.....	18
Características botánicas	18
Clasificación varietal	20
Principales patógenos que afectan al cultivo de gerbera	20
<i>Botrytis cinerea</i>	20
Generalidades.....	20
Síntomas.....	21
Epidemiología y ciclo de vida	21
Factores de patogenicidad.....	22
<i>Alternaria alternata</i>	24
Generalidades.....	24
Síntomas.....	24
Epidemiología	25
Generalidades del Control Biológico de Enfermedades	25
Rizosfera	27
Mecanismos acción mediados por microorganismos PGPR	28
Competencia por el hierro y producción de sideróforos.....	29
Antibiosis	30
Enzimas líticas	31
Solubilización de fosfatos.....	32
Competencia	33
MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
1. Lugar de estudio.....	34

2.	Procedencia de Bacterias antagónicas y patógenos fúngicos.	34
3.	Aislamientos de bacterias rizosférica	35
4.	Aislamientos de <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Alternaria alternata</i>	35
5.	Prueba de patogenicidad de <i>Alternaria alternata</i> y <i>Botrytis cinerea</i>	36
6.	Confrontación <i>in vitro</i> de los aislamientos bacterianos con <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Alternaria alternata</i>	37
7.	Evaluación en casa de cultivo de los aislamientos bacterianos más promisorios <i>in vitro</i> sobre el efecto de <i>Botrytis cinerea</i> en plantas de gerbera.....	38
8.	Evaluación en casa de cultivo del efecto de las rizobacterias más promisorias <i>in vitro</i> como antagonistas, sobre algunas variables de crecimiento y rendimiento en plantas de gerbera.....	39
9.	Identificación de algunos mecanismos de acción mediados por las bacterias más promisorias <i>in vitro</i>	40
	Producción de Ácido Indol-acético (AIA) por la técnica colorimétrica de Salkowski.....	40
	Producción cualitativa de ácido cianhídrico (HCN)	41
	Producción de Sideróforos.....	42
	Capacidad solubilizadora de fosfatos	43
	Determinación cualitativa de actividad quitinasa.	43
10.	Identificación genotípica y fenotípica de las 3 cepas más promisorias en el biocontrol en condiciones <i>in vitro</i>	44
	Aislamiento de ADN	44
	Condiciones de PCR	44
11.	Análisis estadísticos	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		46
	Aislamiento de <i>Botrytis cinerea</i>	46
	Aislamiento de <i>Alternaria alternata</i>	47
	Prueba de patogenicidad de <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Alternaria alternata</i>	47
	Selección de Rizobacterias	49
	Confrontación <i>in vitro</i> de rizobacterias con patógenos fúngicos.....	50
	Observación en microscopio óptico de confrontación <i>in vitro</i> de las rizobacterias con <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Alternaria alternata</i>	55
	Evaluación de la capacidad biofungicida en casa de cultivo comercial de los aislamientos bacterianos más promisorios <i>in vitro</i> sobre <i>Botrytis cinerea</i> en plantas de gerbera	57
	Identificación de algunos mecanismos de acción mediados por las bacterias más promisorias <i>in vitro</i>	61
	Solubilización de fósforo	61
	Producción cualitativa de ácido cianhídrico (HCN)	63
	Producción de quitinasa	65

Producción de sideróforos	67
Producción de Ácido Indolacético	69
Efecto de las rizobacterias más promisorias <i>in vitro</i> como antagonistas, sobre algunas variables de crecimiento y rendimiento en plantas de gerbera.	70
Identificación molecular de las PGPR más promisorias y algunas características fenotípicas.....	72
CONCLUSIONES.....	76
RECOMENDACIONES	77
BIBLIOGRAFÍA	78

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>Botryotinia fuckeliana</i>	21
Cuadro 2. Tratamientos con bacterias antagonistas en condiciones de casa de cultivo comercial para el control de <i>Botrytis cinerea</i> en el cultivo de gerbera.	39
Cuadro 3. Escala de valoración de 0 a 6 para medir la severidad del moho gris en flores de gerbera	39
Cuadro 4. Capacidad de promover el crecimiento vegetal de las rizobacterias en condiciones de casa de cultivo.....	40
Cuadro 5. Valores para la elaboración de curva patrón con el fin de medición de concentración de AIA por parte de las PGPR	41
Cuadro 6. Inhibición de esporulación de <i>Botrytis cinerea</i> al ser confrontada con rizobacterias aisladas de gerbera.	51
Cuadro 7. Inhibición del crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> al ser confrontada con rizobacterias aisladas de gerbera.	51
Cuadro 8. Inhibición del crecimiento de <i>A. alternata</i> al ser confrontada con rizobacterias aisladas de gerbera.....	52
Cuadro 9. Inhibición del crecimiento de <i>A. alternata</i> al ser confrontada con rizobacterias aisladas de gerbera.....	53
Cuadro 10. Índice de solubilización de las PGPR aisladas de rizosfera de gerbera.....	61
Cuadro 11. Concentración de AIA producido por las rizobacterias aisladas de gerbera	69
Cuadro 12. Evaluación de diferentes variables biométricas en el cultivo de gerbera tratadas con rizobacterias.....	70
Cuadro 13. Resultados de la identificación molecular de las bacterias aisladas de la rizosfera de gerbera con potencial antagonista y promotor de crecimiento.....	72
Cuadro 14. Características fisiológicas y bioquímicas de las rizobacterias identificadas molecularmente	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Crecimiento de <i>B. cinerea</i> en medio PDA.....	46
Figura 2. Estructuras de <i>B. cinerea</i>	46
Figura 3. Síntomas iniciales en hojas de gerbera ocasionado por de <i>A. alternata</i>	48
Figura 4. Hidrolisis ocasionada por las rizobacterias identificadas como G2, G3 y G6 a <i>B. cinerea</i>	56
Figura 5. Hidrolisis ocasionada por las rizobacterias identificadas como G2 y G3 a <i>A. alternata</i>	57
Figura 6. Primera evaluación. Porcentaje (%) de severidad en flores de gerbera inoculadas con <i>B. cinerea</i> y tratadas con rizobacterias..	58
Figura 7. Segunda evaluación. Porcentaje (%) de severidad en flores de gerbera inoculadas con <i>B. cinerea</i> y tratadas con rizobacterias.	58
Figura 8. Tercera evaluación. Porcentaje (%) de severidad en flores de gerbera inoculadas con <i>B. cinerea</i> y tratadas con rizobacterias..	59
Figura 9. Halos de solubilización de rizobacterias aisladas de rizosfera de gerbera sembrada en medio Pikovskaya.....	62
Figura 10. Producción de HCN de las rizobacterias G2, G3 y G6 aisladas de gerbera..	64
Figura 10. Rizobacterias G2, G3 y G6 hidrolizando quitina en medio quitina coloidal	66
Figura 11. Rizobacterias G2, G3 y G6 sembradas en medio CAS-Agar.....	67
Figura 12. Fragmento amplificado de 1,500 pb del gen 16S con los oligos rP2 y fD1 con PCR.....	72

RESUMEN

El uso de agroquímicos en el control de *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata* en el cultivo de gerbera (*Gerbera jamesonii*) es una herramienta utilizada por los agricultores. Sin embargo, la toxicidad elevada de algunos fungicidas, persistencia en el medio, mal uso y resistencia por parte de fitopatógenos a algunas moléculas han llevado a replantear las estrategias, siendo el control biológico un método alternativo para el manejo de enfermedades a través de la utilización de microorganismos benéficos. Aunque, esta actividad de manera natural presenta resultados impredecibles; por lo que se deben estudiar técnicas para mejorar y potencializar su uso, incrementando el número de microorganismos benéficos autóctonos en los sistemas agrícolas. Por este motivo se aislaron rizobacterias de gerbera con el fin de evaluar su efecto biocontrolador *in vitro* sobre *Alternaria alternata* y *Botrytis cinerea* y sobre este último también en casa de cultivo comercial. Así mismo, se estudió el efecto bioestimulante de las rizobacterias sobre algunas variables biométrica en el cultivo, además a través de secuenciación del ARNr 16S y pruebas fenotípicas se identificaron las bacterias más promisorias junto con el estudio de algunos mecanismos de acción. Se obtuvo un total 14 bacterias, siendo las cepas denominadas G2, G3 y G6 las que presentaron mayor efecto en la inhibición del crecimiento y esporulación a los patógenos, seleccionándose para los ensayos en campo. En cuanto al control de *B. cinerea* en casa de cultivo se evidenció en la primera evaluación que con G2, G3, G6 y la mezcla de las tres (Gmix) la severidad fue de 4,44%, 15,26%, 22,22% y 12,22% respectivamente, con relación al testigo que alcanzó un 30%, sin embargo, en la última evaluación todas las cepas se comportaron similar al testigo con más del 70% de severidad de la enfermedad. Con respecto al efecto bioestimulante las plantas tratadas con las cepas G2 y G6 presentaron el mejor comportamiento con un rendimiento de 30 y 29 flores cosechadas, un diámetro de capítulo de 52,95cm y 51,18cm respectivamente, el testigo sólo alcanzó 20 flores y 47,23cm de diámetro. La cepa G2 fue identificada como *Klebsiella* sp., G3 *Serratia* sp y G6 *Pseudomonas aeruginosa* las cuales tuvieron la capacidad de producir AIA y presentaron actividad quitinolítica. La solubilización de fosfatos y producción de sideróforo se evidenció sólo en *Klebsiella* sp y *P. aeruginosa*, en cambio la producción de HCN sólo en *P. aeruginosa*. Los resultados demuestran que las PGPR identificadas en este estudio tienen capacidad biocontroladora y bioestimulante por lo que se puede usar como una herramienta en el manejo del cultivo de gerbera.

Palabras claves: PGPR, bioestimulante, biocontrol, *Botrytis*, rizosfera, rizobacterias.

ABSTRACT

The use of agrochemicals in the control of *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* in the crop of gerbera (*Gerbera jamesonii*) is a tool used by farmers. However, the high toxicity of some fungicides, persistence in the environment, misuse and resistance by phytopathogens to some molecules have led to a rethinking of the strategies, with biological control as an alternative method for the management of diseases through the use of beneficial microorganisms. Although, this activity in a natural way presents unpredictable results; Therefore, techniques should be studied to improve and potentiate their use, increasing the number of indigenous beneficial microorganisms in agricultural systems. For this reason, rhizobacteria were isolated from gerbera in order to evaluate their *in vitro* biocontrol effect on *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea* and on the latter also was evaluated in greenhouse. Likewise, the biostimulant effect of rhizobacteria on some biometric variables in the crop was studied, in addition, through 16S rRNA sequencing and phenotypic tests, the most promising bacteria were identified and some mechanisms of action were studied. A total of 14 bacteria were obtained, being the strains denominated G2, G3 and G6 those that showed the greatest effect in the inhibition of growth and sporulation to the pathogens, being selected for field trials. Regarding the control of *B. cinerea* in greenhouse it was evidenced in the first evaluation with G2, G3, G6 and the mixture of the three (Gmix) the severity was 4.44%, 15.26%, 22, 22% and 12.22% respectively, compared to the control that reached 30%, however, in the last evaluation all the strains behaved similar to the control with more than 70% of severity of the disease. With regard to the biostimulant effect, the plants treated with the strains G2 and G6 presented the best performance with a yield of 30 and 29 flowers harvested, a chapter diameter of 52.95 cm and 51.18 cm respectively, the control only reached 20 flowers and 47,23cm in diameter. The G2 strain was identified as *Klebsiella* sp., G3 *Serratia* sp. and G6 *Pseudomonas aeruginosa* which had the capacity to produce AIA and showed chitinolytic activity. The solubilization of phosphates and production of siderophore was evidenced only in *Klebsiella* sp. and *P. aeruginosa*, however the production of HCN only in *P. aeruginosa*. The results showed that the PGPR identified in this study had capacity as a biocontrol and biostimulant agent, so it can be used as a tool in the management of the gerbera crop.

Key words: PGPR, Biostimulant, biocontrol, Botrytis, rhizobacteria, rhizosphere

INTRODUCCIÓN

En Venezuela una de las ornamentales de mayor importancia es la gerbera (*Gerbera jamesonii*), y esto se debe a su adaptabilidad agroclimática y rentabilidad. Se encuentra en las zonas donde por tradición se cultivan flores de pote y corte principalmente los estados Táchira, Mérida, Trujillo y Miranda (Maciel, 1992). Pertenecer a la familia de las Asteráceas, ocupando el quinto lugar en flores de corte más usada en el mundo, después de la rosa (*Rosa* sp), el clavel (*Dianthus caryophyllus*), el crisantemo (*Chrysanthemum* sp.) y el tulipán (*Tulipan* sp). Las flores varían de forma y tamaño y sus colores más comunes son blanco, amarillo, naranja, rojo y rosa. (Sheela, 2008).

La producción de gerbera presentó un aumento considerable a partir del año 2011 con el convenio Rusia-Venezuela, con la participación de FONDAS y la empresa mixta Orquídea S.A. la cual fue creada principalmente con el fin de fortalecer la producción, comercialización, distribución, importación y exportación de flores. Para ese momento, se incrementó la superficie de este rubro en la zona andina y central del país (Prensa-Orquídea, 2012).

Vale destacar, que a mediados del año 2013 la empresa mixta publicó en su diario virtual que planteaba posicionar sus ventas en Moscú con la comercialización de 25.000.000 tallos, esto conduciría al aumento de las exportaciones de este rubro a Rusia, impulsando la producción nacional con incentivos a los pequeños y medianos productores, promoviendo las exportaciones no tradicionales (Prensa-Orquídea, 2013).

A pesar de lo antes expuesto el sector floricultor se ve afectado por diversas problemáticas, siendo una de las principales en la producción de gerbera las enfermedades producidas por hongos que afectan la parte aérea del cultivo, destacando *Alternaria* sp. y *Botrytis cinerea* los cuales ocasionan deterioro en el follaje y la flor del cultivo. No obstante, todo lo referente a investigaciones fitopatológicas sobre la gerbera, tanto en identificación como diferentes alternativas de control se han realizado principalmente en Europa existiendo poca información en países de Latinoamérica. (Cabrera *et al.*, 2003).

El control de los patógenos por parte de los agricultores se basa principalmente en el uso de plaguicidas, ya que tiene características atractivas, tales como la simplicidad,

previsibilidad y además se requiere de poca información sobre la ecología, fisiología de las especies a combatir y las interacciones biológicas (Bardin *et al.*, 2015).

No obstante el uso intensivo de plaguicidas para el control de las enfermedades, han promovido sin duda muchos problemas ambientales y la contaminación de los alimentos, el suelo, el agua y los animales; toxicidad en los agricultores; la resistencia de los patógenos, a ciertos ingredientes activos de plaguicidas, así como la aparición de enfermedades iatrogénicas, la eliminación de organismos beneficiosos y la reducción de la biodiversidad, además al dañar a los organismos beneficiosos pueden promover la aparición de nuevas plagas (Pal y Gardene, 2006., Bardin *et al.*, 2015).

Por otra parte, para producir gerbera desde plántulas hasta floración se requiere de altos niveles de fertilizantes, que pueden ser incorporados al suelo o aplicados durante todo el periodo del cultivo por medio de fertirriego, principalmente de forma inorgánica (Soroa *et al.*, 2007), Torres *et al.*, 2006 señalan que las prácticas de manejo convencionales que utilizan la mayoría de los productores en Venezuela están basadas en altos insumos, que incluye altas aplicaciones de fertilizantes inorgánicos.

Lo anterior puede generar una fuente de contaminación ambiental ya que los fertilizantes al utilizarse en mayor cantidad de la que pueden absorber los cultivos, o cuando se eliminan por acción del agua o del viento de la superficie del suelo antes de que puedan ser absorbidos pueden infiltrarse en las aguas subterráneas o ser arrastrados a cursos de agua. Esta sobrecarga de nutrientes provoca la eutrofización de lagos, embalses y estanques y da lugar a una explosión de algas que suprimen el crecimiento de otras plantas y animales acuáticos (FAO, 2015).

Es por ello que el uso de microorganismos aplicados en la agricultura, ya sean como biocontroladores, bioestimulantes o biofertilizantes está tomando mayor auge. Debido a que representan un elemento importante en los sistemas agrícolas sustentables o de pocos insumos, adicionalmente en la actualidad existe una tendencia a cuidar el medio ambiente por lo que el control biológico constituye una alternativa económicamente atractiva y ecológicamente aceptable, permitiendo reducir los insumos externos y mejorar la cantidad y calidad de los recursos internos, mediante la utilización de microorganismos del suelo debidamente seleccionados, capaces de aportar a los cultivos control sobre patógenos, sustancias fisiológicamente activas que, al interactuar con la planta, ocasionan

una mayor activación del metabolismo o favorecer la disposición de nutrientes (Kloepper *et al.*, 1999., Shaikh y Sayyed, 2015).

Por todo lo antes se realizó esta investigación cuya finalidad fue evaluar el efecto biocontrolador y bioestimulante de rizobacterias autóctonas sobre el cultivo de gerbera. Esto permitirá minimizar los problemas fitosanitarios y mejorar el nivel y disponibilidad nutricional de las plantas brindando la posibilidad de realizar un manejo integrado al cultivo más cónsono con el ambiente reduciendo los gastos y pérdidas económicas a los productores

OBJETIVOS

General

Evaluar el efecto de rizobacterias en el control de patógenos fúngicos foliares y sobre algunos parámetros biométrico en el cultivo de gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus ex Hooker).

Específicos

1. Determinar *in vitro* la capacidad antagonista de rizobacterias autóctonas de *Gerbera jamesonii* a *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata* causante de enfermedades en el cultivo de gerbera.
2. Evaluar en casa de cultivo el efecto biocontrolador de las tres bacterias antagonistas más promisorias *in vitro* a *Botrytis cinerea* causante del moho gris de la gerbera.
3. Determinar en casa de cultivo la capacidad promotora de crecimiento de las 3 rizobacterias más promisorias *in vitro* en plantas de gerbera.
4. Identificar mediante pruebas genéticas y fenotípicas las bacterias más promisorias *in vitro*.
5. Identificar algunos mecanismos de biocontrol y bioestimulante mediados por las bacterias más promisorias *in vitro*.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Gerbera (*Gerbera jamesonii*)

Generalidades del cultivo

Es originaria de Sudáfrica, de las provincias de Transvaal, Natal y Orange. También es conocida como margarita de Transvaal, margarita de Barberton o margarita africana, se cultiva en gran parte del mundo adaptándose a diferentes condiciones climáticas. Es una de las flores de cortes más utilizadas debido a su forma y gran rango de colores, siendo una opción en los bouquets o arreglos. A nivel mundial los colores que presentan mayor demanda son: rosa-fucsia, rojo, amarillo, blanco, naranja entre otros (Bañon *et al.*, 1993, Singh, 2006).

El género *Gerbera* (Asteraceae), establecido en 1737 por Gronovius, cuenta hoy con alrededor de 45 especies herbáceas de plantas perennes que se encuentran principalmente en Sudáfrica, Asia tropical y América del Sur., habitando en su mayoría en regiones templadas o montañosas. La especie más conocida y la única que tiene importancia hortícola es *G. jamesonii*. Esta especie fue descubierta en 1878 por el botánico austriaco Rehmann en el Transvaal y fue llamada así por Bolus en honor al botánico inglés Jameson. Su primera descripción oficial fue dada por Hooker, aunque Bolus ya lo había descrito en una breve nota (Bowe *et al.*, 1979, Bañon *et al.*, 1993).

Las variedades de cultivo comercial en la actualidad tienen su origen de la realización de numerosas hibridaciones, principalmente de dos especies *Gerbera jamesonii* y *G. viridifolia*, realizada por Lynch quien fue el primero en hacer los cruces entre los años 1906-1909. El híbrido fue nombrado *Gerbera cantabrigiensis* ya que probablemente Jameson enviaba las plantas a los jardines botánicos en Cambridge, Inglaterra y allí fue tomada por Lynch, hoy conocido también como *Gerbera hybrida*. Actualmente la mayoría de las variedades cultivadas comerciales se originaron a partir del cruce de estas dos especies (Sheela, 2008).

Características botánicas

La gerbera es una planta perenne, aunque comercialmente se cultiva durante 3 o 4 años posterior a este tiempo se evidencian mermas en la productividad. Perteneciente a la familia *Asteraceae*. Se caracteriza por presentar un eje principal bastante acortado y grueso, debido a esto las distancias internodales son pequeñas, por lo que las hojas se concentran y se agrupan en forma de roseta basal. En las inserciones de las distintas hojas se

encuentran las yemas axilares, de las cuales salen vástagos laterales que forman sus propias rosetas de hojas y raíces. De este modo, las gerberas forman al crecer plantas compactas. Las hojas tienen peciolo largo que crecen más o menos verticalmente hacia arriba, son elípticas, laceradas, de borde liso o dentado pudiendo ser arrugadas, en la base de algunos peciolo emergen los brotes florales (Sane y Narayana, 2001).

El sistema radical es pivotante, en origen, pero a medida que se desarrolla, se convierte en fasciculado y está compuesto por gruesas raíces de las que parten numerosas raicillas. Las raíces de la gerbera necesitan una gran cantidad de aire para que la planta vege bien (Gamboa, 1991).

El primer botón floral se origina del meristemo apical del vástago principal de las plantas jóvenes, luego la capacidad de floración de este vástago desaparece y las siguientes inflorescencias crecen de los meristemos apicales de las yemas laterales, la cual se encuentra entre los ángulos de las hojas más jóvenes y el tallo. (Singh, 2006).

Forma inflorescencias llamadas capítulos, colocadas individualmente sobre largos pedúnculos, los cuales en su base son parcialmente leñosos, a veces aterciopelados y en la parte superior vacíos por dentro (medula), estos pueden ser de distinto grosor y su tamaño dependerá del cultivar, manejo agronómico y las condiciones climáticas existentes (Sane y Narayana, 2001).

Las flores son compuestas tienen en el borde exterior flores liguladas que pueden estar presente en uno o varios anillos y en el centro flores tubuladas. Todo el capítulo por la parte inferior está cubierto por brácteas verdes ovaladas o lanceoladas, llamado filario, colocadas en forma de teja en varias filas. Las flores liguladas son un medio de atracción para los insectos, principalmente las abejas y abejorros, las tubuladas son hermafroditas, y las flores que contienen un pistilo y estambres bien desarrollados aparecen sólo en los bordes exteriores. En las demás flores tubuladas, los pistilos se encuentran reducidos en mayor o menor grado (Bañon *et al.*, 1993., Soroa, 2005).

Las flores hermafroditas en la gerbera son tubuladas y prematuras, ya que el polen madura antes del estigma, cuando la flor todavía se encuentra en forma de botón, lo que dificulta la autopolinización de las flores de la misma inflorescencia (Bañon *et al.*, 1993., Bohming, 1985).

Clasificación varietal

Para la clasificación de las gerberas, además de los colores se utilizan los términos simples, semi-doble, doble, y spider según el número, disposición y tamaño de las coronas de flores liguladas, clasificándose así por tipo de flor. Asimismo, se emplean los términos corazón negro o verde, según sea el color de la parte central de la inflorescencia (Gamboa, 1991).

Otra característica utilizada para su clasificación es el tamaño de la flor la cual puede ser mini, estándar y gigante. En cuanto a variedades cultivadas, hay que señalar la existencia de una dinámica muy intensa ya que continuamente van desapareciendo y apareciendo nuevas variedades (Gamboa, 1991).

Principales patógenos que afectan al cultivo de gerbera

La producción de flores de corte de gerbera bajo condiciones de cultivo protegido, se ve amenazada por diversas enfermedades, siendo las más comunes aquellas producidas por patógenos de suelo y follaje principalmente por los géneros *Phytophthora*, *Pythium*, *Sclerotinia* y *Rhizoctonia*, causantes de marchitez, afectando al cuello de la planta y posteriormente las raíces o viceversa, así como *Erysiphe cichoracearum*, *Bremia lactucae*, *Alternaria alternata* y *Botrytis cinerea* que afectan principalmente las hojas y flores del cultivo ocasionando pérdidas considerables (Cabrera *et al.*, 2003., Ferraroto *et al.*, 2008., Wolcan, 2010, Benson y Parker, 2011., Praveen *et al.*, 2017).

Botrytis cinerea

Generalidades

Botrytis cinerea es el agente causal del moho gris en diferentes cultivos, siendo un patógeno necrótrofo con un amplio rango de hospedante, el cual produce varias estructuras entre ellas hifas vegetativas, esclerocios, macroconidios y microconidios. Su teleomorfo, *Botryotinia fuckeliana* presenta un cuerpo reproductivo, el apotecio, donde se encuentran las ascas lineales que contiene ocho ascosporas binucleadas. En el Cuadro 1 se observa la clasificación taxonómica de *B. fuckeliana* (Elad *et al.*, 2007 y Williamson *et al.*, 2007).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Botryotinia fuckeliana* tomado de la base de dato de Mycobank database. Referencia: Mycobank database

Dominio	Eukaryota
Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Subfilo	Pezizomycotina
Clase	Leotiomycetes
Subclase	<u>Leotiomycetidae</u>
Orden	<u>Helotiales</u>
Familia	<u>Sclerotiniaceae</u>
Género	<u>Botryotinia</u>
Especie	<i>Botryotinia fuckeliana</i>

Síntomas

En los pétalos de las flores de gerbera ocasiona pequeñas manchas translucidas, que se tornan castañas, coalescen y avanzan hacia el pedúnculo ocupando toda la flor, causando podredumbre. Cuando la infección se produce en estado de botón floral, éste no abre quedando momificado. En el pedúnculo se pueden observar manchas pardas o atizonadas. El hongo afecta al cultivo en cualquier estado de su desarrollo e infecta cualquier parte de la planta, colonizando hojas, tallos y flores, por lo que las infecciones producidas no sólo inciden en el rendimiento, sino además en la calidad del cultivo, provocando deterioros de gran magnitud incluso durante el transporte y almacenaje. Se puede observar sobre los órganos afectados un moho grisáceo constituido por micelio y estructuras reproductivas del patógeno, constituyendo esto el signo del mismo (Benito *et al.*, 2000 y Palmucci *et al.*, 1997).

Epidemiología y ciclo de vida

La inoculación por conidios de *B. cinerea* en flores de gerbera ocurre principalmente en época de lluvia por medio del viento o personal de trabajo. Las flores pueden funcionar como trampas de esporas durante la producción. Después de la inoculación, los conidios permanecen inactivos hasta que una película delgada de agua esté disponible para la germinación, así mismo se requiere un rango de temperatura entre 12-25°C con un óptimo de 20 °C para un porcentaje de germinación por encima de 80%, en conjunto con una alta humedad relativa (> 85%), hay una correlación positiva entre la humedad relativa y la edad de las flores de gerbera con respecto a la cantidad de lesiones ocasionadas por *B. cinerea*. En línea general las condiciones más preponderantes son generalmente la humedad superficial sobre el tejido y temperaturas moderadas (Williamson *et al.*, 2007, Latorre y Rioja, 2002 y Kerssies, 1994).

Botrytis cinerea sobrevive en forma de micelio sobre restos de cosecha o material en descomposición, siendo éste el inóculo primario. Además, puede lograr desarrollar esclerocios que representan un importante mecanismo de supervivencia, altamente resistente a condiciones ambientales extremas, sin embargo, no es habitual observarlo en condiciones de campo (Williamson *et al.*, 2007 y Prins *et al.*, 2000).

Bajo condiciones favorables de temperatura y humedad se produce la maduración de los órganos de supervivencia. La proliferación de hifas sobre los tejidos en descomposición da lugar a la formación del micelio del cual surgen los conidióforos en cuyo extremo se desarrollarán conidios los cuales son transportados por el viento, insectos, acción antrópica u otros hasta entrar en contacto con la superficie de la planta. La producción, liberación y dispersión del inóculo es un proceso continuo siempre que las condiciones ambientales sean favorables (Latorre y Rioja, 2002 y Kerssies, 1994).

Una vez sobre el tejido la adherencia de los conidios es favorecida por la humedad superficial, luego emite el tubo germinativo produciendo una matriz extracelular que le sirve de adherencia. En el extremo se origina una hinchazón del tejido originando el apresorio, sin embargo, en algunos casos el patógeno puede penetrar al huésped sin la formación de esta estructura, haciéndolo directamente a través de la cutícula, o por medio de heridas y/o estomas (Holz *et al.*, 2004 y Doss *et al.*, 1995).

Posterior a la penetración ocurre la muerte de las células adyacentes ocasionando las lesiones primarias como resultado de una respuesta de la planta. Seguidamente se presenta una fase de latencia, la cual tiene una duración indefinida, hasta que el hongo vence las barreras defensivas de la planta e inicia la invasión en un corto periodo ocasionando una rápida maceración del tejido, en la cual el hongo finalmente esporula produciendo inóculo para la infección secundaria. Después de la infección y muerte del huésped, puede sobrevivir y esporular como saprófitos en tejido necrótico, o producir estructuras de supervivencia a largo plazo, como esclerocios (Sharabani *et al.*, 1999 y Holz *et al.*, 2004).

Factores de patogenicidad

El primer signo visible de la germinación de los conidios de *B. cinerea* cuando entran en contacto con la superficie del tejido es la hinchazón del mismo, seguido se desarrolla el tubo germinal de aproximadamente 10 µm donde secreta una matriz extracelular que sirve para fijarse al tejido. Cuando las condiciones ambientales son favorables pueden

originarse hasta cinco tubos germinales por conidio. La penetración ocurre por estomas o de manera directa a través de la cutícula sin formar apresorio (Salinas y Verhoeff, 1995., Doss, 1999, Choquer *et al.*, 2006).

Sin embargo, Gourgues *et al.*, (2004) mencionan que sí origina apresorio, pero éste no forma un septo o membrana que lo separe del tubo germinativo., así mismo, Schumacher y Tudzynski (2012) señalaron que las estructuras de infección varían., algunas cepas forman hinchazones apicales simple en los tubos germinales o apresorio y otras sólo estructuras llamadas cojines de infección sin formación de apresorio.

Botrytis cinerea secreta enzimas de tipo cutinasas y lipasas que probablemente degradan la pared de la superficie foliar facilitando la entrada del clavo de penetración (Tudzynski y Siewers, 2004). Por su parte Rolke *et al.*, (2004) indicaron que el patógeno sintetiza peróxido de hidrogeno en el extremo del clavo de penetración. Aunque no está completamente dilucidado su importancia en el proceso de patogénesis, se presume que podría inhibir la actividad normal de las oxidasas de la planta que modifican la cutícula para reforzarla, proporcionándoles un sustrato más fácil de descomponer (Pérez, 2008).

Durante la penetración *B. cinerea* provoca un estallido respiratorio, que conlleva a la acumulación masiva de peróxido de hidrógeno, esto conduce una acumulación de radicales libres, culminando con la peroxidación lipídica y el agotamiento de antioxidantes. Todos estos procesos oxidativos provocan un desequilibrio masivo del estado redox dentro y alrededor del tejido infectado, promoviendo así el avance de la enfermedad. El patógeno es capaz de sobrellevar este aumento de especies reactiva de oxígeno sintetizando enzimas como catalasas, peroxidasas y superóxido dismutasa (Schouten *et al.*, 2002 y Muckenschnabel, *et al.*, 2002).

Una vez perforada la cutícula, el clavo de penetración invade la pared anticlinal de la célula epidérmica subyacente. El patógeno en la fase de invasión sintetiza pectinasas, pectin metil esterases, celulasas, hemicelulasas y endopoligalacturonasas principalmente responsables de la degradación de los componentes principales de la pared celular (Schumacher y Tudzynski, 2012., Choquer *et al.*, 2006).

El progreso de infección implica una secuencia compleja de eventos biológicos que no sólo incluyen el ataque enzimático sino también la producción de metabolitos secundarios

fitotóxicos, siendo los principales botrydial y botcinin las cuales juegan un papel importante en la virulencia induciendo clorosis, necrosis y colapso celular (Dalmais *et al.*, 2011).

B. cinerea sintetiza ácido oxálico el cual puede actuar como un co-factor en la patogénesis en lugar de tener un papel fitotóxico primario. Se presume que facilita la actividad de enzimas degradativas implicadas en el proceso de infección, endopoligalacturonasa, proteasas, pectinasas entre otras que son activas a pH ácido. Además, puede estimular la degradación de pectina al quelar iones calcio, perturbando las interacciones intermoleculares entre polímeros pécticos comprometiendo la integridad de la estructura de la columna vertebral, sobre todo cuando éstas están parcialmente degradadas por las pectinasas. Por último, el oxalato puede estimular el estallido respiratorio y la muerte celular programada (Kars y van Kan, 2007., Ten Have *et al.*, 2002)

Alternaria alternata

Generalidades

Presenta conidióforos con morfología variable observándose simple, ramificado, recto y flexible, de color oliváceo o dorado, los conidios se encuentran en cadenas largas, a veces ramificada, de 5-12 conidios, de tamaño y forma variable, generalmente ovoide a elipsoide pigmentado de color café pálido a marrón, con 3-6 septos transversales y 0-2 longitudinales u oblicuos con una longitud promedio de 25-35x5-10 μm (Mirkova y Konstantinova, 2003). Las colonias fúngicas en el medio Agar Papa Dextrosa son inicialmente de color blanco mate, luego se tornan verde oliva observándose la esporulación a partir del quinto día (Praveen *et al.*, 2017., Ramjegathesr y Ebenezer, 2012).

Síntomas

Ocasiona pequeñas manchas marrones, redondas a irregulares, de aspecto húmedo al principio, que gradualmente aumentan de tamaño. El centro se torna más claro con el transcurso del tiempo, quedando finalmente delimitado por un borde castaño ligeramente rojizo evidenciándose las estructuras del patógeno. Las manchas coalescen llegando a cubrir gran parte de la lámina foliar observándose anillos concéntricos de color marrón claro a marrón oscuro redondeado, pueden alcanzar la base foliar, sin embargo, las lesiones en los pedúnculos son más largas que redondas. Las hojas mueren sin

desprenderse de la planta adquiriendo consistencia apergaminada (Ahmad *et al.*, 2013 y Nagrale *et al.*, 2013).

Epidemiología

Alternaria sobrevive en forma de micelio latente y conidios sobre residuos vegetales, suelo y de manera epifita en los cultivos. Los períodos de lluvia, rocío intenso, temperatura alta (25-30 °C) y humedad relativa superior 80%, son favorables para la germinación, crecimiento y esporulación de los conidios, los cuales son diseminados por el viento, lluvia o riego a través del salpicado sobre la superficie de las plantas. Una vez ocurrida la inoculación las esporas deben tener humedad libre para germinar e infectar. La penetración puede ser directa, a través de heridas o por estomas (Agrios, 2005., Pansare, 2013). Las lesiones ocasionadas por *Alternaria* se observan con frecuencias en hojas adulta más que en jóvenes (Shtienberg, 2013., Pansare, 2013 y Agrios, 2005).

Generalidades del Control Biológico de Enfermedades

Se entiende por control biológico la supresión de las actividades de organismos perjudiciales mediante la acción de uno o más microorganismos, a menudo referido como enemigos naturales, logrado mediante la manipulación del ambiente, del hospedero o de los antagonistas del patógeno que se quiere controlar o simplemente ocurre de manera natural en pequeña escala. En su definición más sencilla, significa la regulación de un organismo como consecuencia de la actividad de otro, lográndose con ello un equilibrio poblacional (Bardin *et al.*, 2015).

Se puede dividir en **control biológico natural**; es un fenómeno que ocurre de manera espontánea, ocasionado por cualquier acción antagónica entre individuos por medio de enemigos naturales, y **control biológico aplicado** en el cual el hombre utiliza técnicas que incluyen la manipulación de esos agentes naturales aumentando su población, para reducir las pérdidas en agricultura (Rogg, 2000).

Basado en lo anterior, el control biológico de patógenos de plantas consiste en la utilización de microorganismos naturales (autóctonos) o introducidos que interfieran con el desarrollo o supervivencia de un patógeno, para reducir su efecto perjudicial, favoreciendo al mismo tiempo el desarrollo de microorganismos beneficiosos para las plantas (Heydari y Pessarakli, 2010., Pal y Gardener, 2006).

Para la aplicabilidad del control biológico de enfermedades es necesario estudiar las interacciones ecológicas microbianas existentes sobre las plantas en raíces, tallos, hojas, flores, semillas o frutos. Principalmente aquellas que inhiban o dificulten de algún modo la acción de los patógenos (Vero y Mondino, 2002., Vacheron *et al.*, 2013). Entre las ventajas del control biológico están, su bajo costo, no presenta problemas de residuos ni contaminación, la resistencia por parte de los patógenos es muy bajas, además reduce de manera sustancial el uso de plaguicidas (Guédez, 2009., Nega, 2014).

Sin embargo, la mayoría de los resultados disponibles han sido obtenidos *in vitro* y bajo condiciones controladas, observándose inconsistencia de los agentes de control biológico de fitopatógenos cuando se introducen en condiciones de campo, siendo menos efectivos o completamente ineficaces, contrastando con la efectividad mostrada en condiciones controladas. Esta variabilidad generalmente se atribuye a variaciones climáticas (temperatura, humedad relativa y radiación) encontradas en campo, falta de competencia ecológica (supervivencia, capacidad de colonización) del agente de control biológico, rasgos intrínsecos del microbio antagonista (producción variable de los metabolitos requeridos o enzima) y/o una calidad inestable del producto formulado (Heydari y Pessarakli, 2010., Nega, 2014., Bardin *et al.*, 2015) . El éxito del control biológico es difícil de medir, desde el punto de vista ecológico, aunque en línea general se considera exitoso cuando la especie introducida logra establecerse por sí misma sin dañar el ecosistema (Bautista, 2006).

En términos económicos los beneficios son tan atractivos como los ecológicos. Se ha calculado que existe un retorno aproximado por cada dólar invertido en biocontrol de fitopatógenos en relación 30:1, mientras que para el control químico la relación es de 5:1. Esta relación beneficio/costo para un control biológico exitoso demuestra ser muy alta, evidenciándose que los programas de biocontrol son beneficiosos tanto ecológica como económicamente (Guédez *et al.*, 2008).

Para tener éxito en un manejo integrado de enfermedades donde se incluya al control biológico, es necesario comprender los mecanismos mediante los cuales los antagonistas ejercen su acción, para potenciar el control, con el fin de que sea exitosa la colonización de semillas, raíces, hojas, tallos y heridas por parte de los biocontroladores y así éstos protejan a la planta de agente infeccioso ya sea por competencia de nutrientes esenciales, producción de antibióticos, estimulación a través de fitohormonas entre otros, para ello

se debe multiplicar estos microorganismos o biocontroladores con la finalidad de aumentar su población natural en el suelo o filoplano y así ejerzan su acción controladora eficazmente (Bardin *et al.*, 2015., Nega, 2014., Pal y Gardener, 2006., Vero y Mondino, 2002).

Dentro del grupo de microorganismos para ser utilizados como biocontrolador de fitopatógenos, las bacterias juegan un papel importante, siendo las rizobacterias las más promisorias, competitivamente colonizan las raíces de las plantas y estimulan su crecimiento, reduciendo la incidencia de enfermedades a través del control de fitopatógenos de suelo y aéreos, denominadas PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) por sus siglas en inglés (Kumar y Sharman 2017., Pravin *et al.*, 2016., Kloepper *et al.*, 1978).

El término PGPR derivado por Kloepper y Schroth (1978) hace referencia a un grupo de bacterias de la rizosfera competentes para colonizar el entorno radicular las cuales le proporcionan a las plantas nutrientes esenciales o mejoran su disponibilidad, además juegan un papel en la supresión de patógenos y mejoran las condiciones del suelo a largo plazo.

Se han reportados varios géneros de PGPR destacando *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* y *Serratia* que mejoran el crecimiento de la planta y suprimen fitopatógenos (Sayyed *et al.*, 2005; Sayyed y Patel 2011; Sayyed *et al.*, 2012, Glick, 2012., Saharan y Nehra 2011).

Rizosfera

La estrecha zona de suelo que rodea directamente el sistema radicular se conoce como rizosfera, área de intensa actividad biológica y química influenciada por los compuestos exudados por la raíz, que incluyen ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos y pequeños péptidos y metabolitos secundarios los cuales modifican las propiedades químicas y físicas del suelo, por lo tanto, regula la estructura de la comunidad microbiana en las inmediaciones de la superficie de la raíz actuando como atrayentes químicos para un gran número de microorganismos, de hecho, los flujos de carbono son determinantes críticos de la función de la rizosfera, aproximadamente el 5-21% del carbono fijado fotosintéticamente se transporta a la rizosfera a través de las exudaciones. Así mismo,

algunos de los exudados actúan como repelentes contra ciertos microorganismos (Berendsen *et al.*, 2012., Walker *et al.*, 2003., Mommer *et al.*, 2016).

La composición de estos exudados depende del estado fisiológico y de las especies de plantas y microorganismos. La actividad microbiana en la rizosfera afecta los patrones de enraizamiento y el suministro de nutrientes disponibles en las plantas, modificando así la calidad y cantidad de exudados de raíz. Una fracción de estas pequeñas moléculas orgánicas derivadas de plantas es metabolizada como fuentes de carbono y nitrógeno por microorganismos cercanos (Kang *et al.*, 2010). Las moléculas exudadas pueden afectar las poblaciones bacterianas de la rizosfera, actuando como moléculas de señal y nutrientes. A través de sus efectos nutritivos, los exudados afectarán la estructura de las comunidades microbianas del suelo, favoreciendo la división celular de las bacterias capaces de catabolizarlas (Li *et al.*, 2016).

Se considera la rizosfera una zona de intensa actividad microbiana, cuya influencia estimula el crecimiento y aumenta la densidad de microorganismos entre 10^2 a 10^3 veces respecto al resto del suelo. Las bacterias presentes en esta zona son llamadas rizobacterias, las cuales son capaces de colonizar el interior o exterior de las raíces y se puede dividir las que son simbióticas con la planta y las que no. Estas últimas, llamadas bacterias de vida libre, las cuales están estrechamente asociadas con la superficie de la raíz o residen dentro de las raíces como endofíticas (Kloepper *et al.*, 1999., Mommer *et al.*, 2016).

Mecanismos acción mediados por microorganismos PGPR

Los microorganismos benéficos asociados a las plantas tienen efectos positivos en el crecimiento de las mismas, clasificándose en directos e indirectos, la diferencia entre ambos no siempre es evidente. Por otro lado, estos microorganismos también pueden ser clasificados según la acción promotora que ejerzan sobre las plantas como: biofertilizantes, fitoestimulantes, rizoremediadores y biocontroladores. Un agente de control biológico, puede operar a través de varios mecanismos expresados sucesivamente, simultáneamente o sinérgicamente dependiendo de las condiciones ambientales existente (Hayat *et al.*, 2010, Goswami *et al.*, 2016).

Los mecanismos directos ocurren dentro de la planta y actúan sobre su metabolismo favoreciendo la adquisición de nutrientes por las raíces, a través de la fijación libre de nitrógeno atmosférico, solubilización de fosfato mineral, producción de hormonas

vegetales que favorezcan el desarrollo, entre otras. Los indirectos ocurren fuera de la planta y hacen referencia al control biológico de patógenos, sin embargo, el efecto benéfico ocurre a través de varios mecanismos de manera simultánea, además no está implicada el efecto de una sola cepa o género bacteriano (Compant *et al.*, 2005 y Olanrewaju *et al.*, 2017).

Para el control de fitopatógenos los microorganismos biocontroladores presentan de manera general tres alternativas; actuando directamente sobre el patógeno, a través de antibiosis, enzimas líticas, competencia por el nicho ecológico, o parasitismo; en segundo lugar, interfiriendo con los mecanismos de patogénesis del patógeno a través de moléculas detoxificadoras o sideróforos y en tercer lugar, modificando la interacción del patógeno con la planta, mediante la inducción de resistencia sistémica. Estos modos de acción no son incompatibles, pueden ser complementarios y una sola especie o una sola cepa puede actuar con varios de estos modos de acción. (Beneduzi *et al.*, 2012 y Vejan *et al.*, 2016).

Los mecanismos de biocontrol incluye un conjunto de reacciones metabólicas, bioquímicas, mecánicas y/o físicas que de manera natural se desarrollan articulada o individualmente desencadenando la inhibición de la expresión de un patógeno por parte de otro en un ambiente determinado con el fin de lograr la eliminación parcial o total de este sin emplear agentes químicos que causen efectos adversos, dicho conjunto de reacciones es aprovechado para la utilización de ciertos microorganismos como biocontroladores (Beneduzi *et al.*, 2016., Ahemad y Kibret, 2014., Vale *et al.*, 2016).

Competencia por el hierro y producción de sideróforos

En estos procesos, el hierro participa como cofactor de muchas enzimas del metabolismo y proteínas reguladoras. Sin embargo, este elemento no siempre está disponible para ser aprovechado por las bacterias, debido a que en el medio ambiente el oxígeno atmosférico produce la oxidación de Fe^{+2} (ferroso) a Fe^{+3} (férrico), precipitando este último como hidróxido férrico que no es biológicamente accesible para los microorganismos debido a su constante de solubilidad (Ammari y Mengel, 2006., Shaikh y Sayyed, 2015).

Frente a esta dificultad, las bacterias han desarrollado distintos mecanismos de captación de hierro, siendo uno de los más eficiente y estudiado son los sideróforos, moléculas orgánicas de bajo peso molecular solubles en soluciones acuosas a pH neutro que se unen al hierro con alta afinidad (Chincholkar *et al.*, 2000). En condiciones de escasez de hierro

las bacterias producen y liberan al medio extracelular sideróforos los cuales secuestran el hierro, formando un complejo hierro-sideróforo. El complejo es reconocido por receptores de la membrana específicos, atravesando la misma por un sistema de transporte activo (Kumar y Sharman, 2017., Chincholkar *et al.*, 2007).

Cuando el sideróforo se acopla con el hierro, este último se hace inaccesible para los microorganismos patógenos que no poseen los receptores proteicos específicos para reconocer el complejo y que además no tengan mecanismos propios tan efectivos para la adquisición del mismo. Un buen agente de control biológico produce sideróforos fuertes, capaces de quelar el hierro presente en la rizósfera de manera competitiva, así mismo es competente en utilizar los complejos sideróforo-hierro producidos por microorganismos, limitando aún más el acceso de los fitopatógenos a este nutriente. A su vez la producción de sideróforos puede promover la resistencia sistémica inducida (SIR) jugando un papel doble en la supresión de enfermedades por privación de hierro a los patógenos localmente e inducción de resistencia en la planta (Chincholkar *et al.*, 2007., Faraldo, 2007).

Se ha demostrado que la concentración de este complejo es en ocasiones lo suficientemente alta para beneficiar la nutrición de las plantas, las cuales se presumen tienen la habilidad de aceptar el hierro derivado de los complejos sideróforo bacteriano-hierro. De hecho, los exudados radicales, particularmente los compuestos fenólicos, tienen un efecto importante en la proliferación de microorganismos productores de sideróforos en la rizosfera de las plantas, especialmente en situaciones de baja disponibilidad de hierro (Sayyed *et al.*, 2013., Chincholkar *et al.*, 2007).

Antibiosis

Se considera uno de los principales mecanismos de biocontrol, caracterizándose por la inhibición o destrucción de un microorganismo por los productos metabólicos de otros, basándose en la secreción de moléculas de amplio espectro capaces de eliminar o disminuir el crecimiento de algunos patógenos de plantas (Saraf *et al.*, 2014).

Son un grupo químicamente heterogéneo, de bajo peso molecular, secretados por PGPR a través de vías metabólicas secundarias, los cuales suelen ser perjudiciales a patógenos afectando el crecimiento o las actividades metabólicas; incluyen compuestos volátiles tóxicos y antibióticos. Los mecanismos de acción de estos metabolitos incluyen: inhibición de síntesis de pared celular, desestabilización estructural de la membrana

celular e inhibición de la formación del complejo de iniciación de la traducción de los fitopatógenos (Beneduzi *et al.*, 2012).

Diversos autores han planteado que la capacidad de las cepas de *Pseudomonas* spp. de suprimir el desarrollo de patógenos en la rizósfera, depende en gran medida de su habilidad para producir metabolitos de naturaleza antibiótica, tales como pyoluteorina, pyrrolnitrina, fenacina-1-ácido carboxílico y 2.4 diacetyl-phloroglucinol (Lara y Ferrera-Cerrato, 2007., Pal y Gardener, 2006).

Los antibióticos producidos por microorganismos han demostrado ser particularmente eficaces en la supresión patógenos de plantas, observándose supresión del crecimiento tanto *in vitro* como *in situ*. Para ser efectivo, los antibióticos deben ser producido en cantidades suficientes cerca del patógeno, así mismo la capacidad de producir múltiples clases de antibióticos, mejoran la capacidad biocontroladora de las PGPR (Nega, 2014).

Numerosos tipos de antibióticos se han aislado de cepas fúngicas y bacterianas y esta diversidad incluye mecanismos de acción que inhiben la síntesis de las paredes celulares del patógeno, influyen en las estructuras de membrana de las células e inhiben la formación de complejos de iniciación en la pequeña subunidad del ribosoma (Maksimov *et al.*, 2011).

Enzimas líticas

Diversos microorganismos producen y liberan enzimas líticas que puede hidrolizar una amplia variedad de compuestos poliméricos, incluyendo quitina, proteínas, celulosa, hemicelulosa entre otras. (Bull *et al.*, 2002). Uno de los principales mecanismos utilizados por los agentes de control biológico para controlar los patógenos fúngico implica la producción de enzimas de degradación de la pared celular como β -1,3-glucanasa, quitinasa, celulasa y proteasa las cuales ejercen un efecto inhibitorio directo en el crecimiento de hifas degradando la pared celular (Goswami *et al.*, 2016).

La quitina es hidrolizada por un complejo quitinasa que comprende tres enzimas exoquitinasa, endoquitinasa y quitobiasa, la primera libera dímeros solubles de bajo peso molecular, la segunda multidímeros de N-Acetil glucosamina y la última hidroliza quitobiasas de N-Acetil glucosamina (Dahiya *et al.*, 2006).

Las bacterias producen quitinasas principalmente para degradar quitina y usarla como fuente de energía. Algunas especies de PGPR producen enzimas que pueden lisar la pared celular de fitopatógenos fúngicos. Una variedad de microorganismos presenta actividad hiperparasitaria, atacando patógenos mediante la excreción de hidrolasas de la pared celular siendo agentes potenciales para el control biológico de enfermedades de plantas (De la Cruz *et al.*, 1992., Hoster *et al.*, 2005).

Estas enzimas pertenecen a muchas especies bacterianas, entre las más conocidas se encuentran los géneros *Aeromonas*, *Serratia*, *Myxobacter*, *Vibrio*, *Streptomyces* y *Bacillus* (Hoster *et al.*, 2005).

La capacidad de producir quitinasas extracelulares se considera crucial para las PGPR *Serratia marcescens* y *Paenibacillus* sp en el control de *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* f. sp *cucumerium* respectivamente (Ordentlich *et al.*, 1988. Compant *et al.*, 2005).

Así mismo, *Lysobacter* sp. produce grandes cantidades de enzimas líticas, demostrando ser eficaces en la supresión de patógenos fúngicos de plantas. La enzima β -1,3-gluconasa juega un papel importante en las actividades de biocontrol de *Lysobacter enzymogenes* (Palumbo *et al.*, 2005).

Solubilización de fosfatos

Más del 90% del fósforo inorgánicos u orgánico presente en el suelo se encuentra en forma de fosfatos de inositol, fosfomonoésteres y fosfotriésteres los cuales son insolubles y no asimilables por las plantas. El manejo del fósforo en el suelo es difícil debido que reacciona rápidamente con Ca^{+2} y Mg^{+2} en suelos alcalinos y Fe^{+3} Al^{+3} en suelos ácidos, precipitando e inmovilizándose, convirtiéndose esto es un problema desde el punto de vista nutricional, ya que las plantas necesitan fósforo inorgánico de tipo ortofosfato, procedentes de la mineralización de materiales orgánicos y solubilización de fuentes minerales (Vikram y Hamzehzarghani, 2008., Sharpley, 2012., Gojon *et al* 2009., Pérez *et al.*, 2014).

Las bacterias PGPR son capaces de solubilizar fosfatos a partir de compuestos insolubles, poniéndolo a disposición de la planta, dándole ventajas frente a todas las plantas que carecen de microbiota capaz de solubilizar este elemento, conociéndose como PSB

(Phosphate Solubilizing Bacteria) (De Souza *et al.*, 2015). Los géneros más estudiados con esta cualidad son; *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Aerobacter*, *Arthrobacte*, *Enterobacter*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Azotobacter*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* y *Erwinia* (Khan *et al.*, 2010., Kishore *et al.*, 2015)

Las PSB mineralizan fosfato orgánico insoluble por medio de enzimas extracelulares como; fosfatasas no específicas, fitasas, fosfonatasas y C-P liasas (Lugtenberg y Kamilova, 2009). Sin embargo, utilizan otros mecanismos para la solubilización de fósforo inorgánico a través de la síntesis de ácidos orgánicos de bajo peso molecular producidos en el metabolismo de los azúcares. Los microorganismos utilizan los azúcares que toman de los exudados de las raíces de las plantas, lo metabolizan y liberan ácidos orgánicos como el ácido butírico, oxálico, succínico, málico, glucónico, acético, láctico, cítrico, entre otros, que actúan como quelantes de los cationes de calcio (Ca^{+2}) principalmente, aunque también hierro (Fe^{+3}) aluminio (Al^{+3}) y magnesio (Mg^{+2}), es decir, quelatan cationes unidos al fosfato haciéndolo disponible. Estos mecanismos de solubilización y mineralización pueden coexistir y trabajar de manera concomitante dentro de la misma especie de PBS (Goswami *et al.*, 2014, Khan *et al.*, 2014., Vyas *et al.*, 2009).

Competencia

Es un importante mecanismo de acción antagonista, definiéndose como el desigual comportamiento de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando su utilización por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. Un factor esencial para que exista competencia es que haya “escasez” de un elemento; si hay exceso, no hay competencia. La competencia más común es por nutrientes, oxígeno o espacio (Fernández-Larrea, 2001).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Lugar de estudio

La capacidad antagónica de las rizobacterias se evaluó en dos fases, la primera, *in vitro*, sobre los patógenos *Alternaria alternata* y *Botrytis cinerea*, realizado en el Laboratorio de Bacterias Fitopatógenas de la Facultad de Agronomía (FAGRO), Universidad Central de Venezuela (UCV). La segunda, en condiciones de campo, midiendo la actividad biocontroladora sobre *Botrytis cinérea* y la capacidad de las bacterias como promotoras del crecimiento vegetal en gerbera. Ambos ensayos fueron realizados en la Finca MONVERANA C.A, ubicada en Pozo de Rosa, Municipio Guaicupuro, Los Teques, estado Miranda, la cual presenta zona de relieve montañoso, con temperaturas que oscilan entre los 8 C° y 30 C°, siendo la media 22 C° con altitud 2.098 msnm.

La identificación molecular y mecanismos de acción de las rizobacterias se realizaron en el Laboratorio de Virología y Biotecnología Vegetal, del Centro de Microbiología y Biología Celular del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC)

2. Procedencia de Bacterias antagónicas y patógenos fúngicos.

Se tomaron muestras de gerberas provenientes de la finca Monverana C.A empleando la técnica descrita por López y López (1990), seleccionando al azar una unidad de aproximadamente 250 m² de la casa de cultivo, la cual se dividió en cinco sub-unidades de muestreo de 50 m² cada una, tomando en cuenta que el conjunto de plantas fuese visualmente parecido, con el mismo vigor, tiempo de desarrollo, ubicadas en el mismo tipo de sustrato y bajo las mismas prácticas agronómicas. Se recolectaron dos plantas representativas de cada unidad de muestreo utilizando la técnica en zig-zag, con el fin de realizar los asilamientos de rizobacterias a partir de las plantas de gerbera.

Para el estudio, se utilizó la cepa 24 de *Pseudomonas fluorescens* aislada de la rizósfera de tomate, suministrada por el Laboratorio de Bacterias Fitopatógenas, de FAGRO-UCV, la cual en estudios previos mostró capacidad antagónica a *Ralstonia solanacearum* (Mejias y Hernández, 2010).

Los hongos fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata*, se aislaron de plantas de gerbera proveniente de la Finca Monverana que mostraron síntomas característicos de la enfermedad.

3. Aislamientos de bacterias rizosférica

Para aislar y seleccionar las posibles bacterias antagonistas a *Alternaria alternata* y *Botrytis cinerea* a partir de suelo rizosférico de plantas de gerbera, se empleó la metodología señalado por Gómez *et al.*, (2005) con algunas modificaciones, para ello se preparó solución salina (SS) al 0,85% esterilizándose en autoclave a una temperatura de 121 °C y 15 lb/pulg² de presión por 20 min. Con ayuda de un pincel se desprendió el suelo adherido a las raíces de las plantas de gerbera, este suelo fue pesado en muestras de 5 g, y colocadas en Erlenmeyer que contenía 45 mL de SS, agitando por 10 min hasta obtener una solución homogénea, constituyendo esta la solución madre de cada muestra.

De cada solución madre, se extrajo 0,5 mL con pipeta los cuales fueron depositados en tubo de ensayo que contenía 4,5 mL de SS, para así obtener la dilución 10^{-1} , haciendo diluciones seriadas hasta 10^{-7} . Posteriormente se tomó 0,1 mL a partir de la dilución 10^{-4} hasta 10^{-7} sembrándose por extensión en superficie en placas de Petri con medios de cultivo Agar Nutritivo (AN) y B de King (BK). Para cada dilución se realizaron cuatro replicas.

Se rotularon e incubaron las placas por 48 horas a 28 °C. Luego de este tiempo se observó el crecimiento y se seleccionaron aquellas bacterias que crecieron desarrollando halo de inhibición a otras bacterias, las que presentaron un alto número de colonias y aquellas que al colocarlas en luz UV se observaron fluorescentes en el medio BK. De estas colonias se tomó una ansada y se realizó un estriado por agotamiento en los medios antes mencionados con tres réplicas por cada una, para de esta manera obtener colonias aisladas y posteriormente cultivos puros. Los aislamientos fueron conservados en tubos eppendorf que contenían agua destilada estéril (ADE) para su posterior confrontación con los patógenos en estudio.

4. Aislamientos de *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata*

Para la obtención de los aislamientos de *Alternaria alternata* y *Botrytis cinerea* se seleccionaron muestras de gerberas que presentaron síntomas iniciales y/o típicos de las enfermedades causadas por cada uno de los patógenos mencionados.

Para el aislamiento de *Botrytis cinerea* se siguió la metodología de Martínez y Moreno (2008) con modificaciones. Se tomaron trozos de pétalos de gerberas con síntomas típicos, los cuales fueron lavados con abundante ADE, y secados con papel de filtro, luego se incubaron en cámara húmeda durante 72 h con temperatura de 16°C. La cámara

consistió en cápsulas de Petri que contenían dos capas de papel absorbente embebidas en 8 mL de ADE. Los pétalos fueron colocados dentro de la cámara sobre lámina porta objeto. Todos los implementos utilizados fueron esterilizados en autoclave a una temperatura de 121 C° y 15 lb/pulg² de presión por 20 min. Se realizaron observaciones diarias para evidenciar la esporulación del patógeno.

Transcurrido 72 h se seleccionaron secciones esporuladas, teniendo en cuenta que no hubiesen microorganismos contaminantes, para ello se observó bajo microscopio estereoscópico, posteriormente se tomaron conidios de dichas secciones con la ayuda de aguja histológica estéril la cual contenía un trozo de agar para facilitar el agarre de los conidios, finalmente se colocó el fragmento agarizado en capsula de Petri contentiva de Papa Dextrosa Agar (PDA). Incubando a 12,5°C ± 2°C, con 12 horas de luz blanca fluorescente y 12 horas de oscuridad en cámara de crecimiento, durante 10 días.

Para el caso de *Alternaria alternata* se siguió la metodología de Castell y Escallón (2009) con modificaciones. Los tejidos sintomáticos de las hojas afectadas se desinfestaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 2 min, luego se lavaron con ADE y se secaron con papel de filtro estéril. Se seccionó en trozos de 5 mm al nivel del margen de la infección, colocándolos en PDA en forma de cruz de modo equidistante. Se incubaron a 25 ± 1 ° C durante 10 días.

5. Prueba de patogenicidad de *Alternaria alternata* y *Botrytis cinerea*

Una vez obtenidas colonias puras de cada uno de los patógenos se procedieron a evaluar la patogenicidad de los mismos.

El inóculo se preparó utilizando cultivos puro sembrados previamente en PDA 10 días antes. Se vertió en el interior del cultivo puro 20 mL de ADE y con ayuda de lámina portaobjeto se raspó la superficie de las colonias para desprender las estructuras del medio de cultivo. Las suspensiones se filtraron a través de dos capas de gasa estéril y se determinó la concentración por el método de conteo directo con la ayuda de la cámara de Neubauer (French y Hebert, 1982), ajustándose a 8x10⁵ conidios/mL para ambos patógenos.

La suspensión de esporas de *A. alternata* se asperjaron sobre hojas maduras de plantas de gerberas a la cual se le realizó heridas con alfiler, incubándolas en cámara humedad a 22 °C y 100% de humedad relativa, durante 48 horas. Con respecto a *Botrytis cinerea* se

asperjó la suspensión de conidios en flores de gerberas de diferentes variedades completamente expandidas colocándose en nevera de crecimiento a 15 °C y 95% humedad relativa durante 8 días. Para ambos casos se dejó como testigo plantas tratadas sólo con agua destilada y colocadas bajo las mismas condiciones. Se realizaron evaluaciones diarias hasta la aparición de los síntomas.

La identificación de los patógenos fue realizada tomando en cuenta las características morfológicas observadas en los aislamientos y comparándolas con las existentes en la literatura. Las tinciones se hicieron con azul de algodón. El procesamiento de las muestras se realizó en el Laboratorio de Bacterias Fitopatógenas FAGRO-UCV.

6. Confrontación *in vitro* de los aislamientos bacterianos con *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata*.

Para determinar el efecto antagónico de los aislamientos bacterianos seleccionados se realizaron ensayos *in vitro* siguiendo la metodología de cultivo dual descrita por Basha y Ulaganathan (2002) con algunas modificaciones.

Los hongos fitopatógenos fueron sembrados previamente en medio PDA durante 12 días. *Alternaria alternata* se incubó a $26\text{ C}^{\circ} \pm 2\text{ C}^{\circ}$ y *Botrytis cinerea* $13\text{ C}^{\circ} \pm 2\text{ C}^{\circ}$, ambos bajo 12 horas de luz blanca fluorescente, alternado con 12 de oscuridad. Los aislados bacterianos se sembraron en Agar Nutritivo, incubándolos por 48 h a 20 C° , luego fueron desprendido del medio, agregando 20 mL de ADE, obteniendo suspensiones bacterianas, ajustando la concentración celular a 10^8 cel/mL, tomando como referencia el tubo 2 de la escala Mc Farland.

Posteriormente se extrajo un fragmento del hongo utilizando un obturador de 5 mm de diámetro colocándolo en el centro de cada una de las capsulas contentivas con PDA y sembradas previamente por extensión en superficie con 100 µL de las bacterias a evaluar. Los ensayos fueron incubados para el caso de *A. alternata* a $26\text{ C}^{\circ} \pm 2\text{ C}^{\circ}$ y *B. cinerea* $13^{\circ} \pm 2\text{ C}^{\circ}$. El tratamiento control consistió en colocar el patógeno sin bacterias, y estas últimas sembradas por extensión en superficie en PDA. Se realizaron cinco repeticiones por tratamiento.

Se realizaron observaciones diarias, hasta que el testigo cubrió por completo la capsula de Petri. El efecto antagónico de las bacterias se determinó a través de mediciones del

diámetro de crecimiento del hongo, porcentaje de esporulación y efecto sobre las características morfológicas de los conidios.

Fórmulas utilizadas para medir el efecto antagónico;

Porcentaje de inhibición del crecimiento:

$$PIC = \frac{(\text{crec. del testigo} - \text{crec. del tratamiento})}{(\text{Crecimiento del testigo})} \times 100$$

Porcentaje de inhibición de esporulación:

$$PIE = \frac{(\text{esporulación del testigo} - \text{esporulación del tratamiento})}{(\text{Esporulación de testigo})} \times 100$$

7. Evaluación en casa de cultivo de los aislamientos bacterianos más promisorios *in vitro* sobre el efecto de *Botrytis cinerea* en plantas de gerbera.

Se realizó utilizando la metodología propuesta por Mariano *et al.*, (2005) con algunas modificaciones, para ello se seleccionaron las tres bacterias antagónicas que *in vitro* inhibieron el crecimiento y esporulación de *B. cinerea* y *A. alternata* en mayor porcentaje para ello, se preparó una mezcla de las tres (3) bacterias a igual concentración y volumen. Dichas bacterias fueron aplicadas foliarmente con asperjadora de espalda a concentración 10^8 cel/mL (Barret, 1975), durante 4 semanas, favoreciendo el establecimiento de las misma en el cultivo. Posteriormente las plantas de gerberas fueron inoculadas con el patógeno. Los conidios fueron asperjados con concentración de 10^5 UFC/mL sobre flores de gerberas. Las plantas fueron tratadas semanalmente con las suspensiones bacterias antagonistas a la concentración ante mencionada. El ensayo se realizó bajo un diseño completamente aleatorizado con 6 repeticiones por tratamiento, siendo la unidad experimental la planta de gerbera. El ensayo se desarrolló en casa de cultivo comercial de la Finca MONVERANA C.A, ubicada en Pozo de Rosa, Los Teques, estado Miranda. Las condiciones de temperatura y humedad relativa promedio durante el desarrollo del ensayo fueron de 12-22 °C y 75% - 98% HR respectivamente.

Se dejó como testigo plantas inoculadas sólo con el patógeno sin la aplicación de los biocontroladores. El tiempo de evaluación fue de 21 días continuos posterior a la aparición de los síntomas en las plantas inoculadas sólo con los patógenos, los tratamientos quedaron conformados de la siguiente manera (Cuadro 2).

Cuadro 2. Tratamientos con bacterias antagonistas en condiciones de casa de cultivo comercial para el control de *Botrytis cinerea*, en el cultivo de gerbera.

Tratamiento	Descripción
T1	Plantas de gerbera inoculadas con <i>Botrytis cinerea</i> (tratamiento testigo)
T2	Plantas de gerbera inoculadas con <i>B. cinerea</i> y tratadas con bacteria antagonista 1
T3	Plantas de gerbera inoculadas con <i>B. cinerea</i> y tratadas con bacteria antagonista 2
T4	Plantas de gerbera inoculadas con <i>B. cinerea</i> y tratadas con bacteria antagonista 3
T5	Plantas de gerbera inoculadas con <i>B. cinerea</i> y tratadas con mezcla bacteriana 1:1:1 de bacterias antagonista 1,2 y 3

Las plantas inoculadas con el patógeno y no tratadas con bacterias antagónicas se utilizaron con el fin de obtener un patrón de aparición de la enfermedad (tratamiento testigo). La efectividad de las bacterias antagonistas se evaluó a través de la severidad de la enfermedad, utilizando escalas para cada una de ellas (cuadro 3). Para confirmar la presencia del patógeno se realizaron aislamientos de los diferentes síntomas mostrado por el cultivo.

Cuadro 3. Escala de valoración de 0 a 6 para medir la severidad del moho gris en flores de gerbera, tomando en cuenta la afección y la esporulación del patógeno sobre el tejido.

Grado	Descripción	% de Infección
0	Flor sin síntomas	0%
1	Pétalos ligeramente oscurecidos	0,1 – 20%
2	Pétalos con anillo interno y externo oscurecidos	20,1 – 45%
3	Pétalos con anillos interno y externo oscuros	45,1 – 75%
4	Pétalos, receptáculo y brácteas oscurecidos	≥75%
5	Pétalos, Receptáculos y brácteas ligeramente esporulados	≤50%
6	Flor fuertemente esporulada	≥50,1%

Tomado de Ahmad *et al*, 2013, con algunas modificaciones.

8. Evaluación en casa de cultivo del efecto de las rizobacterias más promisorias *in vitro* como antagonistas, sobre algunas variables de crecimiento y rendimiento en plantas de gerbera.

Se empleó la metodología de Mariano *et al.*, (2005) modificada, preparando suspensiones de las tres rizobacterias más promisorias como biocontroladoras a concentración de 10^8 cel/mL (Barret, 1975), utilizando cultivos puros de 48 horas de crecimiento, las cuales se aplicaron semanalmente a plantas de gerbera dirigido al sustrato, utilizando un volumen de 200 mL de solución bacteriana dejando 6 repeticiones por tratamiento (Cuadro 4). Las variables evaluadas fueron: entrada (inicio) de producción, longitud del pedúnculo, diámetro de flor, número de flor por planta, y duración postcosecha. Se dejó

un tratamiento control, al cual sólo se aplicó agua corriente. Los tratamientos fueron aplicados una semana luego del trasplante, tomando notas de la entrada de floración de cada uno de los tratamientos.

La longitud del tallo se registró midiendo desde la base hasta la unión con el receptáculo, y para el diámetro del capítulo se tomó la distancia entre los extremos de las lígulas; (Ortega *et al.*, 2006).

Para medir la producción de flores por planta, estas eran cosechadas semanalmente cuando la inflorescencia presentaba dos o tres filas de flores masculinas abiertas. Con este dato se obtuvo el promedio mensual de flores por tratamiento (Valenzuela, 2001., Ortega *et al.*, 2006).

Para medir la duración postcosecha fueron colocadas las flores en recipientes por separados, según los tratamientos, dejándolos en condiciones de campo registrando humedad y temperatura hasta que estas perdieran turgencia (valor comercial) (Ortega *et al.*, 2006).

Cuadro 4. Tratamientos utilizados para medir la capacidad de promover el crecimiento vegetal de las rizobacterias en condiciones de casa de cultivo.

Tratamiento	Descripción
T1	Plantas de gerberas tratadas con rizobacteria 1
T2	Plantas de gerbera tratadas con rizobacteria 2
T3	Plantas de gerberas tratadas con rizobacteria 3
T4	Plantas de gerberas tratadas con la mezcla de las rizobacterias 1,2 y 3 en relación 1:1:1
T5	Plantas de gerbera tratadas con agua corriente (testigo)

9. Identificación de algunos mecanismos de acción mediados por las bacterias más promisorias *in vitro*.

Producción de Ácido Indol-acético (AIA) por la técnica colorimétrica de Salkowski.

Para cuantificar la producción de AIA por parte 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 5). Se realizaron tres (3) réplicas por concentración. Se dejó reposar por 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente y se leyeron las absorbancias de los

patrones a 530 nm en espectrofotómetro. Con los valores obtenidos se determinó la ecuación que relaciona la concentración de AIA en función de la absorbancia.

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 100 ppm 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.

Cuadro 5. Valores para la elaboración de curva patrón con el fin de medición de concentración de AIA por parte de las PGPR

Concentraciones de AIA para construir curva patrón $\mu\text{g/mL}$	Volumen a medir de la solución stock 3000 $\mu\text{g/mL}$ (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

Producción cualitativa de ácido cianhídrico (HCN)

Se realizó empleando la técnica descrita por Kremer y Souissi (2001) de sellado de capsulas con algunas modificaciones. Para ello se cultivaron las bacterias en agar de soya tripticasa suplementado 4,4 g/L de glicina, luego se colocaron tiras de papel Whatman número 1 de 9 cm de ϕ impregnados previamente con solución de ácido picrato (ácido pícrico al 0.5% en una solución de carbonato de sodio al 2%) en la cubierta de las capsulas

de Petri, sellando con parafilm. Se incubó por 48 horas a 28 C°, luego de este tiempo se observó la producción de HCN, el cual fue evidenciado por el cambio de color del papel con picrato de amarillo citrino a naranja o marrón que se consideró como evidencia de la producción de HCN. Se realizó 4 réplicas por tratamiento.

Producción de Sideróforos

Para determinar la producción de sideróforo por parte de las rizobacterias se utilizaron cápsulas indicadoras de dichos compuestos según el método descrito por Schwyn y Neilands (1987), con modificaciones. Se realizó el medio CAS-agar modificado, preparando varias soluciones, como se describen a continuación:

Solución 1

21,9 mg de CTAB disueltos en 25mL de ADE (removiendo a fuego lento)

Solución 2

1,5 mL FeCl₃ 6H₂O 1mM disuelto en 10mM HCL

Solución 3

2 mM CAS disueltos en 7,5 mL de ADE

Luego se mezcló la solución 3 con la solución 2 para obtener el “producto A” (color púrpura oscuro). Posteriormente se añadió el “producto A” a la solución 1 (color azul oscuro), y se transfirió a Erlenmeyer enrazando a 100 mL con ADE. Seguidamente se preparó 900 mL de medio B de King, y se esterilizó ambos productos por separado a 121 °C y 15 lb/pulg² de presión por 20 min en autoclave. Una vez reposado se transfirió el complejo CAS + Fe³ + Bromuro de hexadeciltrimetilamonio al medio B de King el cual se tornó verde-azulado y fue volcado en cápsulas de Petri.

Posteriormente se inocularon 10 µL del cultivo bacteriano con concentración de 10⁸cel/mL en las cápsulas Petri con CAS-Agar, dejándose incubar por 72 horas a 30°C. Se realizaron 4 réplicas por tratamiento.

La técnica consistió en utilizar un compuesto quelante de hierro, el cromo azurol S (CAS), el cual cambia de color cuando libera el hierro. Ante una actividad quelante fuerte, el hierro se une al quelante en vez de al CAS. Por lo tanto, la producción de sideróforo se detectó por el viraje de color de verde-azulado a amarillo-naranja alrededor de la colonia bacteriana en el medio de cultivo.

Capacidad solubilizadora de fosfatos

Para detectar la capacidad de las bacterias solubilizadoras de fosfato se utilizó la metodología de Corrales *et al.*, 2014. Para ello se sembraron las bacterias en el medio de cultivo selectivo Pikovskaya el cual contiene entre sus componentes 5 g/L de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ como fuente de P insoluble. Se incubaron a 28 °C, la medición se efectuó a los 7 días. Aquellas bacterias que crecieron en el medio y desarrollaron una zona clara alrededor de la colonia fueron consideradas solubilizadoras y evaluadas mediante el índice de solubilización (IS) = diámetro del halo (mm)/ diámetro de la colonia (mm). La capacidad de solubilización se categorizó en tres niveles: bajo (IS < 2mm), intermedio (IS entre 2mm y 4mm) o alto (IS > 4mm). Como control positivo se utilizó la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* Cepa” F1” de la colección del Laboratorio de Bacterias Fitopatógenas, FAGRO-UCV. Se realizaron 4 réplicas por tratamiento. *aeruginosa*

Determinación cualitativa de actividad quitinasa.

Preparación de quitina coloidal

Fueron pesados 2 g de quitina comercial (Sigma®) disueltos en 30 mL de ácido fosfórico 85% (v/v) y llevados a agitación a 4°C durante 48 horas, la solución resultante fue filtrada con ayuda de papel de filtro Whatman® grado 1. Posteriormente, se adicionó 50 mL de etanol acuoso al 50% para generación del coloide. Esta mezcla se llevó a agitación hasta observar una solución homogénea de aspecto coloidal. Posteriormente se realizaron lavados con agua destilada mediante centrifugación a 4500 x g a 8°C por 5 minutos con el fin de eliminar el ácido fosfórico hasta alcanzar un pH cercano a la neutralidad. La pasta obtenida, de consistencia gelatinosa, se esterilizó durante 15 min a 15 psi; luego, se almacenó a 4 °C hasta su posterior uso.

Para determinar la actividad quitinolítica de las rizobacterias se preparó medio basal propuesto por Castañeda-Agulló (1955) con modificaciones 0.3 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3.0 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.0 g de KH_2PO_4 , 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 en 1000 mL de agua destilada, el pH se ajustó a 4.7 con HCL 2M y luego esterilizado en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Las cápsulas fueron volcadas con dicho medio, una vez solidificado se observó una coloración amarilla brillante, con ayuda de 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 μ L de los aislados bacterianos ajustándose a concentración de 10^8 cel/mL. Se incubó a 30°C por 5 días, realizándose cuatro (4) réplicas por tratamiento. El viraje de amarillo brillante a violeta intenso, evidenciaba la propiedad quitinolítica de las rizobacteria (Agrawal y Kotasthane 2013).

10. Identificación genotípica y fenotípica de las 3 cepas más promisorias en el biocontrol en condiciones *in vitro*.

Aislamiento de ADN

Para el aislamiento del ADN de las cepas más promisorias *in vitro* se utilizó la metodología propuesta por Sambrook y Rusell (2001) con algunas modificaciones la cual consistió en lo siguiente.

Se realizó una suspensión de las cepas pura en 1 mL de sulfato de magnesio (10 μ M) centrifugando a 4500 g por 3 minutos, descartando el sobrenadante, luego se resuspendió en 300 μ L de buffer Tris HCl 0,1 M pH 8 y se adicionó 40 μ L de lisozima (20 mg/mL) y 5 μ L de ARNasa (7000 U/mL), seguidamente fueron incubadas y sometidas a diferentes temperaturas (37°C por 5 minutos, -20°C durante 10 minutos y finalmente a 80°C durante 10 minutos, mezclando vigorosamente entre cada incubación). Posteriormente se añadió 5 μ L de proteinasa K (20 mg/mL) e incubó a 60°C por 10 minutos invirtiendo manualmente (10 veces) seguidamente las muestras fueron centrifugadas a 8000 g durante 1 minuto y tomando el sobrenadante sin tocar el botón se transfirió a tubo eppendorf adicionándole 150 μ L de isopropanol absoluto frio -20°C y agitó suavemente.

Posteriormente se incubó durante 30 minutos a -20°C y centrifugó a 10.000 g por 3 minutos eliminando el sobrenadante, el botón se limpió con 300 μ L de etanol 70% agitando por inversión volviendo a centrifugar a 10.000 g durante 4 minutos eliminado perfectamente el sobrenadante. El pellet fue secado a 65 °C por cinco minutos, y luego resuspendido en 50 μ L de agua pura desionizada estéril y conservando a -20 °C para su posterior uso.

Condiciones de PCR

Los cebadores y las condiciones utilizadas para la PCR se tomaron de estudio previo realizado por Weisburg *et al* (1991) con algunas modificaciones. Las condiciones fueron las siguientes: temperatura de iniciación 95 °C (8min) luego se realizaron 35 ciclos de la siguiente manera 95 °C (2min), 42°C (30s) y 72°C (4min) adicional se hizo un ciclo de

72 °C por 10 minutos. Las reacciones se realizaron en un volumen total de 50 µL conteniendo 1 µL de los primers, 0,5 µL de Taq polimerasa platinum, 1 µL de dNTPs, 2 µL de MgCl₂, 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 y el peso molecular usado fue 1 Kb Plus de Thermo Fisher Scientific. La amplificación se realizó en un termociclador Eppendorf Mastercycler EP Gradient S. Los primers utilizados (Weisburg *et al.*, 1991) fueron fD1 (ccgaattcgtcgacaacAGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y rP2 (cccgggatccaagcttACGGCTACCTTGTTACGACTT).

Se tomaron 5 µL de los productos de PCR para la realización de electroforesis en gel de agarosa al 1%. El tamaño aproximado de las bandas que se esperaba era de 1500 pb el cual 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 y posteriormente, con BLAST (*The Basic Local Alignment Search Tool*: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para su alineamiento con la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI). De los valores cuantitativos observados, sólo se consideraron los de mayor identidad.

11. Análisis estadísticos

El diseño experimental fue completamente aleatorizado tanto para los ensayos *in vitro* como *in vivo*. El ensayo *in vitro* constó de dieciséis tratamientos con cinco repeticiones cada uno, la unidad experimental fue la cápsula de Petri la cual contenía 5 discos de papel de filtro. En el caso de los ensayos *in vivo* realizado en casa de cultivo para la evaluación de las rizobacterias como biocontroladoras se realizaron 5 tratamientos con 6 repeticiones cada uno, donde cada planta representó la unidad experimental. La evaluación de las rizobacterias como bioestimulante estuvo conformada por 5 tratamientos con 6 repeticiones, siendo la unidad experimental la planta de gerbera. Para todos los ensayos se efectuó el ANAVAR con un nivel de significancia de 5% utilizando el programa Statistix 8.0. Se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal y Wallis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de *Botrytis cinerea*

El crecimiento de la colonia en el medio PDA a los 15 días después de la siembra presentó las siguientes características. Micelio polvoriento de color blanco a gris pardo con crecimiento radial y presencia de esclerocios negros de tamaño variables con distribución irregular en el medio de cultivo (Figura 1).

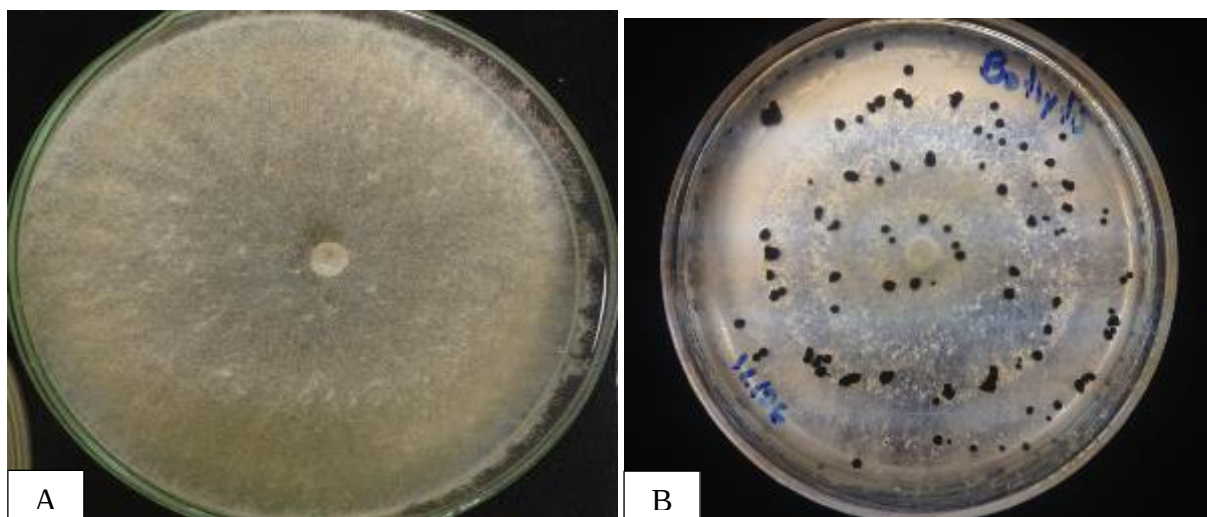


Figura 1. Crecimiento de *B. cinerea* en medio PDA. (A). Micelio algodonoso blanco de 12 días de crecimiento. (B) Formación de esclerocios irregulares en medio PDA

En observaciones al microscopio óptico la colonia presentó las siguientes características; micelio ramificado, septado, subhialino. Conidióforos tricotómicos, ramificados con engrosamiento en los ápices. Conidios ovalados, esféricos o elipsoides, hialinos a pardo (Figura 2).

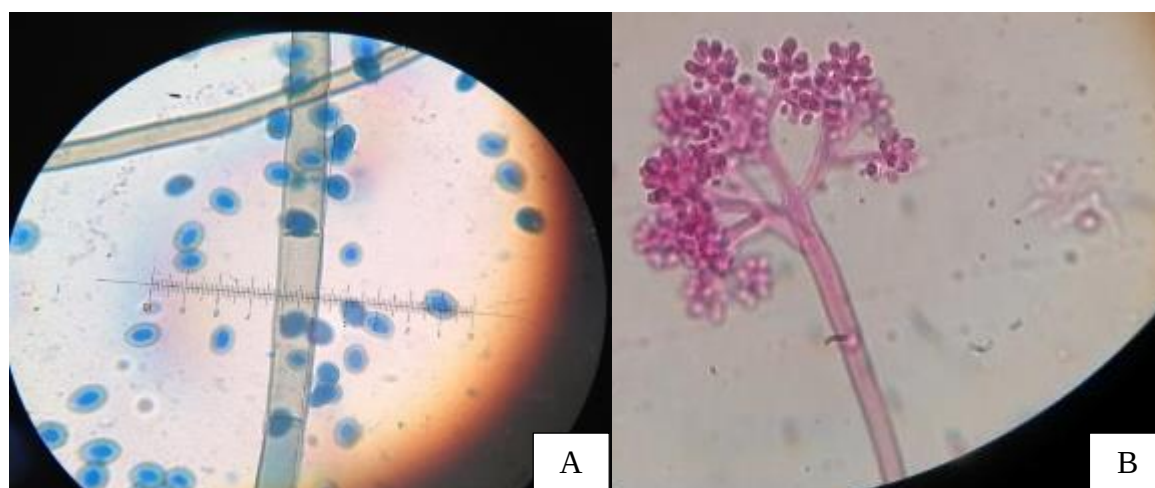


Figura 2. Estructuras de *B. cinerea*. (A) Conidios y micelio de *B. cinerea*. (B) Conidióforos tricotómicos ramificados con conidios.

Estas características concuerdan con las descritas por Latorre *et al.*, (2015) para *Botrytis cinerea* quienes describen que presenta conidios hialinos o levemente coloreadas, unicelulares, ovoides o esféricas, sobre pequeños esterigmas en el extremo de conidióforos ramificados, los cuales son desarrollados libremente. Así mismo, Coley *et al.*, (1980) señalan que *B. cinerea*, presenta conidióforos rectos, ramificados, septados y con engrosamiento en los ápices, sobre los cuales se producen conidios unicelulares, ovalados o elipsoides, hialinos a pardo claros.

Aislamiento de *Alternaria alternata*

El hongo produjo crecimiento micelial en PDA. Inicialmente, el micelio se presentó hialino para luego tornarse de color grisáceo-pardo a los 10 días. Los conidióforos son rectos o curvados de color marrón, geniculados, ligeramente hinchados en el ápice con cicatrices terminales que indican el punto de unión de los conidios. Estos últimos, nacieron en cadenas hasta 10, la mayoría elipsoidales, muriformes con vértices cónicos con 1 a 3 longitudinales y 5-10 septos transversales.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Farhood y Hadian (2012) los cuales identificaron a *A. alternata* en tizones foliares en hojas de gerbera. El hongo creció formando colonias de superficie plana, lisa a lanosa de color gris con las periferias verde oliva después de 10 días, cuando fue sembrado en PDA a 25 ± 1 C°. Los conidióforos eran ramificados, rectos, de color marrón a marrón oliváceo, con una medida de 25-60 μm de largo y 3-3,5 μm de grosor. Los conidios marrones claro y en largas cadenas ramificadas, obclavado o elipsoide en forma de pico cónico corto en la punta, o sin pico. El tamaño de los conidios varió de 20 a 63 μm de longitud y 9-18 μm de ancho presentando de dos a tres septos transversales y 8 a 10 longitudinales.

Prueba de patogenicidad de *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata*

Botrytis cinerea

Transcurridos 5 días de la inoculación, las flores mostraron síntomas iniciales de la enfermedad, observándose pequeñas manchas en forma de diamante o rombo, color canela, posteriormente coalecieron ocasionando necrosis visible en el tejido, las lígulas se observaron completamente afectadas y con esporulación. Ocho días después de la inoculación se evidenció gran parte de la inflorescencia afectada por el patógeno con manchas necróticas distribuidas en todo el capítulo. Al observar las estructuras

esporuladas sobre el tejido, se constató que se trataba de *B. cinerea* comprobándose de esta manera la patogenicidad de las cepas aisladas.

Salinas y Verhoeff (1995) al inocular *B. cinerea* sobre flores de gerbera y en condiciones de 100% de humedad relativa, observaron pequeñas manchas necróticas que al transcurrir los días abarcó mayor cantidad de tejido, que ocasionó descomposición total de las flores y se evidenció alta densidad de inóculo en el tejido.

Por su parte Kerssies (1994) señala que *B. cinerea* puede infectar hojas, tallos, peciolo y flores en gerberas, ocasionando pequeñas manchas las cuales coalescen rápidamente, afectando gran parte del tejido. Así mismo, menciona que las flores infectadas pueden tener senescencia prematura y desplomarse sobre el peciolo, el cual se mantiene firme. Si estos tejidos infectados caen sobre hojas sanas favorecen la dispersión de la enfermedad. Por otro lado, los autores indican que la presencia de esporas en forma latente sobre el tejido afecta la comercialización, debido que durante el almacenamiento el efecto de la temperatura puede contribuir al desarrollo de la enfermedad.

Alternaria alternata

Transcurrido 10 días después de la inoculación se observaron los primeros síntomas de la enfermedad con pequeñas manchas redondas e irregulares de color marrón-rojizo en las hojas más viejas (Figura 3). Las lesiones gradualmente aumentaron de tamaño, algunas coalescieron, evidenciándose anillos concéntricos marrón oscuro con centro más claro rodeado de un halo purpura. Al observar las estructuras en microscopio óptico bajo el objetivo 40x se evidenciaron los conidios de *A. alternata*, comprobándose de esta manera la patogenicidad de la cepa aislada.



Figura 3. Síntomas iniciales en hojas de gerbera ocasionado por de *A. alternata*.

Nagrale *et al.*, (2013) señalaron que los síntomas de *A. alternata* en gerbera inician con la aparición de unas pequeñas puntaciones castañas de aspecto húmedo, que progresivamente aumentan de tamaño. El centro se torna más claro con el tiempo, delimitado por un borde castaño ligeramente rojizo evidenciándose las estructuras del patógeno. Las manchas coalescen llegando a cubrir gran parte de la lámina foliar con anillos concéntricos de color marrón claro a marrón oscuro, pudiendo alcanzar la base foliar, dando al órgano aspecto atizonado. Las hojas mueren sin desprenderse de la planta adquiriendo consistencia apergaminada.

Por su parte Farhood y Hadian (2012) señalan que los síntomas de la enfermedad iniciaron con pequeñas manchas marrones, dispersas por toda la lámina foliar que paulatinamente se vuelven redondas e irregulares de color marrón a negro hundida en ambos lados de la hoja, con presencia de anillos concéntrico rodeado de un halo marrón oscuro. Mencionan que en etapas posteriores de la infección las hojas afectadas se tornan amarillentas las manchas coalescen llegando a cubrir gran parte de la lámina, pudiendo alcanzar la base foliar, dando al órgano aspecto atizonado. Las hojas mueren sin desprenderse de la planta adquiriendo consistencia apergaminada. Así mismo, Bhat *et al.*, (2013) al inocular *A. alternata* sobre hojas de gerberas observaron síntomas similares a los antes descrito en hojas y pedúnculos, sin embargo, las lesiones en los pedúnculos fueron alargadas en lugar de redonda. Estos autores mencionaron que la esporulación del patógeno se comenzó a observar en manchas que apenas alcanzaban 4mm de diámetros.

Selección de Rizobacterias

Se seleccionó un total de 14 cepas bacterianas aisladas de la rizosfera de gerbera, las cuales presentaron una o varias de las siguientes características; alto número de colonia, fluorescencia en el medio Bk y/o halo de inhibición a otras colonias bacterias.

Kloepper *et al.*, (1989) señalaron que las bacterias presentes en la rizosfera de las plantas (PGPR) son conocidas por colonizar rápidamente la rizosfera de la planta, promover el crecimiento y suprimir patógenos. La rizosfera es un nicho ecológico apropiado para múltiples microorganismos que utilizan los exudados de la planta como fuente de carbono y energía.

Al respecto Benítez *et al.*, (2007) estudiaron el efecto biocontrolador de la microflora existente en la rizosfera de *Ornithogalum umbellatum* sobre los fitopatógenos *Botrytis*

cinerea y *Sclerotinia sclerotiorum* logrando aislar 8 morfotipos de levaduras, 5 de bacterias y 9 de mohos; la mayoría de ellos mostraron antagonismo *in vitro* a los fitopatógenos seleccionados. Del estudio se concluyó que los microorganismos rizosférico podrían ser utilizados como biocontroladores.

Mejías y Hernández, (2010) observaron diferencias estadísticamente significativas entre microorganismos aislados de suelo rizosférico de tomate a suelo no rizosférico, con respecto al número de cepas que resultaron antagonistas a *Ralstonia solanacearum*. Por su parte Sánchez (2007) menciona que el suelo rizosférico tiene características bien diferentes al suelo distante de las raíces, pues en la rizosfera hay mayor concentración de nutrientes orgánicos provenientes de las raíces, los cuales favorecen el crecimiento de los microorganismos tanto benéficos como patógenos de plantas.

Así mismo Sengupta *et al.*, (2015) aislaron bacterias de suelo rizosférico proveniente de campos agrícolas los cuales mostraron múltiples características para promover el crecimiento de plantas, tales como la producción de ácido indol acético, producción de amoníaco, producción de sideróforos y solubilización de fosfatos. De los aislados, las cepas identificadas como *Azotobacter* sp. mostraron los mejores resultados en cuanto al porcentaje de índice de vigor en ensayos de germinación sobre semillas de maíz (*Zea mays*).

Confrontación *in vitro* de rizobacterias con patógenos fúngicos.

Todas las cepas aisladas presentaron capacidad de inhibir la esporulación de *B. cinerea* por encima del 90% (Cuadro 6), siendo la más promisoría la denominada G2 la cual inhibió en su totalidad la esporulación del patógeno (100%), por su parte las cepas G6, G3, y G8, quedaron en un segundo grupo con porcentajes por encima de 99,80%. Con respecto a la inhibición del crecimiento, la cepa G2 logró 100%, seguida de G3 y G4 con 98,44% y 98% respectivamente. Las menos efectivas en el estudio de esta variable fueron G1, G9, G8, G5 y G14 que en promedio inhibieron el crecimiento entre 31% y 77%. (Cuadro 7). La prueba no paramétrica de Kruskal y Wallis arrojó que existen diferencias significativas entre los tratamientos, siendo las 3 cepas más promisorias en la inhibición de la esporulación G2, G3, y G6 y en inhibir el crecimiento G2, G3 y G4. Los resultados sugieren el potencial de estas cepas para ser usadas como biocontroladores del patógeno.

Cuadro 6. Inhibición de esporulación de *Botrytis cinerea* al ser confrontada con rizobacterias aisladas de gerbera.

Tratamiento (Rizobacterias)	Concentración de conidios de <i>Botrytis cinerea</i>	% de inhibición de esporulación
G2	0	100,00 a
G6	$2,4 \times 10^3$	99,93 ab
G3	$2,6 \times 10^3$	99,92 ab
G8	$6,4 \times 10^3$	99,81 ab
G7	$8,8 \times 10^3$	99,73 abc
G4	$1,0 \times 10^4$	99,70 abc
G1	$2,9 \times 10^4$	99,12 abc
G11	$3,2 \times 10^4$	99,03 abc
G12	$3,0 \times 10^4$	99,09 abc
Pseu 3	$5,5 \times 10^4$	98,33 abc
G10	$1,4 \times 10^5$	95,76 abc
G9	$5,2 \times 10^4$	98,42 abc
G13	$6,5 \times 10^4$	98,03 abc
G14	$7,3 \times 10^4$	97,79 abc
G5	$1,4 \times 10^5$	95,76 bc
Testigo	$3,3 \times 10^6$	0,00 c

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

Cuadro 7. Inhibición del crecimiento de *Botrytis cinerea* al ser confrontada con rizobacterias aisladas de gerbera.

Tratamientos (rizobacterias)	Crecimiento de la colonia (cm)	% de inhibición del crecimiento
G2	0,00	100,00 a
G3	0,14	98,44 ab
G4	0,18	98,00 ab
G7	0,76	91,56 abc
Pseu 3	0,79	91,22 bc
G12	0,84	90,67 abcd
G10	1,38	84,67 abcd
G11	1,40	84,44 abcd
G6	1,56	82,67 abcd
G13	1,71	81,00 abcd
G14	2,06	77,11 abcd
G5	3,04	66,22 bcd
G8	3,34	62,89 cd
G9	3,46	61,56 cd
G1	6,20	31,11 cd
Testigo	9	0,00 d

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

Con respecto al efecto ejercido por las rizobacterias sobre *A. alternata* se constató que las cepas identificadas como G2, G3, G11, Pseudo y G6 inhibieron el crecimiento por encima

del 60% (Cuadro 8), siendo las bacterias G2 y G3 las de mayor efecto. Por otro lado, las cepas G1, G4, G10 y G5 no tuvieron un efecto significativo en el biocontrol reduciendo por debajo del 7%. Con respecto a la inhibición de la esporulación, los aislados G2, G3 y G6 redujeron por encima del 96% al patógeno con respecto al testigo. La prueba no paramétrica de Kruskal y Wallis indicó que existen diferencias significativas entre las bacterias, siendo los aislados bacterianos G2 y G3 los más promisorios (Cuadro 9).

Cuadro 8. Inhibición del crecimiento de *A. alternata* al ser confrontada con rizobacterias aisladas de gerbera.

Tratamientos (rizobacterias)	Crecimiento de la colonia (cm)	% de inhibición del crecimiento
G2	0,8	91,11 a
G3	0,94	89,56 a
G11	3	66,67 ab
G6	3,12	65,33 abc
Pseu	3,16	64,89 abc
G13	3,8	57,78 abc
G12	4	55,56 abc
G8	4,83	46,67 abc
G7	5,8	35,56 abc
G14	6	33,33 abc
G9	7,6	15,56 abc
G1	8,38	6,89 bc
G4	8,6	4,44 bc
G10	8,8	2,22 bc
G5	8,84	1,77 bc
T	9	0,00 c

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

Cuadro 9. Inhibición de esporulación de *A. alternata* al ser confrontada con rizobacterias aisladas de gerbera.

Tratamientos (rizobacterias)	Concentración de conidios de <i>A. alternata</i>	% de inhibición de esporulación
G2	1,64 x 10 ³	99,73 a
G3	1,00 x 10 ⁴	98,31 ab
G6	1,88 x 10 ⁴	96,81 ab
G7	3,37 x 10 ⁴	94,24 abc
G8	6,00 x 10 ⁴	90,06 abad
Pseu	7,22 x 10 ⁴	88,04 abcd
G13	8,84 x 10 ⁴	85,80 abcd
G12	8,68 x 10 ⁴	85,55 abcd
G11	8,66 x 10 ⁴	85,81 abcd
G9	1,00 x 10 ⁵	83,31 abcd
G14	1,27 x 10 ⁵	79,18 abcd
G10	2,18 x 10 ⁵	65,45 abcd
G1	2,07 x 10 ⁵	65,88 bcd
G4	2,88 x 10 ⁵	53,49 cd
G5	3,26 x 10 ⁵	46,44 cd
Testigo	6,16 x 10 ⁵	0 d

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

Saraf *et al.*, (2014) señalan que las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal son un importante grupo de microorganismos los cuales desempeñan un papel significativo en el control de fitopatógenos. Avinash y Rai (2014), indican que a través de estudios *in vitro* se ha demostrado que presentan diferentes mecanismos de acción que influyen de manera negativa en patógenos de plantas, destacando, la resistencia sistémica inducida, producción de antibióticos, sideróforos, enzimas líticas y HCN principalmente por lo que se cree que los microorganismos estudiados en esta investigación presentan uno o varios de estos componentes.

Algunos autores indican que los géneros *Aeromonas*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Arthobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Serratia* han sido identificados como PGPR y poseen características que los hacen atractivos para su uso como biocontrol y agentes promotores del crecimiento. Estos incluyen la versatilidad de crecer *in vitro* y lograr producirse en masa; utilizar rápidamente los exudados de semillas y raíces, colonizar y multiplicarse en la rizosfera e interior de la planta sin causar efectos deletéreos, sintetizar un amplio espectro de metabolitos bioactivos (antibióticos, sideróforos, sustancias volátiles tóxicas para fitopatógenos y proteínas promotores del crecimiento), competir agresivamente con

otros microorganismos, adaptarse a las tensiones ambientales y promover la resistencia sistémica en las plantas que colonizan (Saharan y Nehra 2011, Chithrashree *et al.*, 2011 y Rao y Krishna, 2006) .

Peighami *et al.*, (2009) señalan el efecto fungicida de quince cepas de *Pseudomonas fluorescens*, una de *Bacillus subtilis* y la aplicación de tiabendazol (1,5mg/L) como testigo contra *B. cinerea*. Dos cepas *P. fluorescens* y *B. subtilis* fueron las que mostraron mayores zonas inhibitorias en los ensayos *in vitro* en los cultivos duales contra el patógeno. Con respecto al control *in vivo* en frutos de manzana después de diez días de la inoculación las cepas, P-5 de *P. fluorescens* y B-3 de *B. subtilis* mostraron resultados considerables contra el patógeno reduciendo hasta un 100% la enfermedad. La aplicación de tiabendazol igualmente controló al patógeno hasta un 100%. Los resultados indicaron que no hay diferencia significativa entre los tratamientos (tiabendazol y cepas bacterianas). Por lo tanto, las cepas PGPR no sólo podrían controlar la enfermedad, sino también pueden sustituir de forma fiable al fungicida químico.

Así mismo, Trujillo *et al.*, (2007) determinaron la actividad antagónica y el efecto inhibitorio de los metabolitos activos producidos por las rizobacterias autóctonas de las especies *Pseudomonas fluorescens* (MPf2, MPf3, MPf4, MPf5, MPf6 y MPf19) y *Burkholderia cepacia* (MPp8, MPp16, MPp20), aisladas de la rizosfera del cultivo de maíz ante los fitopatógenos *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata*. A través de bioensayos con cultivos duales evidenciaron que las rizobacterias estudiadas presentaron actividad antagónica. Resultados similares fueron obtenidos con el efecto inhibitorio de los metabolitos ante los hongos fitopatógenos destacándose con el mejor comportamiento las cepas de *P. fluorescens* MPf2, MPf3, J-143 y *B. cepacia* MPp8.

Villamil *et al.*, (2012) realizaron aislamientos de hongos y bacterias en suelo rizosférico y mazorca de cacao para el control de *Moniliophthora roreri*. Los hongos denominados H5 y H20 y la bacteria B3 resultaron ser los aislamientos más efectivos para la restricción *M. roreri*, siendo los hongos los que mostraron capacidad de inhibir el crecimiento y esporulación y la bacteria sólo crecimiento. De acuerdo con la caracterización morfológica y las pruebas bioquímicas los hongos pertenecen al género *Trichoderma* sp y la bacteria *Bacillus* sp.

Ghosh *et al.*, (2106) evaluaron *in vitro* la capacidad antagónica de *Burkholderia cenocepacia* y *Pseudomonas poae* con el fin de controlar a *Alternaria alternata* causante de la mancha foliar en *Aloe vera*. Ambas cepas fueron eficaces inhibiendo el crecimiento micelial del patógeno. Al observar a través del microscopio de barrido se evidencio la degradación micelial probablemente por la producción de quitinasas o β -glucanasa. Además de la habilidad antifúngica, presentaron características para promover el crecimiento en las plantas teniendo la capacidad de solubilizar fosfatos insolubles y producir ácido indol acético.

Observación en microscopio óptico de confrontación *in vitro* de las rizobacterias con *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata*

Se observó a través del microscopio óptico a 40X, la lisis ocasionada por las rizobacterias en el micelio y conidios de *B. cinerea* y *A. alternata*. Se observaron células bacterianas alrededor de las hifas afectadas pudiendo estar implicada la acción de enzimas líticas como quitinasas y glucanasas capaces de degradar la quitina y el glucano de la pared celular de los hongos, así como otras proteínas capaces de afectar el crecimiento y desarrollo del patógeno (Figuras 4 y 5).

Tejera *et al.*, (2011) señalaron que las PGPR pueden sintetizar enzimas, destacando las de tipo quitinasas, hidrolasas y proteasas que actúan fundamentalmente sobre hongos fitopatógenos. Se ha demostrado la producción de este tipo de proteínas en *B. subtilis* y entre ellos, se destacan lipasas, proteasas y β glucanasas que actúan sobre el patógeno fúngico *Fusarium oxysporum*.

El-Gremf *et al.*, (2013) observaron a través del microscopio de luz y barrido las lesiones del mildiu del pepino tratadas con cultivo líquido de *Bacillus pumilus* mostrando efectos directos como pérdida en turgencia u osmólisis en los esporangios e hifas de *Pseudoperonospora cubensis*. Así mismo identificaron a través cromatografía de gases, antibióticos y tensioactivos sintetizados por *B. pumilus*.

Lamsal *et al.*, (2012) observaron cambios morfológicos a través del microscopio electrónico de barrido en el micelio de *Colletotrichum acutatum* debido a los efectos de las rizobacterias evaluadas en el ensayo. Los resultados mostraron degradación de los septos, y una marcada actividad lítica en los micelio y esporas del hongo debido al efecto

ejercido por las PGPR. Constatándose que la antibiosis causada por los aislamientos bacterianos interrumpió la pared celular del hongo y la germinación de conidios.

Wang *et al.*, (2013) indican que *Serratia marcescens* tiene un notable efecto controlador sobre *Aspergillus parasiticus*, inhibiendo más de 95% el crecimiento micelial y 98% la producción de aflatoxina debido a la alta producción de quitinasas lo cual favorece la degradación de las paredes celulares fúngicas. A través de microscopía electrónica de barrido se observó la degradación y lisis del micelio, sugiriendo a esta bacteria como un potente biocontrolador.

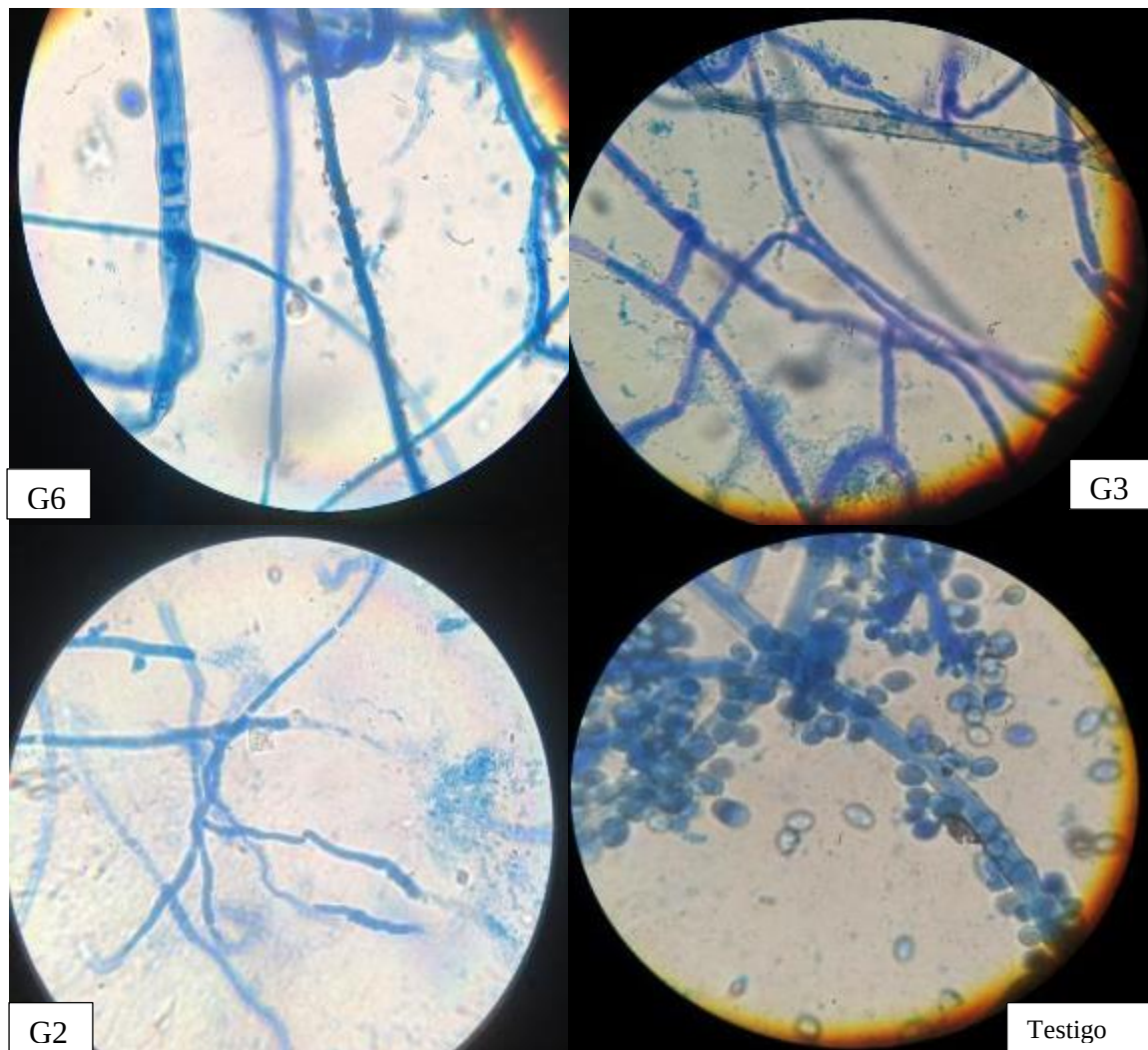


Figura 4. Hidrolisis ocasionada por las rizobacterias identificadas como G2, G3 y G6 a *B. cinerea* (testigo, derecha inferior).

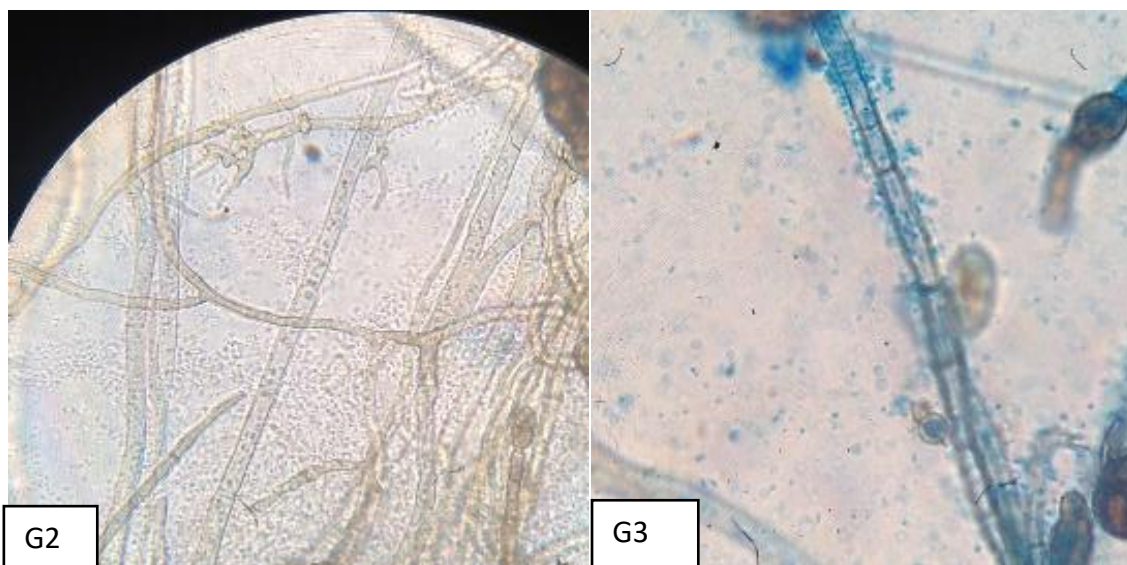


Figura 5. Hidrolisis ocasionada por las rizobacterias identificadas como G2 y G3 a *A. alternata*.

Evaluación de la capacidad biofungicida en casa de cultivo comercial de los aislamientos bacterianos más promisorios *in vitro* sobre *Botrytis cinerea* en plantas de gerbera

El desarrollo de inoculantes microbianos a partir de aislamientos de rizobacterias con potencial para el control biológico de enfermedades de los cultivos agrícolas requiere de una rigurosa selección (Ahemad y Kibret, 2014). Para este estudio se eligieron por la alta capacidad biocontroladora demostrada *in vitro* en la inhibición de la esporulación de *B. cinerea* y *A. alternata* y su fácil crecimiento en medios de cultivo las bacterias denominadas G2, G3 y G6.

En las dos primeras evaluaciones realizadas, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$), siendo la bacteria G2 quien presentó mejor efecto biocontrolador. Asimismo, se evidenció que la mezcla de bacterias tuvo un efecto similar a los aislados G3 y G6. Sin embargo, en la última evaluación no hubo diferencias entre los tratamientos ($P > 0,05$) es decir, las cepas bacterianas se comportaron igual al testigo.

En la primera evaluación el porcentaje de severidad en los capítulos florales tratados con la cepa G2 mostraron 4,44% de severidad con respecto al testigo que presentó 30%. Las bacterias G3, G6 y la mezcla tuvieron mejor comportamiento que el testigo, con porcentajes de infección de 15,26%, 22,22% y 12,22% respectivamente (Figura 6).

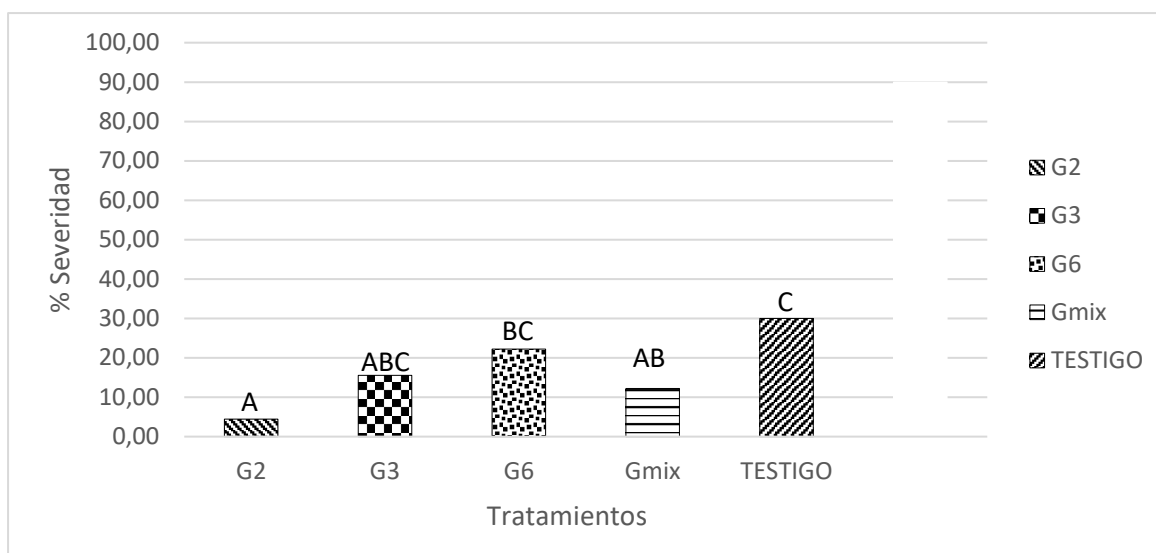


Figura 6. Primera evaluación. Porcentaje (%) de severidad en flores de gerbera inoculadas con *B. cinerea* y tratadas con rizobacterias. P (0,05) Prueba no Paramétrica de Kruskal y Wallis. Cada valor acompañado de una letra hace referencia a un grupo específico.

Con respecto a la segunda evaluación los porcentajes de severidad aumentaron considerablemente, sin embargo, los tratamientos con las rizobacterias presentaron mejor comportamiento con respecto al testigo que alcanzó 65,56%. G2 siguió presentando el mejor efecto controlador con 32,22% de severidad seguido de G3, Gmix y G6 los cuales tuvieron efectos similares con porcentajes de 46,67%, 47,78% y 50% respetivamente. (Figura 7).

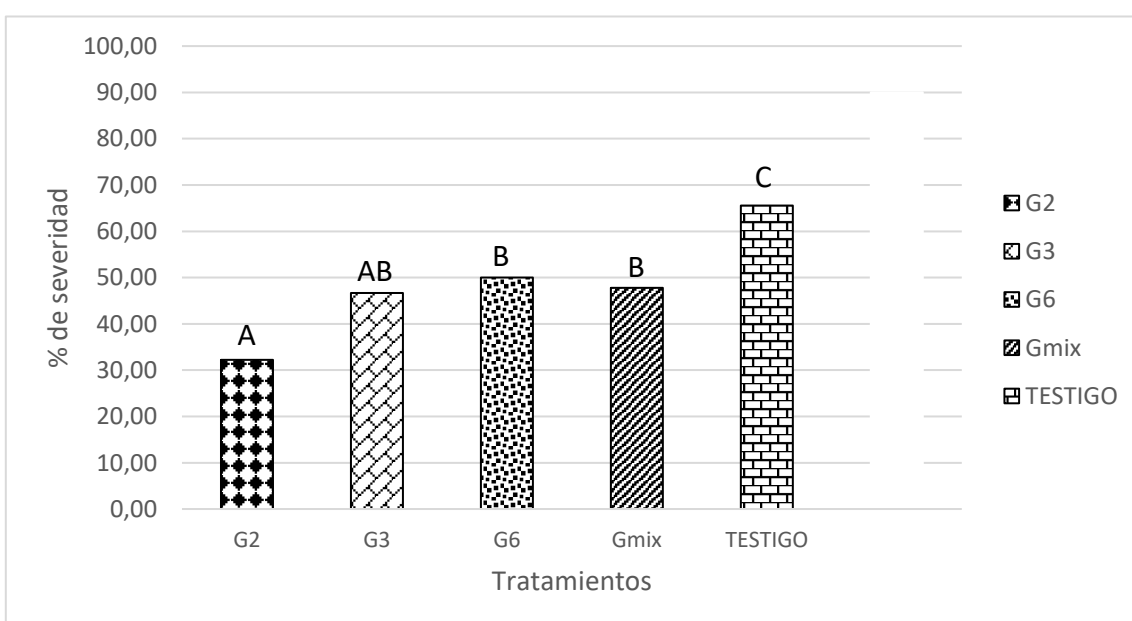


Figura 7. Segunda evaluación. Porcentaje (%) de severidad en flores de gerbera inoculadas con *B. cinerea* y tratadas con rizobacterias. P (0,05) Prueba no Paramétrica de Kruskal y Wallis. Cada valor acompañado de una letra hace referencia a un grupo específico.

Finalmente, en la tercera evaluación los porcentajes de severidad estaban por encima de 70% en todos los tratamientos, por lo que se consideró que las bacterias no tuvieron efecto deletéreo al patógeno una vez que éste estaba con una alta población de inóculo (Figura 8).

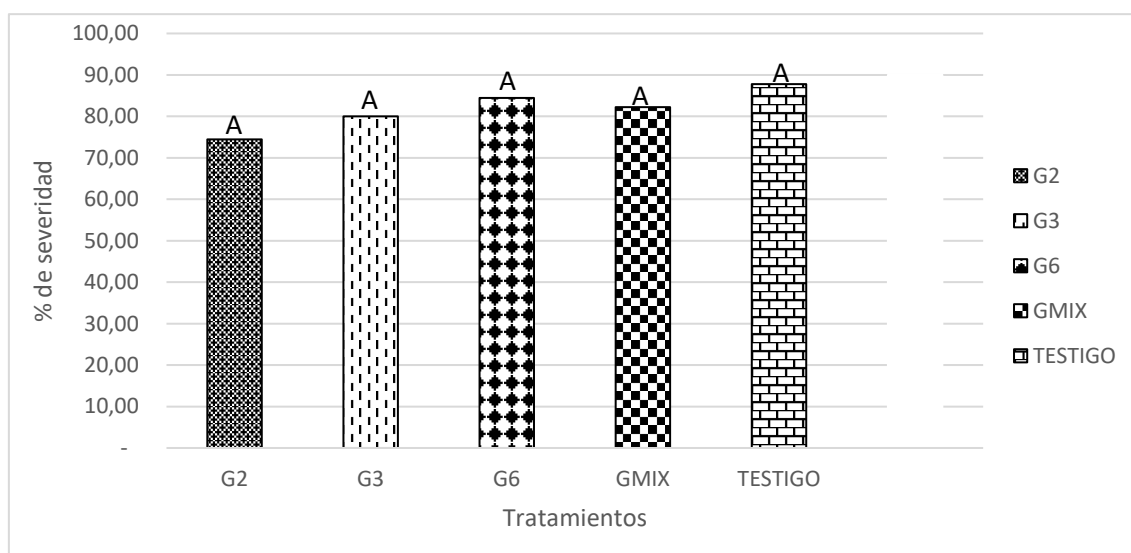


Figura 8. Tercera evaluación. Porcentaje (%) de severidad en flores de gerbera inoculadas con *B. cinerea* y tratadas con rizobacterias. P (0,05) Prueba no Paramétrica de Kruskal y Wallis. Cada valor acompañado de una letra hace referencia a un grupo específico.

Al respecto Rubio y Fereres, (2005) y Sivasakthi *et al.*, (2014) mencionan que las rizobacterias pueden operar frente al ataque de patógenos después de ser inoculadas en las plantas de diferentes maneras. Los mecanismos de protección no son iguales en todos los casos y un mismo aislado puede proteger simultáneamente por varios mecanismos, entre estos mecanismos cabe destacar: capacidad de colonización y forma de inoculación, competencia en la colonización con los patógenos en el mismo nicho ecológico en la superficie de la planta, producción de compuestos inhibidores o antibiosis, enzimas de degradación de la pared celular tales como quitinasas y β -1,3-glucanasa, fungistasis, micoparasitismo, inducción de mecanismos generales de resistencia en las plantas, entre otros.

Las PGPR autóctona pudieran ser utilizadas como controladores biológicos dentro de un plan de manejo integrado en el cultivo. Gupta *et al.*, (2015) hacen referencia que una de las grandes ventajas del control biológico de enfermedades es que con frecuencia los agentes de biocontrol están dotados de propiedades similares al patógeno, entre las que destaca la de multiplicación y dispersión, pudiendo actuar a varios niveles en el ciclo de la enfermedad, interfiriendo en la penetración, desarrollo, dispersión y supervivencia del

patógeno, incluso el antagonista puede competir con el patógeno dentro del tejido del hospedante.

Sheng *et al.*, (2016) aislaron dos cepas de *Bacillus* sp. de muestras de suelo recogidas en campos de ajo. La eficacia de estas cepas como agentes de biocontrol y sus capacidades para promover el crecimiento de las plantas de tomate se evaluaron tanto en el laboratorio como en condiciones de invernadero. Ambas cepas controlaron *B. cinerea* y promovieron el crecimiento de las plántulas de tomate, medido por incrementos de crecimiento de 10-42% para las raíces y brotes respectivamente, y la reducción de la enfermedad entre un 66% y 67%, en relación con el control no tratado. Concluyendo que las cepas de *Bacillus* spp son útiles para ser usadas como potenciales agentes de biocontrol en el tomate, debido a sus efectos sobre el crecimiento de las plantas y las actividades antifúngicas.

Sin embargo, Barnes y Shaw (2002) y Sharabani *et al.*, (1999), mencionan que una vez establecido *B. cinerea* en los cultivos, puede sobrevivir en sustrato orgánico, hojas y flores muertas, por su parte Keressies (1994), señaló que la cantidad de inóculo de *B. cinerea* aumenta sobre el tejido de gerbera infectado a medida que este envejece y puede ser disperso por gotas de agua, insectos y viento, siendo esta última la principal. Esto puede explicar por qué el porcentaje de severidad aumentó considerablemente en la última fecha de evaluación, igualmente al estar todos los tratamientos expuesto entre si facilitaba la infección debido al aumento de las fuentes de inóculo.

De la misma manera Salinas y Verhoeff (1995) señalaron que la producción conidial de *B. cinerea* incrementó con el aumento de la humedad relativa siendo favorable los valores entre 80%- 100% para los procesos de germinación, invasión y esporulación. Las condiciones ambientales en el momento del ensayo fueron en promedio; temperatura min 12°C-15°C y máxima entre 22°C- 27°C y humedad relativa entre 75% y 100%, favorables para el desarrollo del patógeno.

Así mismo Santos *et al.*, (2010) mencionan que una densidad elevada del patógeno puede anular el efecto control ejercido por los microorganismos beneficiosos viéndose comprometida su efectividad para reducir la severidad de la enfermedad en ensayos *in vivo* a dosis elevada de inóculo. Esto concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación, debido a que la presión de inóculo comprometió el efecto antagónico de

las rizobacterias corroborándose que el control biológico de enfermedades se basa en la aplicación preventiva de elevadas poblaciones de microorganismos benéficos

Molina *et al.*, (2006) señalaron que la cepa A10 de *Clonostachys* sp redujo la severidad del “moho gris” causado por *B. cinerea* sobre plantas de *Pinus radiata*, aunque logrando un nivel de control que puede considerarse sólo como moderado (40,3%). Los investigadores indican que este resultado, no completamente satisfactorio, puede deberse al efecto de ciertos factores como: ambiente favorable para el desarrollo de la enfermedad, alta población del patógeno (10^5 conidios/mL) además, de algunos daños en la región apical de las plantas que favorece la entrada del patógeno. De esta forma, al aumentar la cantidad del antagonista en relación a la población natural del patógeno, mayor periodicidad de las aplicaciones y determinar el momento oportuno de establecer los antagonistas, es posible aumentar las posibilidades de un control exitoso.

Identificación de algunos mecanismos de acción mediados por las bacterias más promisorias *in vitro*.

Los estudios de los diferentes mecanismos de acción evaluados en este trabajo se realizó a las cepas denominadas G2, G3 y G6, las cuales fueron las que presentaron mejor comportamiento biocontrolador en condiciones *in vitro*.

Solubilización de fósforo

La formación de halos en el medio Pikovskaya se evidenció en las cepas G2 y G6 lo que indica su capacidad de solubilización de fosfato (Figura 9). Con respecto al índice de solubilización la bacteria G2 arrojó 0,45 mm y G6 2,4 mm (Cuadro 10), categorizándose como niveles de solubilización bajo e intermedio respectivamente, según la escala utilizada. Estos resultados indican que pudieran estar involucrados procesos de producción de fosfatasas, fitasas y ácidos orgánicos, así como la acidificación del medio por acción de las rizobacterias en estudio (Patiño y Sanclemente, 2014). Por su parte G3 no tuvo capacidad de solubilizar fósforo.

Cuadro 10. Índice y Nivel de solubilización de las PGPR aisladas de rizosfera de gerbera.

Cepa bacteriana	Índice de solubilización (mm)	Nivel de solubilización
G2	0,45	bajo
G3	0	-----
G6	2,4	Intermedio
Testigo	5,33	Alto



Figura 9. Halos de solubilización de rizobacterias aisladas de rizosfera de gerbera sembrada en medio Pikovskaya

El fósforo es uno de los nutrientes inorgánicos más importantes en las plantas junto con el nitrógeno y potasio. Sin embargo, se encuentra en baja disponibilidad por lo que constituye un factor limitante en el desarrollo vegetal, pues las concentraciones de fósforo asimilables son muy bajas. Esto se debe a que el fósforo soluble reacciona con iones como calcio, hierro o aluminio, provocando su precipitación o fijación, disminuyendo así la disponibilidad para las plantas. Los fosfatos inorgánicos aplicados como fertilizantes químicos también son inmovilizados en el suelo y como consecuencia no pueden ser aprovechados totalmente por los cultivos (Nisha *et al.*, 2014., Sharpley, 2012).

Sin embargo, algunos géneros de PGPR son capaces de transformar fósforo insoluble en soluble, a través de reacciones enzimáticas y producción de ácidos orgánicos haciéndolo disponible para las plantas. Es por ello, que la inoculación en semillas o suelos con bacterias capaces de solubilizar fosfato es una práctica que va tomando mayor auge debido a que las bacterias solubilizadoras de fosfato pueden ser la base para la formulación de biofertilizantes, reemplazando en gran medida a los fertilizantes

fosforados de tipo sintético cuya aplicación desmedida ha causado graves problemas a nivel ambiental (Sharma *et al.*, 2013., Khan *et al.*, 2014).

Las bacterias solubilizadora de fosforo convierten fosfatos insolubles de origen orgánico u inorgánico a formas que puedan ser disponibles por las plantas, convirtiéndolas en potentes biofertilizantes (Alori *et al.*, 2017).

Al respecto Castagno *et al.*, (2011) aislaron de la rizosfera de pasto forrajero (*Lotus tenuis*) cepas solubilizadoras de fosfato las cuales fueron identificadas a través del análisis de secuencia del gen 16S rRNA como *Pantoea*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Enterobacter*. Todos los aislamientos obtenidos mostraron una significativa actividad promotora del crecimiento de plantas *in vitro* en *Lotus tenuis* solubilizando fosfato principalmente a través de la inducción del metabolismo de secreción y oxidación de ácido glucónico. El aislado más eficiente fue identificado como *Pantoea eucalyptii*.

Beltrán-Pineda (2014) evaluó *in vitro* la capacidad de solubilizar fosfatos de 21 cepas bacteriana aisladas de suelo rizosférico de papa a través de técnicas cualitativas como la determinación del diámetro de halo de solubilización y cuantitativas para determinar la cantidad de fosfato solubilizado. Los géneros identificados como *Enterobacter* sp. y *Streptococcus* sp. fueron los que presentaron mayor potencial tanto cualitativa como cuantitativamente. Estos microorganismos servirían como base para la formulación de biofertilizantes comerciales que al ser aplicados en los suelos podrían sustituir en gran medida a las estrategias de fertilización tradicional; ya que se conoce que el manejo de la fertilidad del suelo usando biofertilizantes es uno de los componentes básicos de la agricultura sostenible por sus efectos benéficos sobre el medio ambiente al disminuir la aplicación de insumos químicos.

Producción cualitativa de ácido cianhídrico (HCN)

Al evaluar la producción de HCN en las cepas G2, G3 y G6, sólo resultó positiva a la prueba cualitativa G6, en la cual se evidenció un viraje de color de amarillo a naranja en el papel filtro, mostrando que presenta capacidad de producción de HCN bajo las condiciones evaluadas. (Figura 10).

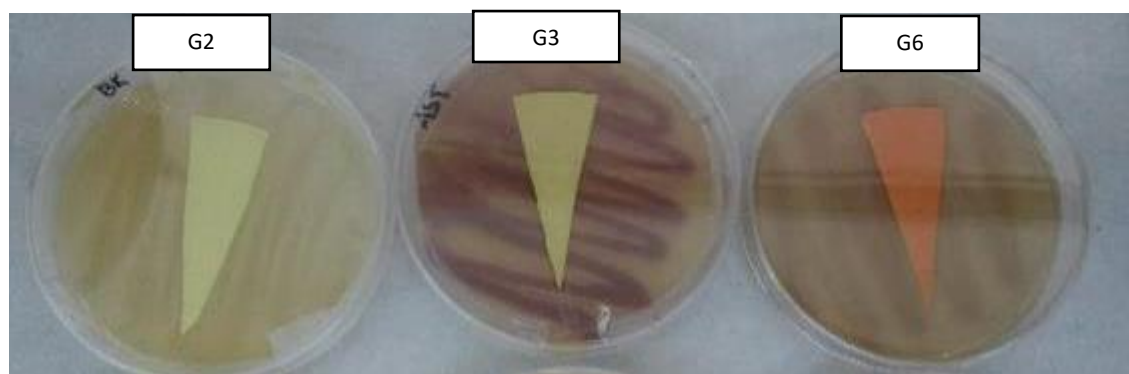


Figura 10. Producción de HCN de las rizobacterias G2, G3 y G6 aisladas de gerbera (positivo tira color naranja).

Zaim *et al.*, (2016) mencionaron que las rizobacterias producen una serie de metabolitos volátiles de bajo peso molecular, algunos con potenciales antifúngicos entre los que destaca el HCN. Dowling y O’Gara (1994) mencionan que juega un papel importante en la supresión de fitopatógenos de suelo, ya que actúa sobre el citocromo oxidasa inhibiendo el transporte de electrones y el suministro de energía a la célula conduciendo a la muerte de muchos organismos. Kundan *et al.*, (2015) señalan que el HCN es sintetizado principalmente por especies de los géneros de *Pseudomonas* y *Bacillus*. Sin embargo, Kamei *et al.*, (2014) hicieron referencia que el ácido cianhídrico, sintetizado en grandes cantidades por PGPR, puede alterar considerablemente la actividad fisiológica de la planta y llevarla a su muerte por lo que es utilizado en el control biológico de malezas.

Avinash y Rai (2014), aislaron PGPR de varias Cucurbitáceas que mostraron capacidad controladora sobre los patógenos *Fusarium oxysporum* y *Phoma* sp inhibiendo el crecimiento micelial. Los autores señalan que dicho control se debe a que las cepas produjeron diferentes tipos de enzimas, sideróforos y compuestos volátiles como etileno, HCN y amoníaco. Así mismo Haas y Defago (2005) señalaron que *Pseudomonas* del tipo fluorescentes, han sido ampliamente estudiadas y muy a menudo implicadas en el control biológico de patógenos de plantas, debido a su capacidad de producir varios compuestos antimicrobianos, incluido el HCN. Lorck (2004) indicó que las rizobacterias que sintetizan este compuesto tienen propiedades antifúngicas.

Por su parte, Flaishman *et al.*, (1996) mencionan que *Pseudomonas putida* cepa BK8661, suprimió el crecimiento de *Septoria tritici* y *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* *in vitro* y en hojas de trigo respectivamente, la cepa producía sideroforos, antibióticos y HCN. Los autores fabricaron dos mutantes de la cepa BK8661, uno deficiente en la síntesis de

sideróforos y antibióticos, pero productor de HCN y otro sintetizando solamente HCN en superproducción. Los primeros fueron significativamente menos efectivos en la supresión de los síntomas al compararlo con el de tipo silvestre, con respecto al segundo mutante aumentó la supresión de los síntomas. Estos resultados hacen referencia que los productos sinterizados por las cepas evaluadas juegan un rol importante en el control de los patógenos.

La producción de HCN por ciertas cepas de *Pseudomonas* fluorescentes ha estado involucrado en supresión de patógenos transmitidos por el suelo al respecto Voisard *et al.*, 1989 mencionan que la síntesis de HCN por la cepa CHA0 de *Pseudomonas fluorescens* inhibió al hongo *Thielaviopsis basicola* causante de la pudrición de la raíz negra en el tabaco. Jan *et al.*, (2011) señalan que *P. aeruginosa* sintetiza HCN la cual presenta efecto antagonista de hongos fitopatógenos inhibiendo el crecimiento micelial.

Sin embargo, Pal *et al.*, (2000) hacen referencia que el HCN es un agente de control biológico improbable y que los productos bacterianos, como los sideróforos, antibióticos, enzimas entre otros son más eficaces contra los patógenos fúngicos. Dado que el HCN tampoco tiene una acción específica contra microorganismos patógenos.

Al respecto Rijavec y Lapanje (2016) señalan que el HCN producido por las rizobacterias podría actuar de otras maneras, siendo la principal contribución el secuestro de metales y el consecuente aumento indirecto de la disponibilidad de nutrientes principalmente fosforo.

Producción de quitinasa

Se evidenció que las tres cepas en estudio (G2, G3 y G6) tuvieron capacidad de formar halos de hidrólisis, utilizando quitina como fuente de energía. Sin embargo, cualitativamente se apreció que las cepas G2 y G3 presentaron mayor radio de viraje (amarillo a morado) en el medio de cultivo, esto permite inferir que presentan un mayor potencial para hidrolizar quitina. (Figura 10). Uno de los mecanismos más efectivos en el biocontrol de hongos fitopatógenos que poseen las bacterias PGPR se basa en la producción de enzimas líticas, encargadas de degradar la pared celular de organismos patógenos fúngicos.

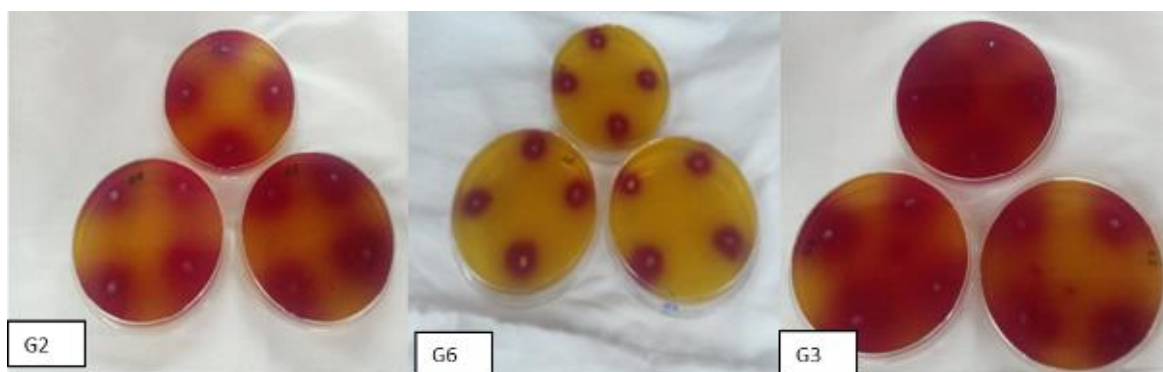


Figura 10. Rizobacterias G2, G3 y G6 hidrolizando quitina (viraje de color naranja a purpura) en medio quitina coloidal

El Ghaouth *et al.*, (1997) señalan que la pared celular de *Botrytis cinerea* está constituida por un armazón de microfibrillas de quitina y β -1,3-glucano ordenadas al azar. La quitina está unida a glicoproteínas, lo que le da la forma, rigidez y resistencia física a la pared, por lo que el uso de rizobacterias productoras de quitinasas y otras enzimas líticas pudieran tener efectos adversos en la estructura del patógeno. Aunque, Doss *et al* (2003) señalan que la capa más externa de la pared celular presenta coloración, lo que puede ser debido a la presencia de melanina, pigmento capaz de proteger a los conidios de la acción enzimática, desecación y además servirle como defensa frente a las toxinas secretadas por las plantas.

Sin embargo, Maksimov *et al.*, (2011) indican que los agentes de biocontrol bacteriano logran la lisis destructiva de la pared celular de los hongos a través de enzimas secretadas como la β -1,3-glucanasa, quitinasa, proteasa y celulasa, las cuales de manera individual o en combinación, hidrolizan eficazmente las paredes celulares de los hongos fitopatógenos logrando ejercer un efecto inhibitorio directo sobre el crecimiento de las hifas. Goswami *et al.*, (2016) mencionan que las PGPR que presenten un alto potencial quitinolítico son posibles agentes de control biológico de hongos fitopatógenos.

Neeraja *et al.*, (2010) mencionan que, dentro de las enzimas sintetizadas por las bacterias, las quitinasas degradan quitina en disacáridos y oligómeros los cuales son utilizándolo como fuente de energía. Adicionalmente indican que las PGPR que presentan estas características son utilizadas como potenciales agentes para el control biológico de enfermedades de plantas causadas por diversos hongos fitopatógenos, pues hidrolizan la quitina presente en la pared celular.

Al respecto Yan *et al.*, (2011) realizaron un ensayo en invernadero y campo para evaluar la capacidad biocontroladora de la cepa SL-13 de *Bacillus subtilis* a *Rhizoctonia solani*

causante de la pudrición del tallo en tomate. Los porcentajes de eficacia de control del SL-13 fueron 20,65% y 35,23% en el invernadero y campo respectivamente. El crecimiento del hongo patógeno fue considerablemente inhibido en presencia del sobrenadante del cultivo bacteriano. La principal proteína antifúngica que detectaron mediante ensayo *in vitro* fue la quitinasa, concluyendo que la enzima fue el principal factor para el efectivo control biológico de *R. solani*.

Por su parte, Martínez *et al.*, (2014) estudiaron la actividad lítica de *Bacillus thuringiensis* UM96 y su potencial como agente de biocontrol al moho gris causado por *Botrytis cinerea*. Los resultados demostraron que la cepa inhibió *in vitro* hasta en un 70% el crecimiento del patógeno. Con respecto a las actividades enzimáticas; la celulasa y glucanasa fueron negativas, siendo quitinasa la única enzima sintetizada por la bacteria. Para evaluar el rol de la quitinasa en la inhibición del crecimiento del patógeno usaron alosamidina 100 μ M es cual es un inhibidor específico de la quitinasa viéndose afectada la actividad antagonista a *B. cinerea* al ser inhibida. Concluyeron que la cepa quitinolítica de *B. thuringiensis* UM96 fue capaz de proteger *in vitro* las plantas de *Medicago truncatula* del patógeno y redujo significativamente las zonas necróticas en las plantas. Estos resultados sugieren el uso de *B. thuringiensis* UM96 para el control biológico de *B. cinerea* y el rol fundamental de la quitinasas durante el antagonismo mostrado.

Producción de sideróforos

Las bacterias denominadas G6 y G2 tuvieron capacidad de producir sideróforos en el medio CAS-agar, observándose halos de color amarillo 24 horas después de la siembra. Transcurrido 72 horas se observó que las cepas habían virado el medio casi en su totalidad confiriéndole la ventaja de secuestrar el hierro y formar un complejo Fe^{+3} -sideróforo, a diferencia de G3 que no presentó esta característica (Figura 11).

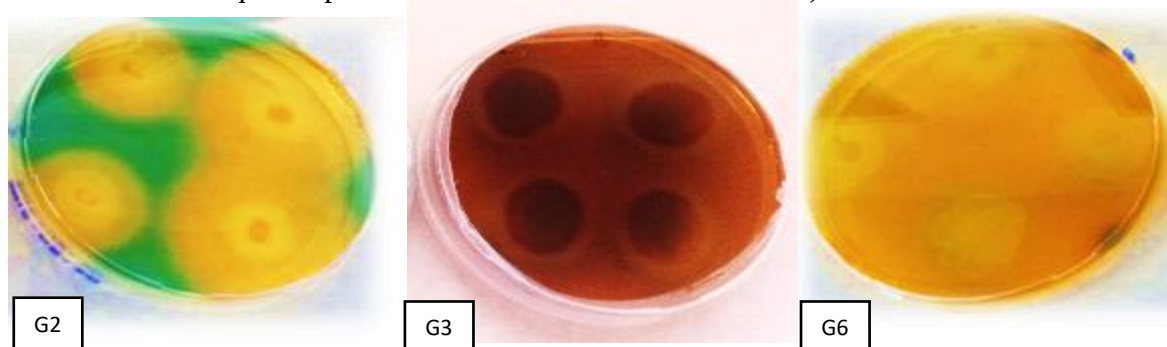


Figura 11. Rizobacterias G2, G3 y G6 sembradas en medio CAS-Agar. Viraje de verde a amarillo indica producción de sideróforo.

El hierro es un nutriente vital para casi todas las formas de vida. Sin embargo, se reduce rápidamente encontrándose de manera frecuente como Fe^{+3} y es probable que formen hidróxidos u óxidos insolubles (Rajkumar *et al.*, 2010). Por lo general es inaccesible tanto para plantas como microorganismos. Algunas bacterias son capaces de liberar sustancias quelantes que atraen el hierro hacia la rizosfera donde puede ser absorbido por la planta, principalmente de género *Pseudomonas* (*P. fluorescens* y *P. aeruginosa*). (Gupta y Gopal, 2008)

Compant *et al.*, (2005) y Pérez *et al.*, (2014) mencionan que las bacterias que producen sideróforos presentan un receptor específico localizado en la membrana bacteriana capaz de reconocer el complejo Fe^{+3} -sideróforo lo cual le confiere ventaja sobre otros microorganismos que carezcan del sistema de asimilación, por lo que al utilizar la mayoría del hierro disponible en el suelo suprime o inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos presentes en la rizosfera.

Por su parte Venner y Martínez (2009) evaluaron la capacidad antagónica de rizobacterias aisladas de *Physalis peruviana* a *Fusarium oxysporum* demostrando que las mejores cepas en el biocontrol correspondían a *Pseudomonas* sp, alcanzando porcentajes de inhibición de 71 a 75%; además se destacaron en ser las mayores productoras de sideróforos, sin embargo no observaron una relación proporcional entre la producción de sideróforos y la capacidad antagónica frente a la cepa de *F. oxysporum*, esto es posible gracias a la capacidad que tienen las PGPRs en producir diversos metabolitos con potencial antibiótico que pueden inhibir el crecimiento del patógeno.

Santoyo *et al* (2009) mencionan que los sideróforos producidos por *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 en la actividad antagónica a *Colletotrichum lindemuthianum*, *C. gloesporioides* y *Phytophthora cinnamomi* logró restringir el crecimiento micelial en un 76, 72 y 70%, respectivamente. Por otro lado, obtuvieron un mutante de la cepa ZUM80 Sid, carente de la síntesis de sideróforos, evidenciando que no logró restringir el crecimiento de los patógenos analizados. Adicionalmente, utilizaron un concentrado de sideróforos de la cepa ZUM80 silvestre para inhibir el crecimiento de los patógenos en cultivo líquido, observando una disminución significativa en su crecimiento respecto al control. Se demostró que la cepa ZUM80 de *Pseudomonas fluorescens* podría ser una alternativa viable en el control biológico de patógenos de plantas principalmente a través de la producción de sideróforos.

Producción de Ácido Indolacético

Las rizobacterias G2, G3 y G6 fueron capaces de producir indol en diferentes proporciones a partir del precursor L-triptofano, siendo la cepa G3 la que menor concentración de AIA produjo bajo las condiciones evaluadas (Cuadro 11). Sin embargo, todas las cepas evaluadas tienen propiedades de PGPR. Santner *et al.*, (2009) y Zhao (2010) señalan que el ácido indol-3-acético (AIA) coordina diferentes procesos de desarrollo en las plantas, destacando la división y expansión celular, diferenciación vascular, desarrollo de raíz lateral y dominancia apical por lo que pueden jugar un papel importante en crecimiento y desarrollo de las plantas. Basado en esto, Gouda *et al.*, (2018) señalan que la síntesis de fitohormonas mediada por PGPR especialmente AIA se considera uno de los principales mecanismos directos utilizados por estos microorganismos para aumentar el crecimiento y rendimiento de las plantas.

Cuadro 11. Concentración de AIA producido por las rizobacterias aisladas de gerbera

Cepa bacteriana	AIA (µg/mL)
G2	7,48
G3	0,91
G6	3,89

Ali *et al.*, (2009) evaluaron el potencial de cepas bacterianas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Micrococcus* y *Staphylococcus* para aumentar la concentración endógena del ácido indol-3-acético y mejorar componentes agronómicos de *Triticum aestivum*. Los análisis indicaron que las cepas produjeron entre 0,6 a 8,22 µg/mL de AIA observaron una correlación positiva entre la producción de auxinas por las cepas bacterianas y el incremento de la longitud del brote, peso fresco, longitud de espiga y peso de semilla. Además de aumentar los niveles endógenos de AIA, concluyendo que cepas microbianas evaluadas pueden utilizarse de manera efectiva para mejorar el crecimiento y el rendimiento agronómico.

Así mismo Sachdev *et al.*, (2009) aislaron nueve cepas de *Klebsiella* spp de la rizosfera de trigo para evaluar la producción de ácido indolacético (AIA) *in vitro* y su efecto sobre frijol y trigo. Los resultados mostraron que 6 cepas tenían capacidad de producir AIA con un máximo de 27,5 mg/L en presencia de triptófano (1 mg/mL) con 72 h de incubación en pH 8,0, 37 °C y 0.5% (w/v) concentración de NaCl. Con respecto al efecto sobre la germinación en semillas de frijol evidenciaron que varias cepas aumentaron la longitud de la raíz aproximadamente 92.71% sobre el control, en cuanto al trigo indicaron que las

seis cepas de *Klebsiella* spp productoras de AIA aumentaron significativamente la longitud de la raíz y la altura del tallo de las plántulas inoculadas sobre el control. Lo que sugiere que estos aislamientos son prometedores para el cultivo de trigo y frijol.

Verbon y Liberman (2016) y Kumar y Saraf (2015) hicieron referencia que las PGPR productora de AIA tienen un gran impacto sobre el estímulo en el crecimiento de plantas, favoreciendo principalmente las raíces con el aumento del tamaño, peso, número de ramificaciones y el área de la superficie en contacto con el suelo. Todos estos cambios conducen a tener mayor capacidad de explorar el suelo para el intercambio de nutrientes, por lo tanto, mejora la nutrición de las plantas y capacidad de crecimiento.

Efecto de las rizobacterias más promisorias *in vitro* como antagonistas, sobre algunas variables de crecimiento y rendimiento en plantas de gerbera.

Al realizar las evaluaciones se observó diferencias significativas ($p < 0.05$) para la variable diámetro del capítulo floral siendo los tratamientos G2, Gmix y G6 los que presentaron mejor comportamiento con promedios de 52.95 cm, 52.25 cm y 51.18 cm respectivamente, el testigo (44.23 cm) fue el que presentó menor diámetro (cuadro 12). En relación al rendimiento (flores cosechas/tratamiento) todas las plantas tratadas con rizobacterias presentaron un mejor comportamiento que el testigo, siendo G2 y G6 las de mayores rendimientos con 10 y 9 unidades respectivamente por encima del testigo (Cuadro 12). Con respecto a la longitud del pedúnculo y la duración postcosecha no se evidenció diferencias entre los tratamientos ($p > 0,05$).

Cuadro 12. Evaluación de variables biométricas en el cultivo de gerbera tratadas con rizobacterias

Tratamientos	Variables evaluadas				
	Diámetro de capítulo (cm)		Longitud del pedúnculo (cm)	Duración Postcosecha (días)	Rendimiento (n° flores)
G2	52,95	a	10,76 a	13,70 a	30 a
G3	50,94	ab	10,62 a	13,40 a	25 ab
G6	51,18	ab	10,83 a	13,83 a	29 a
GMix	52,25	a	11,08 a	13,96 a	26 ab
Testigo	47,23	b	10,67 a	13,65 a	20 b

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

Estos resultados concuerdan con los de Soroa *et al.*, (2009) quienes señalan que los biofertilizantes a base de PGPR y micorrizas tienen efectos benéficos sobre la gerbera, refieren que incrementa el diámetro de las flores y rendimiento, además de acelerar el

inicio de la floración (50 días antes) con respecto a plantas no tratadas con microorganismos. Así mismos señalan que una característica que cobra importancia en cuanto al valor comercial de la flor es el diámetro del capítulo floral (Soroa, 2005).

En este contexto Le *et al.*, (2016) mencionan que los bioestimulantes a base de PGPR representan una alternativa interesante, constituyen una herramienta agroecológica para estimular el crecimiento, mejorar la absorción de nutrientes y conferirle tolerancia a estrés abióticos a las plantas. Por su parte Adesemoye *et al.*, (2009) realizaron un estudio en el cual determinaron que reduciendo un 25% los niveles de fertilización establecidos para plantas de tomate, pero combinados con el uso de PGPR se logra mantener los niveles de productividad. Los resultados sugieren que los inoculantes basados en rizobacterias pueden usarse como componentes de estrategias integradas de manejo de nutrientes.

Kumari *et al.*, (2015) trataron plantas de crisantemo con *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. separados y en consorcio para evaluar su efecto biofertilizante. Los resultados indicaron que se favoreció el crecimiento, floración y rendimiento de las plantas tratadas, además indican que las combinaciones de ambos PGPR (consorcio) mostraron mejores resultados. Por su parte Pishchik *et al.*, (1998) señalan que el uso de *Klebsiella mobilis* cepas CIAM880 y CIAM853 aumentó significativamente el contenido de almidón, nitrógeno, fósforo y potasio en tubérculos de papa.

Amaresan *et al.*, (2012) evaluaron la capacidad de promover el crecimiento de *Bacillus* sp, *Bacillus subtilis*, *Arthrobacter* sp y *Serratia* sp los cuales sintetizaron ácido indolacético y sideróforo y solubilizaron fosfato inorgánico. Las propiedades de promoción del crecimiento de las plantas lo demostraron a través de un bioensayo en pimentón y tomate bajo condiciones de invernadero. Los aislados produjeron aumento en la longitud de la raíz y el tallo y el número de raíces secundarias.

Reddy (2014) indica que los bioestimulantes pueden basarse en una sola cepa de PGPR, o una mezcla. En comparación con los productos de una sola cepa, los consorcios pueden llegar hacer más efectivo debido a la diversidad genética favoreciendo la colonización en la zona de raíz mucho más rápido que las cepas simples. Esto puede explicar el por qué el consorcio microbiano (Gmix) estuvo como uno de los mejores tratamientos en alguna de las variables estudiadas.

Identificación molecular de las PGPR más promisorias y algunas características fenotípicas.

La electroforesis de los productos de PCR arrojó como resultado una única banda de aproximadamente 1.5 kb lo cual corresponde con el tamaño del fragmento esperado observándose en el revelado la extracción e integridad del ADN de las PGPR (Figura 12). Mediante el análisis del gen 16S rRNA, y en comparación con las secuencias obtenidas con la base de datos del genbank se identificaron las cepas bacterianas G2, G3 y G6 como *Klebsiella* sp, *Serratia* sp y *Pseudomonas aeruginosa* respectivamente. (Cuadro 13).

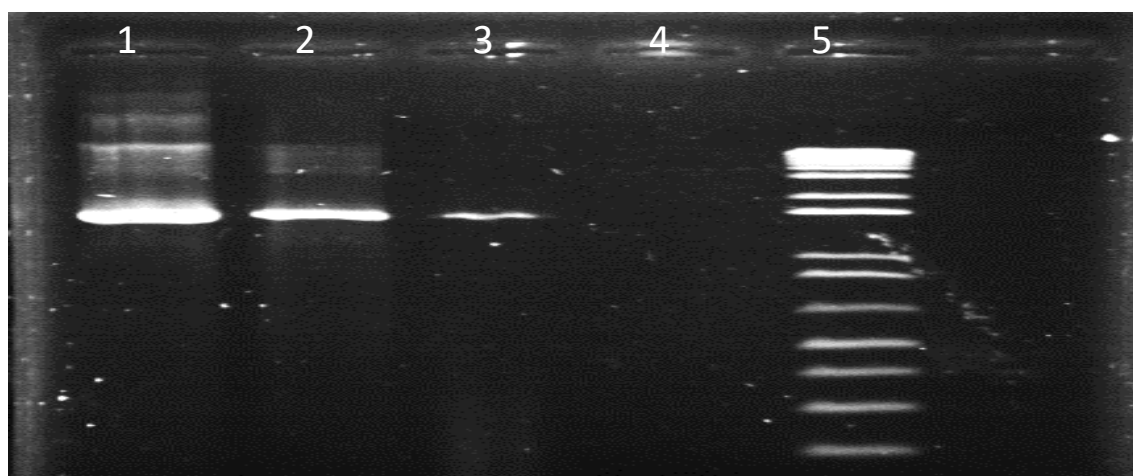


Figura 12. Fragmento amplificado de 1,500 pb del gen 16S con los oligos rP2 y fD1 con PCR. 1. Ceba G2. 2. Ceba G3. 3. Ceba G6. 4. Control negativo (agua destilada esteril). 5. Marcador de peso molecular 1 Kb Plus de Thermo Fisher Scientific.

Cuadro 13. Resultados de la identificación molecular de las bacterias aisladas de la rizosfera de gebera con potencial antagonista y promotor de crecimiento.

Cepas bacterianas	Identificación molecular	% de Identidad
G2	<i>Klebsiella</i> sp.	99
G3	<i>Serratia</i> sp.	99
G6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100

De los valores cuantitativos observado se consideraron los de mayor identidad al ser cotejado con la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBIs)

Las características fisiológicas y bioquímicas de la cepa G6 identificada molecularmente como *Pseudomonas aeruginosa* resultaron 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. Lo cual coincide con lo señalado por Schaad *et al.*, (2001) y Bergey 1989 para *Pseudomonas aeruginosa* (Cuadro 14).

Con respecto a la bacteria G3 identificada como *Serratia* sp presentó características fisiológicas y bioquímicas que coinciden con el género como; colonias típicas en tween 80, crecimiento en NaCl al 7% y 10% y producción de ácidos a partir de sucrosa, lactosa, xylosa, arabinosa y sorbitol (Cuadro 10). En cuanto a la bacteria G2 perteneciente al género *Klebsiella* los resultados mostraron respuesta positiva para las pruebas de producción de ácidos a partir de los carbohidratos: Sorbitol, sucrosa, arabinosa, trehalosa y celobiosa mientras que, para las pruebas de hidrólisis de almidón, licuefacción de la gelatina, producción H₂S, Fluorescencia en BK y colonias típicas en tween 80 se obtuvieron resultados negativos (Cuadro 14).

Cuadro 14. Características fisiológicas y bioquímicas de las rizobacterias identificadas molecularmente

Pruebas culturales, fisiológicas y bioquímicas	PGPRs		
	<i>Serratia</i> sp	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Klebsiella</i> sp
KOH al 3%	+	+	+
Requerimiento de Oxígeno	Anaeróbica facultativa	Anaeróbica facultativa	Anaeróbica facultativa
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	+	-	+

En relación con las bacterias identificadas Kuan *et al.*, (2016) Oteino *et al.*, (2015), Vejan *et al.*, (2016) mencionan que los géneros *Klebsiella*, *Pseudomonas*, y *Serratia* muestran características de PGPR. Las bacterias del género *Klebsiella* presentan rasgos importantes, como solubilización de fosfato, producción de fitohormonas Bhardwaj *et al.*, (2017) fijación de nitrógeno Kuan *et al.*, (2016) y colonización de raíces Pavlova *et al.*, (2017).

Inoculaciones de *Klebsiella* sp. aumentaron significativamente el contenido total de N y la biomasa seca en plantas de maíz, las cepas de *K. pneumoniae* registraron mayores cantidades de N total, biomasa seca y rendimiento. Estos incrementos se atribuyen principalmente a las capacidades de estas bacterias de fijar nitrógeno y posiblemente otras actividades PGPR como producción de AIA y solubilización de fosfato Kuan *et al.*, (2016).

Por otra parte, las bacterias del género *Pseudomonas* son consideradas como el grupo más prometedor dentro de las PGPR siendo estudiadas por mecanismos de acción involucrados en la promoción de crecimiento tales como producción de indol-3-acético (IAA), solubilización de fosfato (Santoro *et al.*, 2015) tanto como por la capacidad biocontroladora, debido a la producción de metabolitos secundarios, antibióticos, compuestos volátiles y sideróforos (Sivasakthi *et al.*, 2014)

En un ensayo realizado por Kumari *et al.*, (2015) aplicaciones de cepas de *Pseudomonas* influyeron significativamente en altura máxima, número de ramas, número de días mínimo para iniciación de floración y tamaño máximo de flor en plantas de crisantemo, las cepas demostraron capacidad para solubilizar fosfato y aumentar el contenido de nitrógeno en las plantas. Por otra parte, el uso de especies de *Pseudomonas fluorescens* han demostrado ser eficientes para la aplicación como agentes de control biológico debido a su abundante población en suelos naturales y en los sistemas radicales y su capacidad para utilizar muchos exudados de las plantas como nutrientes (Deepak *et al.*, 2016).

Los organismos del género *Serratia* 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 marcesens* de producir ácido indol acético y sideróforos, así como la capacidad de solubilizar fosfatos (Devi *et al.*, 2016).

En un estudio realizado por Dinesh *et al.*, (2015) se demostró la importancia de los aislamientos de especies de *Serratia* con rasgos de PGPR, en ensayos realizados *in vitro* y en campo un aislamiento de *S. marcescens* redujo la incidencia de pudrición blanda causada por *Pythium myriotylum* superando a los tratamientos químicos como el sulfato de estreptomicina y el Metalaxil-Mancozeb. Dicha inhibición por parte de la bacteria se puede atribuir a la producción de metabolitos secundarios y enzimas líticas como la quitinasas que inhiben a los patógenos o compiten por sitios de colonización, nutrientes, entre otros.

Es conocido que *Serratia marcescens* es un agente potencial para el control biológico de diversos hongos fitopatógenos, cuyas paredes celulares contienen quitina como principal componente estructural (Ordentlich *et al.*, 1988). Someya *et al.*, (2000) señalan que una cepa altamente quitinolítica *S. marcescens* suprime el crecimiento de *Botrytis* sp. *in vitro* y casa de cultivo. Además, se ha demostrado su eficiencia biocontroladora sobre *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia minor*. (El Tarabily *et al.*, 2000., Someya *et al.*, 2000).

CONCLUSIONES

1. La rizobacterias asiladas de gerbera con mayor potencial antagónico *in vitro* a *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata* fueron las denominadas G2, G3, y G6.
2. Se evidenció que las cepas identificadas como G2, G3, y G6, maceraron y afectaron la estructura micelial y conidial de los patógenos en estudio.
3. Las cepas G2, G3 fueron las que presentaron mayor efecto controlador en campo
4. Las cepas G2 y G6 demostraron efecto bioestimulante en la gerbera con respecto al testigo aumentaron el tamaño del capítulo y rendimiento.
5. La combinación de las tres cepas denominado Gmix tuvo efecto biocontrolador y bioestimulante.
6. La cepa G2 fue identificada como *Klebsiella* sp., G3 *Serratia* sp., y G6 *Pseudomonas aeruginosa* a través de pruebas moleculares, bioquímicas y fisiológicas.
7. La bacteria solubilizadora de fosfato, productora de HCN y sideróforos más promisorio fue *Pseudomonas aeruginosa* cepa G6.
8. La bacteria con mayor potencial de producción de AIA fue *Klebsiella* sp. Cepa G2
9. *Serratia* sp cepa G3, presentó mayor potencial quitinolítico de manera cualitativa
10. Los protocolos utilizados permitieron demostrar el potencial de los microorganismos para ser usados como biocontroladores y biofertilizantes

RECOMENDACIONES

1. Realizar pruebas en campo en diferentes épocas del año y así evaluar la eficacia de las bacterias biocontroladoras.
2. Realizar ensayos combinados con bacterias bioestimulante y fertilizantes orgánicos.
3. Estimar las cantidades a reducir de fertilizantes inorgánicos con el uso de bacterias bioestimulante sin que se comprometa el rendimiento.
4. Identificar otros mecanismos de acción que ayuden a dilucidar aún más los potenciales de las PGPR en estudio.
5. Realizar un mayor número de pruebas fenotípicas con el fin de cotejarlas con resultados moleculares.
6. Utilizar cebadores de regiones más conservadas para la identificación de especies.
7. Evaluar la efectividad de estas rizobacterias con otros patógenos con el fin de determinar su radio de acción.
8. Realizar ensayos donde se evalúe diferentes presentaciones de las PGPR, dosis y frecuencia de aplicación.
9. Medir cuantitativamente las propiedades quitinolíticas, solubilizadora de fosforo, producción de HCN y sideróforo de las bacterias evaluadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Adesemoye, A., Torbert, H. y Kloepper J. 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microb Ecol.* 58:921-929.
- Agrawal, T y A, Kotasthane. 2013. Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. *Springerplus.* 73(1): 2-3.
- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology.* 5th Edition Elsevier Academic Press. New York. pp 647-651.
- Ahemad, M. y Kibret, M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University -Science.* 26: 1-20.
- Ahmad H., Ahmad, K., Ahanger, R., Qazi, N., Dar, N. y Ganie, S. 2013. Status and symptomatology of alternaria leaf blight (*Alternaria alternata*) of gerbera (*Gerbera jamisonii*) in Kashmir valley. *African Journal of Agricultural Research.* 8: 819-823.
- Ali, B., Sabri, A., Ljung, K. y Hasnain, S. 2009. Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L. *Letters in Applied Microbiology.* 48: 542-547.
- Alori, E., Glick, B. y Babalola, O. 2017. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Front Microbiol* 8:971
- Amaresan, N., Jayakumar, V., Kumar, K. y Thajuddin, N. 2012. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria and their effect on tomato (*Lycopersicon esculentum*) and chilli (*Capsicum annuum*) seedling growth. *Annals of Microbiology.* 62: 805–810.
- Ammari, T., y K. Mengel .2006. Total soluble Fe in soil solutions of chemically different soils, *Geoderma*, 136, 876–885
- Avinash, T., y Rai, R. 2014. Antifungal Activity of Plant Growth Promoting Rhizobacteria Against *Fusarium oxysporum* and *Phoma* sp. of Cucurbitaceae. *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security* pp 257-264.
- Bañón, S., Cifuentes, D., Fernandez, J. y Gonzales, A. 1993. Gerbera, Lilium, Tulipán y Rosa. Mundi-prensa. España. pp 15-70.
- Bardin, M., Ajouz, S., Comby, M., Lopez, M., Graillot, B., Siegwart, M. y Nicot, P. 2015. Is the efficacy of biological control against plant diseases likely to be more durable than that of chemical pesticides?. *Frontiers in Plant Science.* 6: 1-14.
- Barnes, S. y Shaw, M. 2002. Infection of Commercial Hybrid Primula Seed by *Botrytis cinerea* and Latent Disease Spread Through the Plants. *Epidemiology* 93: 573-578.
- Barret, T. 1975. Preparation of bacterial vaccine. In proceeding of the first workshop of Phytobacteriology. R.N. (Ed). Columbia. University of Missouri. Pp 1-6.
- Basha, S. y Ulaganathan, K. 2002. Antagonism of *Bacillus* species (strain BC121) towards *Curvularia lunata*. *Current Science.* 82: 1457-1463.

Bautista, S. 2006. El control biológico en la reducción de enfermedades postcosecha en productos hortofrutícolas: uso de microorganismos antagónicos. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, 8:1-6.

Beltrán-Pineda, M. 2014. Bacterias solubilizadoras de fosfato con potencial biofertilizante en suelos cultivados con papa (*Solanum tuberosum*). Revista Agronomía. 22:7-20.

Beneduzi, A., Ambrosini, A. y Passaglia, L. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. Genetics and Molecular Biology 35:1044-1051.

Benítez S, Bentley J., Bustamante P., Consuelo L y Corrales L. 2007. Aislamiento de los microorganismos cultivables de la rizosfera de *Ornithogalum umbellatum* y evaluación del posible efecto biocontrolador en dos patógenos del suelo. Publicación científica en ciencias biomédicas. 8:147-153.

Benito, E., Arranz, M. y Eslava, A. 2000. Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. Revista iberoamericana de Micología. 17:S43-S46.

Benson, D y Parker, K. 2011. Efficacy of fungicides and biopesticides for management of *Phytophthora* crown and root rot of Gerber Daisy. Plant Health Progress. Published 12 May 2011.

Berendsen, R., Pieterse, C. y Bakker, P. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. Trends Plant Sci. 17:478-486.

Bhardwaj, G., Shah, R., Joshi, B y P. Patel. 2017. *Klebsiella pneumoniae* VRE36 as a PGPR isolated from *Saccharum officinarum* cultivar Co99004. Journal of Applied Biology & biotechnology. 5: 047-052

Bhat, H., Ahmad, K., Ahanger, R., Qazi, N., Dar, N. y Ganie S. 2013. Status and symptomatology of *Alternaria* leaf blight (*Alternaria alternata*) of Gerbera (*Gerbera jamisonii*) in Kashmir valley. African Journal of Agricultural. 8:819-823.

Bohming, C. 1985. Influencia de la fertilización inorgánica de turba alta sobre la germinación y la calidad de plántulas de gerbera. Anuales de la Academia de Agricultura, Polonia. vol. 49.

Bowe, R., Danhardt, W., Deutschmann, K., Fritzsche, W., Gerstner, W., Junges, W., Korner, W. y Possner, E. 1979) Gerbera. J Neumann-Neudamm, 2nd edn. Melsungen Berlin Basel Wien, 232 pp

Bull, C., Shetty, K. y Subbarao, K. 2002. Interactions between Myxobacteria, plant pathogenic fungi, and biocontrol agents. Plant Dis. 86:889-896.

Cabrera, M., Alvarez, R. y Sosa, A. 2003. Hongos detectados en el filoplano de *gerbera* sp. en corrientes, argentina. Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones científicas y tecnológicas. [En línea]. Consultado: Abril, 2014. Dirección URL <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2003/comunicaciones/05-Agrarias/A-020.pdf>

- Castagno, N., Estrella, M., Sannazzaro, A., Grassano, A., y Ruiz, O. 2011. Phosphate-solubilization mechanism and in vitro plant growth promotion activity mediated by *Pantoea eucalypti* isolated from *Lotus tenuis* rhizosphere in the Salado River Basin (Argentina). *Journal of Applied Microbiology* 110: 1151–1165
- Castell, M. y Escallon, M. 2009. Evaluación *in vitro* del efecto biocontrolador de levaduras aisladas de filoplano de *Physalis peruviana* Linneaus, 1783, (UCHUVA) sobre el hongo fitopatógeno *Alternaria* sp. [En línea] Julio 2015. <http://repository.unimilitar.edu.co/bitstream/10654/408/1/CastellOchoaMaria2009.pdf>
- Casteñada-Agulló, M. 1955. Studies on the biosynthesis of extracellular proteases by bacteria, *The Journal of General Physiology*. 369-375.
- Chincholkar, S., Chaudhari, B. y Rane, M. 2007 *Microbial siderophores in human and plant health-care* en *Microbial Siderophores*, Ajit Varma & Sudhir Chincholkar (Eds.) p: 205-217.
- Chincholkar, S., Chaudhari, BL. Talegaonkar, S. y Kothari, R. 2000. Microbial iron chelators: a sustainable tool for the biocontrol of plant disease. en *Biocontrol potential and its exploitation in sustainable agriculture*. Upadhyay RK, Mukerji KG, Chamola PC (Eds) p: 49–70.
- Chithrashree, A., Udayashankar, A., Chandra, S., Reddy, M., Srinivas, C, 2011. Plant growth-promoting rhizobacteria mediate induced systemic resistance in rice against bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Biological Control* 59:114–122.
- Choquer, M., Fournier, E., Kunz, C., Levis, C, Pradier, J., Simon, A. y Viaud, M. 2006. *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *Microbiol Lett* 277:1–10
- Coley, J., Verhoeff, K. y Jarvis, W. 1980. *The biology of Botrytis*. London, England. Academic Press. 318 p
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C y Barka, E. 2005. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 71:4951-4959.
- Corrales, L., L. Sánchez, Z. Arévalo y V. Moreno. 2014. *Bacillus*: a genus of bacteria that exhibits important phosphate solubilizing abilities NOVA. 12: 165–178
- Dahiya, N., Tewari, R. y Hoondal, G. 2006. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl. Microbiol.* 71: 773-782.
- Dalmaís, B., Schumacher, J., Moraga, J., Le Pecheur, P., Tudzynski, B., Collado, G. y Viaud, M. 2011. The *Botrytis cinerea* phytotoxin botcinic acid requires two polyketide synthases for production and has a redundant role in virulence with botrydial. *Mol Plant Pathol* 12:564–579
- De La Cruz, J., Hidalgo, A., Lora, J., Benitez, T., Pintor, J y Liobell. A. 1992. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. *European Journal of Biochemistry*, 206:859-867

- De Souza, R., Ambrosini, A. y Passaglia, L. 2015. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Gen. Mol. Biol.* 38: 401-409.
- Deepak, P., Yogeshvari, J., Harsha., S. y Rajababu, V. 2016. *Pseudomonas fluorescens*: A Promising Biocontrol Agent and PGPR for Sustainable Agriculture. En D.P. Singh et al. (eds.), *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*, pp: 257-270.
- Devi, K., P. Pandey y Duttsharma.2016. Plant Growth-Promoting Endophyte *Serratia marcescens* AL2-16 Enhances the Growth of *Achyranthes aspera* L. *Journal of Biosciences* 23: 173-180
- Dinesh, R., Anandaraj, M., Kumar, A., Bini, Y., Subila, K y R. Aravind. 2015. Isolation, characterization, and evaluation of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria for their growth promoting and disease suppressing effects on ginger. *Microbiological Research*. 173:34-43.
- Doss, R., Deisenhofer., J. y Von Nidda, H. 2003. Melanin in the extracellular matrix of germlings of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 63: 687-691.
- Doss, R., Potter, S., Soeldner, A., Christian, J. y Fukunaga, L. 1995. Adhesion of germlings of *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology* 61:260-265..
- Doss, R.1999. Composition and enzymatic activity of the extracellular matrix secreted by germlings of *Botrytis cinerea*. *Appl Environ Microbiol* 65: 404–408.
- Dowling, D. y O’Gara F (1994) Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends Biotechnol* 12:133–141
- El Ghaouth, A., Wilson, C. y Wisniewski, M. (1997). Antigungal activity of 2-deoxy-D-glucose on *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, and *Rhizopus stolonifer*: Ultrastructural and cytochemical aspects. *Phytopathology* 87: 772-779
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. y Denle, N. 2007. *Botrytis*: Biology.
- El-Gremf, S., Ghoniem, K., Mohamed, H. y Kamel, S. 2013. Mode of action of *Bacillus pumilus* in suppressing *Pseudoperonospora cubensis* (Berk and Curt) Rostow, the pathogen of downy mildew of cucumber. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* .23:71-77.
- El-Tarabily, K, Soliman, M., Nassar, A., Al-Hassani, H., Sivasithamparam, K., Kenna F. y Hardy G. 2000, Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. *Plant Pathol*, 49:573-583.
- FAO. 2015. Perspectivas a largo plazo: El panorama de la agricultura. [En línea]. Consultado: diciembre 2017. <http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/004/y3557S/y3557s02.pdf>
- Faraldo, J. 2007 *Protein-mediated siderophore uptake in gramnegative bacteria: a structural perspective* en *Microbial Siderophores*. Ajit Varma y Sudhir Chincholkar (Eds.) p:105-120.
- Farhood, S y Hadian, S. 2012 First Report of *Alternaria* Leaf Spot on Gerbera (*Gerbera jamesonii* L.) in North of Iran. *Advances in Environmental Biology*, 6: 621-624.

- Fernández-Larrea, V. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Avances en el fomento fitosanitarios no-sintéticos. Manejo integrado de plagas, (Costa Rica). 62:96-100
- Ferraroto, M., Lima Neto, V. y Tomaz, R. 2008. Doenças em cultivos de gerbera no estado do Paraná. Scientia Agraria, Curitiba.9:481-489.
- Flaishman, M., Eyal, Z., Zilberstein, A., Voisardic., y Hass, D. 1996. Suppression of *Septoria tritici* Blotch and Leaf Rust of Wheat by Recombinant Cyanide-Producing Strains of *Pseudomonas putida*. Molecular Plant-Microbe Interactions. 9: 642-645.
- French, E. y T. Hebert. 1982. Métodos de Investigación Fitopatológica. IICA. San José, Costa Rica. 275 p.
- Gamboa, L. 1991. Cultivo de Gerbera. EUND/CINDE. Costa Rica. 64pp.
- Ghosh, R., Barman, S., Khatun, J., y Mandal, N. 2016. Biological control of *Alternaria alternata* causing leaf spot disease of Aloe vera using two strains of rizobacteria. Biological Control. 97: 102-108.
- Glick, B. 2012. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications; Hindawi Publishing Corporation, Scientifica: Waterloo, Canada
- Gojon, A., Nacry., P. y Davidian, J. 2009. Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. In: Current Opinion in Plant Sciences. 12: 328-338.
- Gómez, A., Mariano, R., Michereff, S., Silvana, E., y Assis, S. 2005. Isolamento de bacterias para testes de antagonismos. 2^{da} edición. Universidad Federal Rural de Pernambuco Recife, PE-Brasil. pp.119-125.
- Goswami, D., Dhandhukia, P., Patel, P. y Thakker, J. 2014. Screening of PGPR from saline desert of Kutch: Growth promotion in *Arachis hypogea* by *Bacillus licheniformis* A2. Microbiol. Res. 169: 66–75.
- Goswami¹, D., Thakker, J., y Dhandhukia, P. 2016. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. Cogent Food & Agriculture. 2: 1-19.
- Goudaa, S., George, R., Dasc, G., Paramithiotisd, S., Han-Seung, S. y Patrac, J. 2018. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agricultura. Microbiological Research 206: 131–140.
- Gourgues, M., Brunet, A., Lebrun,M.y Levis,C. 2004. The tetraspanin BcPls1 is required for appressorium-mediated penetration of *Botrytis cinerea* into host plant leaves. *Molecular Microbiology* 51:619-629.
- Guédez, C. 2009. Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria* spp). Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 29: 34-38.
- Guédez, C., Castillo, C., Cañizales, L. y Oliva, R. 2008. Control biológico: una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. Academia. 7: 50-74.
- Gupta, A. y Gopal, M. 2008. Siderophore production by plant growth promoting rhizobacteria. Indian J. Agric. Res.42:153-156.

- Gupta, G., Singh, S., Kumar, N., Kumar, S. y Singh, V. 2015. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *J Microb Biochem Technol.* 7:96-102.
- Haas, D. y Défago G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 307–319.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R. y Ahmed, I. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann Microbiol.* 60: 579-598.
- Heydari, A. y Pessarakli, M. 2010. A Review on Biological Control of Fungal Plant Pathogens Using Microbial Antagonists. *Journal of Biological Sciences*, 10: 273-290.
- Holz, G., Coertze, S. y Williamson, 2004. The ecology of *botrytis* on plant surfaces. En *Botrytis: Biology, Pathology and Control.* (Elad, Y., Williamson, B. y Tudzynski, P y Denle, N) pp 9-27. Kluwer Academic Psress, Dordrecht, The Nethelandr.
- Hoster, F., Schmitz, J. y 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.
- Jan, T., M. Azam, M., Ali, A. y Haq, Q. 2011. Novel approaches of beneficial *Pseudomonas* in mitigation of plant diseases an appraisal. *J Plant Interact.* 6: 195-205
- Kamei, A., Kumar, A., Dolai. y Kamei, A. 2014. Role of Hydrogen Cyanide Secondary Metabolite of Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Biopesticides of Weeds. *Global Journal of Science Frontier Research.* 14: 108-114.
- Kang, Y., Cheng, J., Mei, L., Hu, J., Piao, Z. y Yin, S. 2010. Action mechanisms of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): a review. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao.* 21:232-238.
- Kars, I. y van Kan, J. 2007. Extracellular enzymes and metabolites involved in pathogenesis of *Botrytis*. en *Elad et al. (eds.), Botrytis: Biology, Pathology and Control.* 99-118.
- Kerssies, a. 1994. Epidemiology of Botrytis spotting on gerbera and rose flowers grown under glass. Aalsmeer, Netherlands. Editorial Nugl. 133Pp [En línea]. Consultado: diciembre 2017 <http://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/fulltext/206984>
- Khan, M., Zaidi, A. y Ahmad, E. 2014. Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms. In: M.S. Khan et al. (eds.), *Phosphate Solubilizing Microorganisms.* Springer International Publishing Switzerland. p. 31-62.
- Khan., M., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves M. y Wani. P. 2010. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi—current perspective. *Arch. Agric. Soil Sci.* 56: 73–98.
- Kishore, N., Pindi, P. y Reddy, R. 2015. Phosphate-Solubilizing Microorganisms: A Critical Review. En *Plant Biology and Biotechnology: Volume I: Plant Diversity, Organization, Function and Improvement* (B. Bahadur et al. (eds.) pp 313-330. Springer India.

- Kloepper, J y N. Schroth. 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. 879-882.
- Kloepper, J., Lifshitz, R. y Zablotowicz, R. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* 7:39–43.
- Kloepper, J., Rodríguez-Ubana, R., Zehnder, G., Murphy, J., Sikora, E. y Fernández, C. 1999. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Australasian Plant Pathology* 28:21-26.
- Kremer, R. y Souissi, T. 2001. Cyanide Production by Rhizobacteria and Potential for Suppression of Weed Seedling Growth. *Current Microbiology.* 43:182–186
- Kuan, K., Othman, R., Rahim, K y Shamsuddin, Z. 2016. Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions. *PLoS One.*11(3)
- Kumar, C., y Saraf, M. 2015. Plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): a review. *Journal of Agricultural Research and Development.* 5:0108-0119.
- Kumar, V. y Sharman, N. 2017. Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Growth Promoters for Wheat: A Review. *Agricultural Research and Technology: Open Access Journal.* 12: 001-007.
- Kumari, A., Goyal, R., Choudhary, M. y Sindhu, S. 2015. Response of single and co-inoculation of plant growth promoting rhizobacteria on growth, flowering and nutrient content of chrysanthemum. *Academic journals.* 9: 1896-1906.
- Kundan, R., G. Pant, N. Jadon y A. Kumar. 2015. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Mechanism and Current Prospective. *J Biofertil Biopestici* 6:155
- Lamsal, K., Woo, S., Seok, Y. y Su, Y. 2012. Application of Rhizobacteria for Plant Growth Promotion Effect and Biocontrol of Anthracnose Caused by *Colletotrichum acutatum* on Pepper. *Mycobiology.* 40: 244–251.
- Lara, H. y Ferrera-Cerrato, R. 2007. Mecanismos microbiológicos en el control biológico. En: *Microbiología Agrícola.* Ferrera-Cerrato R. y Alarcón A. Editorial Trilla, México DF. pp342-404.
- Latorre, B., Elfa, M. y Ferrada, E. 2015. Gray mold caused by *Botrytis cinerea* limits grape production in Chile. *Cien. Inv. Agr.* 42:305-330.
- Le, G., Luan, M., Fassotte, B., Jardon, P., Verheggen, F., Delaplace, P. y Jijakli, M. 2016. Implementing plant biostimulants and biocontrol strategies in the agroecological management of cultivated ecosystems. A review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 20:299-313.
- Li, B., Li, Y., Wu, H., Zhang, F.F, Li, C., Li, X., Lambers, H. y Li, L. 2016. Root exudates drive interspecific facilitation by enhancing nodulation and N-2 fixation. *Proc Natl Acad Sci.* 113:6496–650

- López, R. y López, M. 1990. *El diagnóstico de suelos y Plantas – Métodos de campo y laboratorio*. Cuarta Edición. Mundi-Prensa. Madrid, España. 363p.
- Lorck, H. 2004. Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Plant Physiol* 1:142–146
- Lugtenberg, B. y Kamilova, F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 541-56.
- Maciel, N. 1992. Horticultura Ornamental Venezolana Análisis Retro y Prospectivo. [En línea]. Consultado: Agosto 2017. <http://www.cuft.tec.ve/publicaciones/barquisimeto/umbral/revistas/rev15/docII15.pdf>
- Maksimova, I., Abizgil'dina, R. y Pusenkova, L. 2011. Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Alternative to Chemical Crop Protectors from Pathogens (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*. 47:333–345.
- Mariano, R., A. Gomes, S. Michereff, S. Assis y E. Silveira, E. 2005. Antagonismo de bacterias a fitopatógenos. Manual de prácticas en fitopatología. 2^{da} edición. Universidad Federal Rural de Pernambuco Recife, PE-Brasil. pp127-135.
- Martínez M. y Moreno Z. 2008. Estandarización de una metodología para la evaluación de eficacia de productos para la protección de cultivo (PPC) preventivos para el control de *Botrytis* sp. En condiciones semicontroladas. [En línea] Julio 2017. <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis104.pdf>
- Martínez, S., Rojas, D., Hernández, R-. Prieto, C., Orozco., Peña, J., Sakudac, S., Valencia., E. y Santoyoa, G. 2014. Potential use and mode of action of the new strain *Bacillus thuringiensis* UM96 for the biological control of the grey mould phytopathogen *Botrytis cinerea*. *Biocontrol Science and Technology*. 24: 1349-1362.
- Mejias, R y Hernandez Y. 2010. Uso de bacterias antagonistas para el control de la marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* Smith en el cultivo de tomate. Trabajo de grado. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 56pp.
- Mirkova, E., Konstantinova, P. 2003. First report of *Alternaria* leaf spot on gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolux ex J.D Hook) in Bulgaria, *Journal of Phytopathology*. 151:323-328.
- Molina, G., Zalsua, S., Gonzalez, G., y Sanfeuntes, E. 2006. Selección de hongos antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en viveros forestales en Chile. *BOSQUE* 2: 126-134.
- Mommer, L., Hinsinger, P., Prigent, C., Visser, E. 2016. Advances in the rhizosphere: stretching the interface of life. *Plant Soil*. 407:1–8
- Muckenschnabel, I., Goodman, B., Williamson, B., Lyon, G. y Deighton, N. 2002. Infection of leaves of *Arabidopsis thaliana* by *Botrytis cinerea*: changes in ascorbic acid, free radicals and lipid peroxidation products. *Journal of Experimental Botany*. 53: 207-214.
- Nagrle, D., Gaikwad, A. y Sharma, L. 2013. Morphological and cultural characterization of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler blight of gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolux ex J.D. Hook). *Journal of Applied and Natural Science* 5:171-178.

- Neeraja, C., Anil, K., Purushotham, P., Suma, K. Sarma, p., Moerschbacher, B. y Podile, A. 2010. Biotechnological approaches to develop bacterial chitinases as a bioshield against fungal diseases of plants. *Critical Reviews in Biotechnology*. 30: 231–241
- Nega, A. 2014. Review on Concepts in Biological Control of Plant Pathogens. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*. 4: 33-54.
- Nisha, K., D. Padma, S. Vasandha, K. Sunitha. 2014. Role of Phosphorous Solubilizing Microorganisms to Eradicate P Deficiency in Plants: A Review. *Int. J. Sci. Res.* 4:1-5.
- Olanrewaju, O., Glick, B. y Babalola, O. 2017. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World J Microbiol Biotechnol.* 33:197
- Ordentlich, A., Y. Elad, y I. Chet. 1988. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 78:84-88.
- Ortega, L., Miranda, D. y Sandoval, M. 2006. Densidad de huevos y ninfas de mosca blanca trialeurodes vaporariorum (West.) en *Gerbera jamesonii* H. Bolus con diferentes regímenes de fertilización nitrogenada. *AGROCIENCIA*. 40: 363-371.
- Oteino, N., Lally, R., Kiwanuka, S., Lloyd, A. y. Ryan, D. 2015. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Front. Microbiol.* 6:745.
- Pal K. y Gardener, B. 2006. Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*. 1-25
- Pal, K., Tilak, K., Saxena, V., Dey, K., Singh, C. 2000. Antifungal characteristics of a fluorescent *Pseudomonas* strain involved in the biological control of *Rhizoctonia solani*. *Microbiol.*
- Palmucci, H., Rivera, M. y Wright, E. 1997. *Botrytis cinerea* Pers. en plantas ornamentales cultivadas en Argentina. *Boletín Sanidad Vegetal de Plagas*. 23: 295-299
- Palumbo, J., Yuen, Y., Jochum, C., Tatum, K., y Kobayashi, Y. 2005. Mutagenesis of beta-1,3-glucanase genes in *Lysobacter enzymogenes* strain C3 results in reduced biological control activity toward Bipolaris leaf spot of tall fescue and *Pythium* damping-off of sugar beet. *Phytopathology* 95: 701-707
- Pansare, M. 2013. Histopathology, epidemiology, varietal screening and management of leaf spot of gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolux ex J.D. Hook) caused by *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler under controlled conditions. Trabajo para optar a Master of Science. Department of Plant Pathology. Faculty of Horticulture. Navsari Agricultural University. Gujarat, India. 303pp.
- Patiño, C. y Sanclemente, O. 2014. Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF): una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible. *Entramado*. 10: 288-297.
- Pavlova, S., Leontieva, M., Minorva, T., Kolomeitseva, G., Netrosov, A. y E, Tsavkelova. 2017. Colonization strategy of the endophytic plant growth-promoting strains of *pseudomonas fluorescens* and *klebsiella oxytoca* on the seeds, seedlings and roots of the epiphytic orchid, *dendrobium nobile* lindl. *journal of Applied Microbiology* 123:217

- Pérez, F., Alías, C., Bellogín, R., del Cerro, R. Espuny, M. y Jiménez, I. 2014. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiol. Res.* 169: 325–333.
- Pérez, L. 2008. Mecanismos de respuesta frente a la infección por *Botrytis cinerea* en *Solanum lycopersicum*. Estudio de las β -1,4-endoglucanasas y de tratamientos inductores.
- Pishchik, V., Chernyaeva, I., Kozhemaykov, A., Vorobyov, I., Lazarev, A. y Kozlov, L. 1998. Effect of inoculation with nitrogen-fixing *Klebsiella* on potato yield. En: Malik K.A., Mirza M.S., Ladha J.K. (eds) Nitrogen Fixation with Non-Legumes. Developments in Plant and Soil Sciences, vol 79. Springer, Dordrecht
- Praveen, N., Vijayaraghavan, R., Ajith M. y James, D. 2017. An Investigation on the Etiology and Characterization of Fungal Diseases of *Gerbera*. *Int. J. Curr. Microbiol.* 6: 2038-2043
- Pravin, V., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S. y Nasrulhaq, A. 2016. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability—A Review. *Molecules.* 21:1-17.
- Prensa-Orquídea, 2012. Compromiso para fortalecer la producción florícola en Miranda. [En línea]. Consultado: Abril 2016 <http://orquidea.com.ve/beta/noticias-de-interes/166-empresa-mixta-ruso-venezolana-orquidea-sa-ratifica-su-compromiso-para-fortalecer-la-produccion-floricola-en-miranda>
- Prensa-Orquídea. 2013. Apertura Primera tienda de flores venezolanas en Moscú. [En línea]. Consultado: Abril 2016. [http://www.mat.gob.ve/modulos/detallenoticias.php?iddetalleN=14715&strtitulo=EMPRESA%20MIXTA%20RUSO-VENEZOLANA%20ORQU%C3%8DDEA%20S.A.%20APERTURA%20PRIMERA%20TIENDA%20DE%20FLORES%20VENEZOLANAS%20EN%20MOSC%C3%9A.;cargarContenido\(%27modulos/fotonoticias.php?iddetalleN=14715%27,%27lateral%27\)](http://www.mat.gob.ve/modulos/detallenoticias.php?iddetalleN=14715&strtitulo=EMPRESA%20MIXTA%20RUSO-VENEZOLANA%20ORQU%C3%8DDEA%20S.A.%20APERTURA%20PRIMERA%20TIENDA%20DE%20FLORES%20VENEZOLANAS%20EN%20MOSC%C3%9A.;cargarContenido(%27modulos/fotonoticias.php?iddetalleN=14715%27,%27lateral%27))
- Prins, T., Tudzynski, P., Von Tiedemann, A., Tudzynski, B., ten Have, A., Hansen, M., Tenberge, K. y Van Kan, J. 2000. Infection strategies of *Botrytis cinerea* and related necrotrophic pathogens. En: J. W. Kronstad, (Ed), Fungal Pathology, Kluwer Academic Publishers., 33-64.
- Rajkumar, M., Prasad, M. y Freitas, H. 2010. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends Biotechnol.* 28: 142–149
- Ramjagathesr, R. y Ebenezer, E. 2012. Morphology and physiology characters of *Alternaria alternata* causing leaf blight disease of onion. *Int. J. Plant. Pathol.* 1-11
- Rao, A., y Kishore, K. 2006. Plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant-Associated Bacteria* pp 195-230.
- Reddy, P. 2014. Plant growth promoting rhizobacteria for horticultural crop protection. New Delhi: Springer.
- Rijavec, T., y Lapanje, A. 2016. Hydrogen Cyanide in the Rhizosphere: Not Suppressing Plant Pathogens, but Rather Regulating Availability of Phosphate. *Frontiers in Microbiology.* 7:1785.

Rogg, H. 2000. Manejo integrado y control biológico de Plagas y Enfermedades. Editorial Abya-Yala. Quito-Ecuador. pp 65-80.

Rolke, Y., Liu, S., Quidde, T., Williamson, B., Schouten, A., Weltring, K., Siewers, V., Tenberge, K., Tudzynski, B. y Tudzynski P. 2004. Functional analysis of H₂O₂-generating systems in *Botrytis cinerea*: the major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable. *Mol Plant Pathol.* 5:17-27.

Rubio, V., y Fereres, A. 2005. Control biológico de plagas y enfermedades de los cultivos. [En línea] Agosto 2017. <http://digital.csic.es/bitstream/10261/13780/1/46.%20Rubio%20and%20Fereres%2C%202005.pdf>

Sachdev, D., Chaudhari, H., Kasture, V., Dhavale, D. y Chopade, B. 2009. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing *Klebsiella pneumoniae* strains from rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum*) and their effect on plant growth. *Indian J Exp Biol.* 47:993-1000.

Saharan, B y Nehra, V. 2011. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research.* 2011: LSMR-21.

Salinas, J y Verhoeff, F. 1995. Microscopical studies of the infection of gerbera flowers by *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 101: 377-386

Sambrook J, Russell DW. 2001. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sánchez, M. 2007. Las Endomicorrizas: Expresión biodáfica. Palmira: Universidad Nacional de Colombia. pp 84. 114

Sane, A. y Narayana, G. 2001. Characterization of gerbera (*Gerbera jamesonii*) genotypes using morphological characters. *Plant Genetic Resources Newsletter.* 128:67-71.

Santner, A., Calderon-Villalobos, L. y Estelle, M. 2009. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology.* 5:301-307.

Santoro, M., Cappellari, L., Giordano, W y E. Banchio. 2015. Plant growth-promoting effects of native *Pseudomonas* strains on *Mentha piperita* (peppermint): an in vitro study. *Plant Biol (Stuttg).* 17:1218-1226.

Santos, M., Diáñez, F., De Cara, M., Camacho., F. y Tello, J. 2010. El control biológico de plagas y enfermedades. un encuadre crítico. *Cuadernos de Estudios Agroalimentarios.* 1: 61-72.

Santoyo, G., Valencia, E., Orozo, M., Peña, J. y Farias, R. 2009. Papel de los sideróforos en la actividad antagónica de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 hacia hongos fitopatógenos *Terra Latinoamericana.* 28: 53-60.

Saraf, M., Pandya, U. y Thakkar, A. 2014. Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens. *Microbiological Research* 169: 18-29.

Sayyed R. y Patel., P. 2011 Biocontrol potential of siderophore producing heavy metal resistant *Alcaligenes* sp. and *Pseudomonas aerogenosa* RZS3. vis-à-vis organophosphorus fungicide. *Ind J Microbiol* 51:266–272.

Sayyed, R., Chincholkar, S., Reddy, M., Gangurde, N., y Patel, P. 2013. Siderophore Producing PGPR for Crop Nutrition and Phytopathogen Suppression. En: Maheshwari D. (eds) *Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management*. Springer, Berlin, Heidelber. pp 449-471.

Sayyed, R., Naphade, B. y Chincholkar, S. 2005. Ecologically competent rhizobacteria for plant growth promotion and disease management. En: Rai MK, Chikhale NJ, Thakare PV, Wadegaonkar PA, Ramteke AP (eds) *Rec trends biotechnol*. Scientifi c Publishers, Jodhpur, pp 1–16

Sayyed, R., Reddy, M., Kumar, K., Yellareddygar, S., Deshmukh, A., Patel, P. y Gangurde, N. 2012. Potential of plant growth-promoting rhizobacteria for sustainable agriculture. En: Maheshwari DK (ed) *Bacteria in agrobiolgy: plant probiotics*. Springer, Berlin-Heidelberg, pp 287–313

Schouten, A., Tenberge, K., Vermeer, J., Stewart, J., Wagemakers, L., Williamson, B., y van Kan, J. 2002. Functional analysis of an extracellular catalase of *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology* 3:227-238.

Schumacher, J. y Tudzynski, P. 2012. Morphogenesis and infection in *Botrytis cinerea*. En: Morphogenesis and pathogenicity in fungi. Pérez-Martín, J. y Di Pietro, A. (eds.). pag. 225-241. Springer, Berlin/Heidelberg.

Schwyn, B y J. Neilands .1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* 160:47-56.

Sengupta, C., Bhosale, A. y Malusare, S. 2015. Effect of plant growth promoting rhizobacteria on seed germination and seedling development of *Zea mays*. *International Journal of Research in Advent Technology* (E-ISSN: 2321-9637) Special Issue National Conference “ACGT 2015”

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

Shaikh, S. y Sayyed, R. 2015 Role of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Their Formulation in Biocontrol of Plant Diseases. Arora N. (eds) En: *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets* Springer India pp 337-351.

Sharabani, G., Shtienberg, D., y Elad, Y. (1999). Epidemiology of *Botrytis cinerea* in Sweet Basil and Implications for Disease Management. *Plant Disease* 83: 554-560.

Sharma, S., Sayyed, R., Trivedi, M. y Gobi, T. 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus* 2:587.

Sharpley, A. 2012. Phosphorus availability. In: *Handbook of soil sciences*,. 2: 14–37

Sheela, V. 2008. *Flowers for Trade*. New India Publishing. India. 157-178pp.

Sheng, J., Duck, H., Joon-Young K., y Byung-Sup K. 2016. Biological control of gray mold and growth promotion of tomato using *Bacillus* spp. isolated from soil. Trop plant pathol. Tropical Plant Pathology 41:169-176

Shtienberg, D. 2013. *Alternaria* diseases of potatoes: epidemiology and management under Israeli conditions. Fourteenth Euroblight Workshop

Singh, H. 2006. Flower Crops. Cultivation and Management. New India-publishing agency. India. pp 127-146

Sivasakthi, S., Usharani, G., y Saranraj, P. 2014. Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR) - *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. African Journal of Agricultural Research. 9:1265-1277.

Someya, N., Kataoka, N., Komagata, T., Hirayae, K., Hibi, T. y Akutsu, K. 2000. Biological Control of Cyclamen Soilborne Diseases by *Serratia marcescens* Plant Dis., 84 : 334.

Soroa, M. 2005. Revisión bibliográfica *Gerbera jamesonii* L. Bolus. Cultivos tropicales. 2: 65-75.

Soroa, M., Hernández, A., Soto F., Cortes, S. y Terri, F. 2009. Identificación de algunas especies de microorganismos benéficos en la rizosfera de gerbera y su efecto en la productividad. Revista Chapingo Serie Horticultura 15: 41-48.

Soroa, M., Soto, F. y Terry, E. 2007. Crecimiento de posturas de *Gerbera jamesonii* establecidas con diferentes alternativas nutricionales. Cultivos Tropicales. 28:41-49.

Peighami A., Sharifi, T., Ahmadzadeh, M. y Behboudi, K. 2009. Selection of bacterial antagonists for the biological control of *Botrytis cinerea* in apple (*Malus domestica*) and in comparison with application of thiabendazole. Communications in agricultural and applied biological sciences 74:739-743.

Tejera, B., Rojas, M., y Heydrich, M. 2011. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. Revista CENIC. Ciencias Biológicas. 42: 131-138.

Ten Have, A., Tenberge, K., Benen, J., Tudzynski, P., Visser, J. y van Kan, J. 2002. The contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of fungal plant pathogens. pp. 341-358 en F. Kempken (ed.), The Mycota XI, Agricultural applications, Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/New York.

Torres, D., A. Florentino y M. López. 2006. Indicadores e índices de calidad de suelo en un Ultisol bajo diferentes prácticas de manejo conservacionista en Guárico, Venezuela. Bioagro. Volumen 18:83-91. Trabajo de grado Doctoral. Facultad de Ciencia Biológica. Universitat de València. Valencia, España. 250pp.

Trujillo, I., Díaz, A., Hernández, A., y Heydrich, M. 2007. Antagonismo de cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia* contra hongos fitopatógenos del arroz y el maíz. Revista de Protección Vegetal 22:41-46.

- Tudzynski, P. y Siewers, V. 2004. Approaches to molecular genetics and genomics of Botrytis. en Botrytis: Biology, Pathology and Control Elad, Y. et al., (eds), pp. 53–66, Kluwer Academic Publishers.
- Vacheron , J., Desbrosses, G., Bouffaud , M.,Touraine, B., Moëgne, Y., Muller, D., Legendre , L., Wisniewski, F.³ y Prigent, C. 2013. Plant growth-promoting rizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science* 4:1-18.
- Vale Barrero, M., Bonifacio, A., Cerqueira., A. y Araujo, F. 2016. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Key Mechanisms of Action. Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants pp 23-37.
- Valenzuela, M. 2001. Gerbera. Ediciones Hortitecnia Ltda., Bogotá, Colombia.
- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S. y Boyce, A. 2016. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability-A Review. *Molecules*. 21: 573.
- Veliz, E., P. Martínez y A. Hirsch. 2017. Chitinase-producing bacteria and their role in biocontrol. *AIMS Microbiology*, 3: 689-705
- Venner, C. y Martin, M. 2009. Aislamiento y selección de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en cultivos de uchuva (*Physalis peruviana* L.) con capacidad antagonica frente a *Fusarium* sp. Trabajo de grado para optar al título de Microbiología agrícola y veterinario. Pontificia Universidad Javeriana. 45 pp. [En línea] noviembre 2017. <http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis435.pdf>
- Verbon ,E. y Liberman, L. 2016. Beneficial microbes affect endogenous mechanisms controlling root development. *Trends Plant Sci*. 3: 218–229.
- Vero, S. y Mondino P. 2002. Control biológico de enfermedades en planta. [En línea]. Consultado: Marzo, 2017. Dirección URL: <http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/publica/ArticuloUA.pdf>
- Vikram, A. y Hamzehzarghani. H. 2008. Effect of phosphate solubilizing bacteria on nodulation and growth parameters of greengram (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Research Journal of Microbiology* 3:62-72.
- Villamil, J., Blanco, J. y Viteri, S. 2012. Evaluación *in vitro* de Microorganismos Nativos por su Antagonismo contra *Moniliophthora roreri* Cif & Par en Cacao (*Theobroma cacao* L.). *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*. 65: 6305-6315.
- 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
- Vyas, P. y Gulati, A. 2009 Organic acid production *in vitro* and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. *BMC Microbiol*. 9: 174-89.
- Walker, T., Pal Bais H., Grotewold, E. y Vivanco, J. 2003. Root Exudation and Rhizosphere Biology. *Plant Physiol*. 132: 44-51.

- Wang, K., Pei, Y., Li, C., Qing, D., Chi, S. y Teng, Z. 2013. Potential of Chitinolytic *Serratia marcescens* Strain JPP1 for Biological Control of *Aspergillus parasiticus* and Aflatoxin. *BioMed Research International*. 2013: 1-8.
- Weisburg, L., Barns, S., Pelletier, D. y Lane, D. 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology*. 173: 697-703
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P. y Van Kan, J. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*. 8: 561–580.
- Wolcan, S. 2010. First report of downy mildew caused by *Bremia lactucae* on *Gerbera jamesonii* in Argentina. *Australasian Plant Disease Notes*. 5: 98–100.
- Yan, L., Jing, T., Yujun, Y., Bin, L., Hui, L. y Chun L. 2011. Biocontrol Efficiency of *Bacillus subtilis* SL-13 and Characterization of an Antifungal Chitinase. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 19: 128-134.
- Zaim, S., Belabid, L., Bayaa, L. y Amine, A. 2016. Biological Control of Chickpea Fusarium Wilts Using Rhizobacteria PGPR. *Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants* pp 147-162.
- Zhao, Y. 2010. Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu Rev Plant Biol*. 2: 49–64.