

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida
con orientación en Microbiología**

**Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de
crecimiento vegetal de la rizósfera de *Solanum hindsianum***

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Carmen Sanjuana Delgado Ramírez

Ensenada, Baja California, México
2020

Tesis defendida por
Carmen Sanjuana Delgado Ramírez

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Rufina Hernández Martínez
Codirectora de tesis

Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo
Codirector de tesis

Miembros del comité

Dra. Jimena Carrillo Tripp

Dr. Jesús Favela Vara



Dra. Patricia Juárez Camacho
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Carmen Sanjuana Delgado Ramírez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología Celular y Molecular

Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de *Solanum hindsianum*

Resumen aprobado por:

Dra. Rufina Hernández Martínez
Codirectora de tesis

Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo
Codirector de tesis

En el estado de Baja California (BC) el tomate es el principal producto hortícola. En su producción, para el control de plagas y enfermedades, se llegan a utilizar alrededor de 35 agroquímicos. El principal patógeno de este cultivo es el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*FOL*). Para disminuir el uso de agroquímicos, una estrategia es emplear Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (PGPR), las cuales tienen la capacidad de mejorar el desarrollo de las plantas y disminuir el daño causado por fitopatógenos. La efectividad de las PGPR depende de su adaptación a las condiciones ambientales, por ello, se recomienda utilizar microorganismos nativos. Las plantas adaptadas a condiciones climáticas extremas como *Solanum hindsianum*, pueden contener PGPR para usarse en aplicaciones agrícolas. Este arbusto nativo de BC pertenece a la familia Solanaceae y crece en condiciones áridas y cálidas. El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar PGPR de la rizósfera del arbusto *S. hindsianum* y evaluar su efecto en plantas de tomate como bioestimulantes y biocontroladoras de *FOL*. Usando medios selectivos, se aislaron 348 cepas de 12 muestras de suelo de rizósfera. Estas fueron evaluadas *in vitro* para determinar características de promoción de crecimiento y su actividad antagónica sobre *FOL*. Seis cepas, pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus* y *Streptomyces*, mostraron capacidad de promover el crecimiento vegetal y cinco mostraron actividad antagónica. Los once aislados fueron evaluados *in vivo* para determinar su capacidad de inducir el crecimiento y la supresión de *FOL* raza 1 y raza 2 en plantas de tomate de la variedad Bonny Best. Las seis cepas evaluadas para promoción de crecimiento mostraron un efecto positivo en el desarrollo de las plantas. Con respecto a las cinco PGPR evaluadas para actividad antagónica, dos del género *Streptomyces*, causaron un efecto negativo en el crecimiento de la planta; las tres restantes, redujeron significativamente el daño causado por el patógeno. Este trabajo contribuye con la identificación de PGPR endémicas de BC que podrían ser emplearse por los agricultores del estado para el control de *FOL* en tomate y con ello disminuir el uso de agroquímicos.

Palabras clave: Control biológico, PGPR, *Solanum hindsianum*

Abstract of the thesis presented by **Carmen Sanjuana Delgado Ramírez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life in Sciences with orientation in Microbiology

Isolation and characterization of plant growth promoting bacteria from the rhizosphere of *Solanum hindsianum*

Abstract approved by:

Ph. D. Rufina Hernández Martínez
Thesis Director

Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo
Thesis Director

In the state of Baja California (BC) tomato is the main horticultural product. In its production, around agrochemical are used for the control of pests and diseases. The main pathogen of this crop is the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (FOL). One strategy to diminish the use of agrochemicals, one strategy is to employ Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR), which have the ability to improve plant development and decrease the damage caused by plant pathogens. The success of PGPR, depends on their adaptation to the environmental conditions, therefore, the use of native microorganisms is recommended. Plants adapted to extreme weather conditions, such as *Solanum hindsianum*, may contain PGPR for agricultural applications. This native shrub of Baja California belongs to the Solanacea family and grows in arid and warm conditions. The objective of this work was to isolate and characterize PGPR from the rhizosphere of the *S. hindsianum* and to evaluate their effect on tomato plants as biostimulants and biocontrollers of FOL. Using selective media, 348 isolates were obtained from twelve rhizosphere soil samples. Isolates were evaluated in vitro to determine their growth-promoting characteristics and their antagonistic activity against FOL. Six strains, belonging to the genera *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus* and *Streptomyces*, showed ability to promote plant growth and five more had antagonistic activity. Tomato plants (var. Bonny Best) were used to determine the strains ability to induce plant growth and suppression of FOL races 1 and race 2. The six strains evaluated for growth promotion have a positive effect on plant development. With respect to the five PGPR evaluated for antagonistic activity, the two *Streptomyces* isolates, caused a negative effect on plant growth; the remaining three, reduced significantly reduced the damage caused by the pathogen. This work contributed to the identification of BC-endemic PGPRs that could be used by state farmers to control FOL in tomato reducing the use of agrochemicals.

Keywords: Biological control, PGPR, *Solanum hindsianum*

Dedicatorias

Este trabajo se lo dedico a mi amado esposo

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por darme la oportunidad para realizar mi maestría en esta institución.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico durante mi estancia en la maestría (N. 912961).

A la Dra. Rufina Hernández por aceptarme como su estudiante hace dos años, por sus consejos y ayuda en cada uno de los ensayos realizados. Además, por sus aportaciones que hicieron crecer este proyecto.

Al Dr. Edgardo Sepúlveda por apoyarme incondicionalmente. Por siempre escuchar las propuestas y motivarme a seguir trabajando.

A los miembros del comité de tesis, Dra. Jimena Carrillo y Dr. Jesús Favela por las observaciones y revisiones realizadas para mejorar este proyecto.

A Ana Laura Ramos gracias por el apoyo y la paciencia brindada durante la realización de la identificación molecular de las bacterias.

Al personal técnico, y administrativo del CICESE y del Departamento de Microbiología.

Al técnico Marío Salazar por el apoyo brindado durante el manejo y secado de plantas de tomate.

A Edelweiss por su amistad incondicional y su invaluable ayuda en la realización de mis primeros ensayos y por compartir conmigo su experiencia en el laboratorio.

A mi mejor amiga Andrea, por estar conmigo en las buenas, en las malas y en las peores. Por animarme y ayudarme en cada uno de los ensayos. Pero sobretodo por su apoyo incondicional durante los meses de cuarentena.

A los estudiantes de estancias de verano y prácticas profesionales, Yessica Osorio, Edith Márquez y Alondra Campas por estar siempre con la disposición de aprender y de ayudar en los diferentes ensayos realizados.

Al Rancho Don Juanito por la donación de plantas de tomate en el año 2019.

A los estudiantes de verano de investigación del año 2019, Estrella, Karina, Rebeca, Nestor, Sheila, Marcela, Gema y Salvador, por su ayuda al realizar la evaluación de los primeros ensayos en planta.

A mi estimado profesor el Dr. Luis Felipe por sus buenos consejos que siempre me motivaron a continuar.

A mis amigos Lluvia, Molly, José Luisssssssssss, Vero, Fausto, Leobardo, Paola, Diana y Marilyn por brindarme su apoyo y amistad incondicional durante estos dos años.

A los ex-alumnos del laboratorio de Fitopatología Rodrigo Torres, Sara Armenta y Candelario Serrano por el trabajo previo que realizaron el cual fue de mucha ayuda en este proyecto.

A mi familia, a mis padres por siempre apoyarme y creer en mi, a mi hermana Bety por por hacer posible que tuviera un bonito mapa de los sitios de muestreo y a mi pequeño hermano Alfonso por motivarme aún en los momentos mas difíciles.

A mi amado esposo, porque el alcanzar este logro no hubiese sido posible sin tu ayuda. Gracias por cuidarme, apoyarme y por siempre creer en mi. Gracias por ser parte de mi vida.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas.....	xi

Capítulo 1. Introducción

1.1 Antecedentes	3
1.1.1 Aspectos generales de las Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (PGPR)	3
1.1.2 Asociación entre plantas de ambientes áridos y PGPR.....	4
1.1.3 Producción agrícola en Baja California.....	4
1.1.4 Producción de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	5
1.1.5 Marchitez vascular en el cultivo de tomate causada por <i>Fusarium oxysporum</i>	5
1.1.6 <i>Solanum hindsianum</i> Benth	6
1.1.7 Antecedentes de aislamiento de PGPR de zonas áridas y de plantas nativas.....	6
1.2 Justificación	7
1.3 Hipótesis.....	7
1.4 Objetivo.....	8
1.4.1 Objetivo general	8
1.4.2 Objetivos específicos	8

Capítulo 2. Metodología

2.1 Visión general del trabajo	9
2.2 Aislamiento de bacterias de muestras de suelo de rizósfera	11
2.3 Evaluación <i>in vitro</i> de las características de promoción de crecimiento vegetal de las bacterias aisladas.....	12
2.3.1 Preparación de inóculos	12
2.3.2 Producción de ácido indol acético	13
2.3.3 Producción de quitinasas	13
2.3.4 Producción de sideróforos	14
2.3.5 Producción de ácido cianhídrico (HCN).....	14

2.3.6	Solubilización de fósforo	15
2.3.7	Solubilización de potasio.....	15
2.4	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antagónica de las bacterias aisladas	16
2.4.1	Cuantificación de la actividad antagónica contra <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> raza 1 y 2	17
2.5	Selección de aislados bacterianos	17
2.6	Identificación molecular de aislados bacterianos	18
2.7	Caracterización de aislados seleccionados.....	19
2.7.1	Preparación de inóculo.....	19
2.7.2	Cuantificación de la producción de ácido indol acético	19
2.7.3	Formación de biofilm.....	20
2.7.4	Fijación de nitrógeno	20
2.7.5	Solubilización de zinc	21
2.7.6	Actividad de ACC (1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico) desaminasa.....	21
2.7.7	Evaluación de actividad antagónica.....	22
2.8	Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de los aislados bacterianos seleccionados sobre la germinación de semillas de tomate (<i>S. lycopersicum</i> L.).....	22
2.9	Ensayos <i>in vivo</i>	23
2.9.1	Manejo de plantas para ensayos <i>in vivo</i>	23
2.9.2	Evaluación de la promoción del crecimiento de los aislados seleccionados	23
2.9.3	Evaluación de la actividad antagónica de los aislados seleccionados contra <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> raza 1 y 2	24
2.9.4	Análisis estadístico	25

Capítulo 3. Resultados

3.1	Aislamiento de bacterias de muestras de suelo de la rizósfera del arbusto <i>Solanum hindsianum</i>	26
3.2	Evaluación <i>in vitro</i> de las características de promoción de crecimiento vegetal de las bacterias aisladas.....	27
3.3	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antagónica de las bacterias.....	29
3.4	Cuantificación <i>in vitro</i> de la capacidad antagónica contra <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> razas 1 y 2.....	32
3.5	Selección e Identificación molecular de aislados	33
3.5.1	Aislados con características de promoción de crecimiento	33
3.5.2	Aislados con actividad antagónica	34
3.6	Caracterización de aislados seleccionados por su actividad antagónica y sus características de promoción de crecimiento	35

3.7 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de los aislados bacterianos seleccionados sobre la germinación de <i>Solanum lycopersicum</i>	39
3.7.1 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de aislados bacterianos con características de promoción de crecimiento sobre la germinación de <i>S. lycopersicum</i>	39
3.7.2 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de aislados bacterianos con actividad antagónica sobre la germinación de <i>S. lycopersicum</i>	41
3.8 Evaluación de la actividad en la promoción del crecimiento en plantas de tomate.....	43
3.9 Evaluación de la actividad antagónica <i>in planta</i> de aislados bacterianos contra <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	45
Capítulo 4. Discusión.....	49
Capítulo 5. Conclusiones.....	54
Literatura citada.....	55
Anexos.....	65

Lista de figuras

Figura		Página
1	Diagrama de actividades realizadas en la metodología.....	10
2	Distribución de los sitios de muestreo.....	26
3	Ejemplos de resultados obtenidos de las seis pruebas colorimétricas realizadas.....	28
4	Ejemplo de selección de aislados por su actividad antagónica.....	29
5	Ensayo dual evaluando el aislado rbES245 contra <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> raza 1 y 2...33	33
6	Aislados bacterianos obtenidos de la rizósfera de <i>Solanum hindsianum</i> en ensayos duales contra diferentes fitópatógenos.....	38
7	Evaluación del porcentaje de germinación de semillas de tomate inoculadas con aislados bacterianos seleccionados por su potencial de promover el crecimiento.....	39
8	Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de ocho de los doce aislados bacterianos evaluados por sus características de promoción de crecimiento sobre <i>S. lycopersicum</i> var. Bonny Best.....	40
9	Porcentaje de germinación de semillas de tomate inoculadas con ocho diferentes aislados bacterianos seleccionados por su actividad antagónica.....	41
10	Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de aislados bacterianos con actividad antagónica sobre la germinación de <i>S. lycopersicum</i> var. Bonny Best.....	42
11	Resultados de la evaluación en la promoción del crecimiento de aislados bacterianos en plantas de tomate.....	44
12	Plantas de tomate representativas de los diferentes tratamientos del ensayo de antagonismo.....	48

Lista de tablas

Tabla	Página
1 Identificación de los sitios de colecta de las muestras usadas en este trabajo.....	12
2 Aislados obtenidos de las doce muestras de suelo colectados de la rizósfera del arbusto <i>S. hindsianum</i>	27
3 Resultados positivos por muestra de las seis pruebas colorimétricas realizadas.....	27
4 Cepas bacterianas que mostraron actividad antagónica contra <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> raza1.....	30
5 Resultados de evaluación de aislados bacterianos en cultivos duales contra <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> raza1.....	31
6 Porcentajes de inhibición obtenidos en evaluación de cultivos duales de aislados bacterianos contra <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> raza 1 (FOL _{R1}) y raza 2 (FOL _{R2}).....	32
7 Identificación de aislados seleccionados por sus características asociadas a la promoción de crecimiento.....	34
8 Identificación de aislados seleccionados por cumplir los parámetros de selección para actividad antagónica.....	35
9 Resultados de pruebas realizadas con aislados seleccionados.....	36
10 Porcentajes de inhibición obtenidos en evaluación mediante ensayos duales de aislados bacterianos contra cinco hongos fitopatógenos.....	37
11 Evaluación de la longitud de raíz y longitud de tallo de plántulas de tomate inoculadas con aislados bacterianos con características de potencial de promoción de crecimiento.....	40
12 Longitud de raíz y longitud de tallo de plántulas de tomate inoculadas con aislados bacterianos con actividad antagónica.....	42
13 Evaluación de seis variables que mostraron diferencias significativas en plantas de tomate inoculadas con aislados bacterianos con características de promoción de crecimiento.....	44
14 Evaluación de tres variables que no mostraron diferencias significativas en plantas de tomate inoculadas con aislados bacterianos con características de promoción de crecimiento.....	44
15 Evaluación de cinco variables que mostraron diferencias significativas en plantas de tomate inoculadas con aislados bacterianos con actividad antagónica.....	46
16 Evaluación de cuatro variables que no mostraron diferencias significativas en plantas de tomate inoculadas con aislados bacterianos con actividad antagónica.....	46

17 Reporte de los microorganismos recuperados de las plantas del ensayo donde se evaluó la actividad antagónica de diferentes aislados bacterianos..... 47

18 Síntomas observados en plantas de tomate del ensayo donde se evaluó la actividad antagónica de diferentes aislados bacterianos..... 47

Capítulo 1. Introducción

En el estado de Baja California las condiciones climáticas predominantes son áridas, sin embargo, anualmente se establecen más de 78 cultivos, siendo el tomate la principal hortaliza que se produce (SIAP, 2018a; SIAP, 2018c). Este cultivo requiere cuidado constante debido a la susceptibilidad que presenta al daño causado por plagas y enfermedades. Se ha reportado que una de las enfermedades más destructivas que afecta a este cultivo es la marchitez vascular, la cual es causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 1, 2 ó 3 (FOL)(García-Estrada y Valenzuela, 2011).

Las Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (por sus siglas en inglés PGPR) son microorganismos benéficos que pueden asociarse con las raíces de las plantas (Berg, 2009; Richardson et al., 2009). Estas promueven el crecimiento de la planta debido a que mejoran la disponibilidad de nutrientes en el suelo y reducen el daño causado por enfermedades (Glick, 1995; Vessey, 2003). Por sus propiedades, las PGPR son una alternativa para usarse en agricultura como biofungicidas, biofertilizantes, fitoestimulantes y bioplaguicidas (Berg, 2009; Bhattacharyya y Jha, 2011). Existen varios productos comerciales a base de rizobacterias; sin embargo, el uso de productos comerciales formulados con cepas exóticas en condiciones de suelos áridos, no garantiza el obtener efectos positivos, ya que estos microorganismos muchas veces no logran sobrevivir al no poder adaptarse a condiciones climáticas, que podrían ser diferentes a las de su procedencia (Díaz et al., 2001; Botelho et al., 2006; Calvo et al., 2010; Dutta y Podile, 2010). Es por ello que una opción es emplear PGPR nativas, las cuales pueden ser más efectivas al tener una mejor adaptación (Verma et al., 2013; Zahid et al., 2015).

Con el objetivo de aislar y caracterizar bacterias de la rizósfera con actividad antagónica contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* y/o con capacidad de promover el crecimiento de plantas de tomate, en este trabajo se seleccionó como modelo de estudio el arbusto *Solanum hindsianum*. Esta planta es endémica de Baja California, crece en condiciones áridas y cálidas, y pertenece a la familia botánica Solanaceae, misma familia a la que pertenecen plantas de importancia agrícola como el chile y el tomate (Bates et al., 2009; SIAP, 2018a). Debido a la relación botánica entre esta planta nativa y el tomate, se consideró que de identificar PGPR asociadas a la planta silvestre, los aislados tendrían una mayor oportunidad de establecerse en la rizósfera de plantas de tomate, promoviendo su crecimiento y reduciendo el daño causado por fitopatógenos. Estos aislados serían una alternativa para reducir la aplicación de fertilizantes y pesticidas y con ello disminuir la contaminación al ambiente y los riesgos a la salud humana (Keikothaile y Spanoghe, 2011; Pankat et al., 2020).

Para ello se seleccionaron doce muestras de suelo de la rizósfera de *S. hindsianum*, las cuales fueron colectadas por Torres- Chávez en 2016; de ellas, se obtuvieron 343 aislados bacterianos. Para seleccionar cepas con el capacidad de promover el crecimiento de las plantas, se hicieron seis pruebas colorimétricas; se determinó la capacidad de producir ácido indol acético (AIA), sideróforos, quitinasas y ácido cianhídrico, así como la capacidad de solubilizar fósforo y potasio. Paralelamente se evaluó su actividad antagónica de manera cualitativa y cuantitativa contra *FOL* razas 1 y 2, ambos agentes causales de la marchitez vascular.

Con los resultados de ambas pruebas, se seleccionaron los aislados que tuvieron resultado positivo en al menos cuatro de las pruebas, y los que formaron halo con un porcentaje de inhibición mayor al 19 %, y mayor al 50 % para los que tuvieron inhibición invasiva y al menos un resultado positivo en las pruebas colorimétricas. En total se seleccionaron 27 cepas para identificarlas molecularmente, dieciocho por su potencial en la promoción de crecimiento y ocho por su actividad antagónica. Seis aislados pertenecientes al género *Staphylococcus* fueron descartadas debido a que este género causa infecciones en humanos (Meservey et al., 2020).

Los 20 aislados identificados molecularmente se caracterizaron analizando la producción de AIA, la capacidad de solubilizar zinc, formar biofilm, fijar nitrógeno, la actividad de la ACC-desaminasa y el efecto sobre la germinación de semillas de tomate. Además para los aislados con actividad antagónica se evaluó bajo condiciones *in vitro* su efecto en la inhibición del crecimiento de cuatro hongos fitopatógenos: *Fusarium solani*, *F. falciforme*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Macrophomina phaseolina*. Los ocho aislados bacterianos evaluados mostraron efecto inhibitorio contra los fitopatógenos evaluados.

Por último, seis cepas fueron evaluadas en plantas de tomate para determinar su efecto en la promoción del crecimiento y cinco para probar su actividad antagónica contra *FOL* raza 1 y 2. Con este ensayo se identificaron a las cepas *Pseudomonas* sp. rbES087 y *Pseudomonas* sp. rbES090 como promotoras del crecimiento de plantas de tomate y capaces de aumentar el peso fresco y seco de la planta, mientras que la cepa *Bacillus* sp. rbES262 mostró actividad de biocontrol sobre *FOL*. Estas cepas tienen el potencial de servir como PGPR en la industria agrícola de Baja California.

Este trabajo amplía el conocimiento de la diversidad de bacterias presentes en la península de Baja California y su potencial de uso como biofungicidas o biofertilizantes en el cultivo de tomate.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Aspectos generales de las Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (PGPR)

La rizósfera se define como la fracción de suelo cercana a las raíces de las plantas (Vessey, 2003; Richardson et al., 2009). En esta área, las plantas se asocian con diversos tipos de microorganismos benéficos y patógenos (Ambrosini y Passagli, 2017). Entre los microorganismos que influyen benéficamente en las plantas se encuentran las Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (PGPR por sus siglas en inglés) (Ahmad et al., 2008; Berg, 2009). Las PGPR promueven el crecimiento vegetal y protegen a las plantas contra diferentes patógenos a través de diversos mecanismos, los cuales pueden ser directos o indirectos (Glick, 1995; Jacobsen, 1997). Entre los mecanismos directos se encuentran el mejorar la disponibilidad de nutrientes en el suelo (fijación de nitrógeno y solubilización de minerales como fósforo, potasio, zinc y hierro) y la producción de fitohormonas (ácido indol-acético, giberelinas y etileno); mientras que los mecanismos indirectos implican la reducción de enfermedades a través de la antibiosis, producción de sideróforos, competencia por espacio o por nutrientes, interacciones directas con el patógeno (microparasitismo y lisis enzimática) y estimulación de mecanismos de resistencia (Vessey, 2003; Antoun y Prévost, 2006; Kaymak, 2010; Gupta et al., 2015; Zheng et al., 2018). Las PGPR no tienen un único modo de acción para ejercer antagonismo y la multiplicidad de éstos es una característica importante para su selección como agentes de control biológico (Fernández-Larrea, 2001; Gupta et al., 2015).

Debido a las propiedades que presentan, las PGPR pueden usarse en agricultura como biofertilizantes, fitoestimulantes y bioplaguicidas. Además, su aplicación permite disminuir el uso de productos químicos así como minimizar la contaminación del suelo, aire y agua (Berg, 2009; Bhattacharyya y Jha, 2011). Algunos ejemplos de géneros de bacterias que se usan en formulaciones comerciales agrícolas son: *Azobacter*, *Azosprillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Delfitia*, *Enterobacter*, *Paenobacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Streptomyces* y *Rhizobium* (Glick, 2012). Concretamente, cepas del género *Bacillus* se utilizan en formulaciones de biofungicidas comerciales para el control de enfermedades en plantas como: Serenade® OPTI (*B. subtilis* cep QST713), Double Nickel® LC (*Bacillus* s. var. *amyloliquefaciens* cepa D747), Bacillioss (*B. subtilis*), Fungifree AB® (*B. subtilis* 83), entre otros.

Cabe destacar que el inocular los cultivos con PGPR no garantiza el obtener los efectos deseados en la promoción del crecimiento y la disminución de la incidencia de enfermedades en plantas, ya que en ocasiones, estos microorganismos no logran sobrevivir por no poder adaptarse a las condiciones físicas,

químicas y biológicas del suelo, las cuales suelen ser muy diferentes a las de su procedencia (Díaz-Vargas et al., 2001; Botelho y Mendonça-Hagler, 2006; Dutta y Podile, 2010). Es por esto que, para ser usadas en agricultura las PGPR deben poseer una alta competitividad y capacidad de mantenerse en la rizósfera, mejorar las capacidades de crecimiento de las plantas, poseer un amplio espectro de acción contra patógenos, ser seguras para el medio ambiente, ser compatibles con otras rizobacterias y ser tolerantes al calor y la radiación UV (Nakkeeran et al., 2005; Galaviz-Bustamante, 2015).

1.1.2 Asociación entre plantas de ambientes áridos y PGPR

Todos los organismos que crecen en condiciones ambientales adversas adoptan estrategias de supervivencia para evitar el daño causado por el estrés abiótico (Soussi et al., 2015). Específicamente, la asociación de plantas con PGPR favorece la disponibilidad de agua y nutrientes, mientras el sistema de raíces suministra a los microorganismos compuestos de carbono a través de los exudados sintetizados (Phillips, 2004; Richardson et al., 2009, Soussi et al., 2015). Particularmente las comunidades microbianas del suelo tienden a estar determinadas por los exudados producidos por las raíces de las plantas, así como por la composición y nutrientes presentes en el suelo (Wieland et al., 2001; Hartmann et al., 2009; Mapelli et al., 2013; Zhang et al., 2014). Por ello es que hay una amplia distribución de géneros de bacterias, lo cual refleja la adaptación a diferentes condiciones ambientales (Marasco et al., 2013).

1.1.3 Producción agrícola en Baja California

El estado de Baja California tiene una extensión territorial de 71,445.9 Km², presenta cuatro diferentes tipos de clima (templado, árido, muy árido y semi frío) con una temperatura media anual de entre 28.5 °C hasta 14.8 °C y lluvias muy escasas, con alrededor de 131.8 mm de precipitación total anual (INEGI, 2017; SIAP, 2018b; SIAP, 2018c). Cuenta con una superficie usada para la agricultura de 243,210.0 hectáreas (SIAP, 2018b) y tiene una alta producción agrícola, ya que por año se llegan a establecer hasta 78 cultivos entre los que se encuentran: algodón, apio, ejote, zanahoria, cebolla, cártamo, fresa, frambuesa, lechuga, olivo, tomate rojo, vid, entre otros. De todos estos, la principal hortaliza que se produce es el tomate rojo (SIAP, 2018a).

1.1.4 Producción de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas más producidas y uno de los vegetales más consumidos en el mundo (Grandillo, 1999). En 2017 la superficie mundial cosechada fue de 4.8 millones de hectáreas, con una producción de 182 millones de toneladas; China figuró como principal productor con 59.5 millones de toneladas, seguido por India (20.7 millones de ton), Turquía (12.7 millones de ton), Estados Unidos (10.9 millones de ton) y Egipto (7.2 millones de tons). México ocupa la novena posición con una producción de 4.2 millones de toneladas (FAOSTAT, 2017).

Específicamente, de la producción de tomate en México el 59 % se concentra en seis estados, Sinaloa (24.37 %), San Luis Potosí (10.93 %), Michoacán (6.90 %), Zacatecas (6.26 %), Jalisco (5.86 %) y Baja California (4.75 %) (SIAP, 2017). El cultivo de tomate es muy vulnerable, requiere cuidado constante por el ataque de plagas y enfermedades; debido a esto, por ciclo del cultivo pueden aplicarse hasta 35 agroquímicos, siendo fungicidas, insecticidas y fertilizantes foliares los más usados (Montiel-Arroyo et al., 2016).

1.1.5 Marchitez vascular en el cultivo de tomate causada por *Fusarium oxysporum*

El cultivo de tomate es afectado por patógenos como hongos, bacterias, nematodos o virus causantes de enfermedades radicales, foliares y en fruto. Particularmente, la marchitez vascular del tomate es una de las enfermedades más destructivas de los cultivos intensivos, esta enfermedad es causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) (García-Estrada y Valenzuela, 2011). FOL ingresa a la epidermis de la raíz, para después propagarse a través del tejido vascular y colonizar el xilema de la planta, lo que resulta en la obstrucción de este tejido y en estrés hídrico (Singh et al., 2017a; Srinivas et al., 2010). Los síntomas observados en plantas son: reducción del crecimiento, marchitez, amarillamiento de las hojas y tallos jóvenes, defoliación, necrosis marginal de la hoja y necrosis vascular en forma de anillo, que se extiende hacia arriba de acuerdo con la severidad de la enfermedad (Ramírez-Villapudua y Sáinz-Rodríguez, 2006; Nuñez, 2012; Blancard, 2018).

Se han identificado tres razas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*; la raza 1, la más distribuida, es común en muchas regiones del mundo donde se cultiva tomate, y las razas 2 y 3 que se encuentran distribuidas en áreas dispersas en el mundo (Nuñez, 2012). En México se ha reportado la presencia de las razas 1 y 3 en

el estado de Baja California, mientras que en los estados de Sinaloa, San Luis Potosí, Morelos y Baja California Sur están presentes la razas 2 y 3 (Carrillo-Fasio, 2003; Sánchez-Peña et al., 2010; Ortega-García, 2010; Armenta-López, 2013; Fernández-Herrera et al., 2013).

1.1.6 *Solanum hindsianum* Benth

El arbusto *Solanum hindsianum* es una planta perenne, comúnmente conocido como Mariola, es nativo de Baja California, se encuentra ampliamente distribuido a lo largo del estado incluyendo algunas islas del Golfo. Además, puede encontrarse en los estados de Baja California Sur y Sonora (Bates et al., 2009; Ryley et al., 2015). Esta planta crece y florece cuando las condiciones climáticas son cálidas, presenta tolerancia a la sequía y sensibilidad al frío, debido a lo cual entra en estado de dormancia durante la estación fría (Felger, 2000; Rebman y Roberts, 2012). Puede alcanzar hasta 3 m de altura, presenta hojas ovadas y flores de color púrpura o lavanda en forma de estrella. El fruto tiene color verde cuando se encuentra en estado inmaduro y después adquiere un color más oscuro que va del verde intenso a rojo (Bates et al., 2009; Rebman y Roberts, 2012). En trabajos recientes se ha reportado que este arbusto pueden asociarse con hongos micorrízicos de los géneros *Glomus*, *Acaulospora* y *Scutellospora* (Torres-Chavéz, 2018).

1.1.7 Antecedentes de aislamiento de PGPR de zonas áridas y de plantas nativas

En trabajos previos se ha reportado el aislamiento de PGPR asociadas a plantas distribuidas en zonas áridas. Entre ellos se encuentra el realizado por Rueda-Puente et al., (2010) quienes determinaron la presencia de especies de *Rhizobium* spp. y *Bacillus* spp. asociadas a la rizósfera de la planta *Salicornia bigelovii*, esta planta crece en suelos con alta salinidad y se encuentra ampliamente distribuida en el estado de Baja California.

En otro trabajo Aguirre-Garrido et al., (2012) evaluaron la diversidad de las comunidades de bacterias en la rizósfera de tres especies de cactus distribuidos en zonas semiáridas en tierras altas en el centro de México: *Mammillaria carnea*, *Opuntia pilifera* y *Stenocereus stellatus*, encontrando que las bacterias pertenecientes a los Fila Actinobacteria, Proteobacteria y Acidobacteria son los más representativos. Además, en las tres especies se identificó a la bacteria *Ochrobactrum thiophenivorans* (alfa

proteobacteria), y otras especies pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Leifsonia*, *Micrococcus*, *Burkholderia* entre otros.

Posteriormente de la rizósfera de plantas nativas de maca (Zúñiga-Dávila et al., 2011) y aguaymanto (Ogata-Gutiérrez et al., 2017), plantas nativas de Perú, se aislaron bacterias promotoras de crecimiento vegetal y con capacidad antagónica sobre diferentes patógenos. Además, se identificaron cepas con la capacidad de solubilizar fósforo y de producir ácido indol acético; asimismo todos los aislados mostraron un porcentaje de inhibición mayor al 20% sobre los hongos patógenos *Alternaria alternata*, *Fusarium solani* y *Cochliobolus lunatus*. Específicamente de la rizósfera de maca fueron aisladas 355 cepas de bacterias (108 diazótrofos de vida libre, 29 *Actinomicetos*, 109 *Pseudomonas* y 109 *Bacillus*) de las cuales se evaluó la producción de ácido indol acético y solubilización de fosfato.

1.2 Justificación

Las PGPR son una alternativa para usarse en agricultura, ya que pueden actuar como biofertilizantes, fortalecedores de planta, fitoestimulantes y bioplaguicidas, además disminuyen el uso intensivo de agroquímicos y con ello la contaminación de los recursos naturales y los riesgos a la salud humana. Para lograr que estos microorganismos tengan efecto de control sobre patógenos y promuevan el crecimiento en las plantas, es importante que estén adaptados a las condiciones climáticas del lugar. El aislar PGPR de la rizósfera de *Solanum hindsianum*, planta perteneciente a la misma familia que el tomate y endémica del estado de Baja California, nos permitirá encontrar microorganismos adaptados a las condiciones climáticas del estado que puedan emplearse en el cultivo de tomate, logrando reducir el uso de fungicidas y fertilizantes.

1.3 Hipótesis

Las bacterias aisladas de la rizósfera del arbusto *Solanum hindsianum* pueden actuar como PGPR en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*).

1.4 Objetivo

1.4.1 Objetivo general

Aislar y caracterizar bacterias de la rizósfera del arbusto *Solanum hindsianum* que tengan actividad antagónica contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* y/o capacidad de promover el crecimiento de plantas de tomate

1.4.2 Objetivos específicos

1. Aislar, caracterizar y evaluar bacterias de la rizósfera de *Solanum hindsianum* que promuevan el crecimiento de plantas de tomate.
2. Aislar, caracterizar y evaluar bacterias de la rizósfera de *Solanum hindsianum* con actividad antagónica hacia el patógeno de tomate *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Visión general del trabajo

A partir de doce muestras de suelo se realizó el aislamiento de bacterias utilizando siete medios de cultivo. Las cepas aisladas fueron sometidas a seis pruebas colorimétricas para determinar la producción de ácido indol acético (AIA), sideróforos, quitinasas, ácido cianhídrico, así como la capacidad de solubilizar fósforo y potasio. Paralelamente se evaluó la actividad antagónica de forma cualitativa y cuantitativa sobre *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL) raza 1 y 2. Los aislados que presentaron al menos cuatro resultados positivos en las pruebas colorimétricas o inhibición con formación de halo de inhibición mayor al 19 % y aquellas con inhibición invasiva con porcentajes mayores al 50 % y al menos 1 resultado positivo en las pruebas colorimétricas fueron identificados molecularmente y sometidas a una segunda ronda de caracterización para determinar la cantidad de AIA que producían, su capacidad para solubilizar zinc, fijar nitrógeno, formar biofilm, actividad de la ACC-desaminasa y su efecto sobre la germinación en semillas de tomate. Para las cepas que mostraron inhibición contra FOL se probó su actividad inhibitoria contra los hongos fitopatógenos *Fusarium solani*, *F. falciforme*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Macrophomina phaseolina*.

A partir de los resultados de esta segunda ronda se seleccionaron aislados para llevar a cabo ensayos *in vivo* en plantas de tomate de la variedad Bonny Best para evaluar su actividad en la promoción del crecimiento y la actividad antagónica sobre FOL raza 1 y 2. En la Figura 1 se presenta un diagrama de los pasos seguidos en este trabajo.

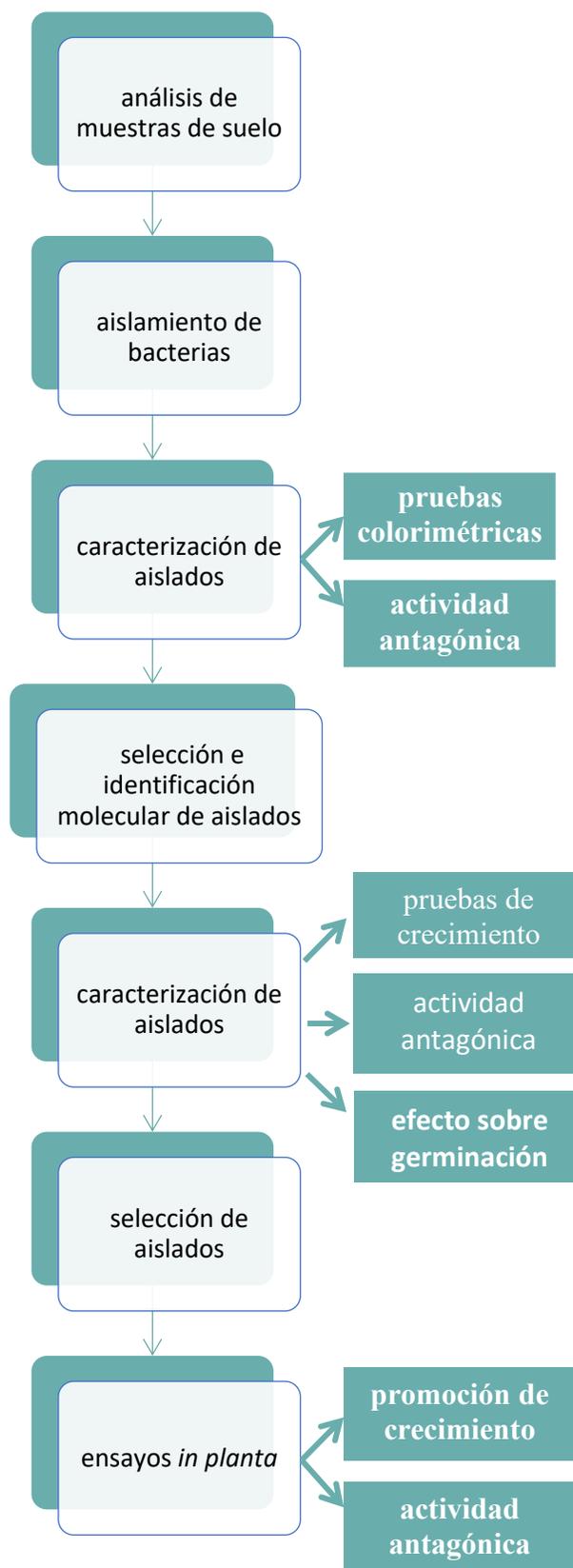


Figura 1. Diagrama de actividades realizadas en la metodología.

2.2 Aislamiento de bacterias de muestras de suelo de rizósfera

Se analizaron doce muestras de suelo colectado de la rizósfera de *S. hindsianum* (Tabla 1), estas muestras se obtuvieron en septiembre de 2016 (Torres-Chávez, 2018) y hasta el momento del aislamiento de las bacterias en mayo de 2018, se mantuvieron almacenadas en bolsas herméticas a temperatura ambiente.

De cada una de las muestras se hicieron dos preparaciones en microtubos de 1.5 mL diluyendo 200.0 mg de suelo en 500.0 μ L de agua destilada estéril. Para aislar cepas de bacterias esporulantes, una de las preparaciones fue expuesta a un tratamiento con calor a una temperatura de 80 °C por 15 minutos. De cada muestra se obtuvieron 4 diluciones seriadas 1:10. Posteriormente de las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} se estriaron 100.0 μ L en placas de Petri conteniendo seis diferentes medios de cultivo: ISP4, medio de avena, YPD, medio Luria-Bertani, medio B de King y medio de Manitol-Soya (Anexo 1). Todos los medios fueron suplementados con cicloheximida (1.0 μ g/mL) para evitar el crecimiento fúngico; mientras que, a los medios de cultivo de avena, soya manitol e ISP4 se les adicionó ácido nalidíxico (1.0 μ g/mL) para inhibir el crecimiento de bacterias Gram negativas.

Las cajas de Petri fueron incubadas en oscuridad y colocadas en posición invertida a 30 °C. El tiempo de incubación fue de dos a diez días, revisando diariamente el crecimiento. Conforme surgieron colonias aisladas en las placas, éstas se recuperaron en una nueva placa del mismo medio del cual fueron aisladas, y se incubaron durante 48 horas a 30 °C. A partir del nuevo crecimiento de la colonia se hizo una inoculación en medio líquido TY, el cual se incubó en agitación constante durante 48 horas a 30 °C y 110 rpm. Para el resguardo de las cepas, se mezclaron 500.0 μ L del cultivo con 500.0 μ L de glicerol estéril al 70 % en tubos criogénicos que fueron almacenados a -20 °C.

Aquellas colonias cuyas características sugerían que pertenecen a la clase Actinobacteria, se maceraron con ayuda de un pistilo y se estriaron en una placa con el mismo medio del que se obtuvo la colonia. Las placas se mantuvieron incubadas durante siete días a 30 °C y posteriormente se colectaron las esporas. Para ello, se colocaron 3.0 mL de agua destilada estéril en la superficie de cada placa, y enseguida se frotó sobre la superficie del medio con una almohadilla de algodón de tal manera que las esporas se acumularon en la base de la almohadilla. Posteriormente con ayuda de una micropipeta se obtuvo todo el líquido absorbido por la almohadilla de algodón. La suspensión de esporas obtenida se colocó en tubos criogénicos y fue centrifugada a 5000 rpm durante 5 minutos. De cada tubo se conservaron 500.0 μ L del sobrenadante donde se resuspendieron las esporas (Kieser et al., 2000). Finalmente se adicionaron 500.0 μ L de glicerol estéril al 70 % para una concentración final de glicerol de 35 % y se almacenaron a -20 °C.

Tabla 1. Identificación de los sitios de colecta de las muestras usadas en este trabajo.

Lugar de muestreo	Ubicación geográfica	Código de identificación
Arroyo el Rosario	29°43'26.76"N, 114°43'6.35"W	M1
Laguna escondida	29°20'49.09"N, 114°25'10.06"W	M2
Llano de San Julián	29° 0'48.35"N, 113°51'50.15"W	M3
San Andrés	28°44'21.59"N, 114° 6'38.12"W	M4
Miramar	28° 8'55.00"N, 113°36'24.62"W	M5
Costareña (San Felipe)	30°37'26.62"N, 114°43'23.45"W	M6
Valle de Santa Ana	29° 3'33.12"N, 114° 9'16.81"W	M7
Lavas (San Lino)	27°20'11.47"N, 112°57'37.69"W	M8
Santa Agueda (suelo de adobe arrollo San Luis)	27°15'16.31"N, 112°19'12.29"W	M9
Vizcaíno	27°40'34.68"N, 113°24'6.41"W	M10
Salorio	28°57'55.26"N, 113°41'21.12"W	M11
Cocos	29°30'55.80"N, 114°17'47.29"W	M12

2.3 Evaluación *in vitro* de las características de promoción de crecimiento vegetal de las bacterias aisladas

El potencial de las cepas de promover el crecimiento vegetal se analizó indirectamente sometiendo a las bacterias aisladas a seis pruebas colorimétricas para evaluar cualitativamente la producción de ácido indol acético, quitinasas, sideróforos, ácido cianhídrico (HCN) y la solubilización de fósforo y potasio.

2.3.1 Preparación de inóculos

A partir de los resguardos en glicerol, todas las cepas fueron inoculadas en medio líquido TY, en placas de 96 pocillos de fondo cónico. En cada pozo se colocaron 1.5 mL de medio y 3.0 µL de inóculo bacteriano. Los cultivos se mantuvieron en agitación constante durante 48 horas a 30 °C y 100 rpm. Cada prueba colorimétrica se implementó en microplacas de 96 cavidades. Para las pruebas en las que el medio fue sólido se colocaron 300.0 µL de medio por cavidad y cuando el medio de la prueba fue líquido se agregaron 200.0 µL. La inoculación de las bacterias se realizó utilizando una réplica metálica de 48 puntas.

2.3.2 Producción de ácido indol acético

Todas las bacterias se inocularon en medio líquido TY suplementado con 500.0 µg/mL de triptófano (Ahmad et al., 2008), el cultivo se mantuvo en agitación constante durante 48 horas a una temperatura de 30 °C y 110 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación se adicionaron 100.0 µL por pozo del reactivo Salkovsky (1.0 mL FeCl₃ (0.5M), 30.0 mL H₂SO₄ en 30.0 mL de agua destilada) (Gordon y Weber, 1951). El cambio de coloración en el medio a rosa indicó la producción de ácido indol acético en la muestra.

2.3.3 Producción de quitinasas

Inicialmente se preparó la quitina coloidal, para ello 10.0 g de hojuelas de quitina se agregaron a 120.0 mL de HCl concentrado, esta suspensión se mantuvo en agitación constante durante 12 horas a 4 °C. Transcurrido este tiempo la suspensión se filtró, la quitina recuperada fue suspendida en 2.0 L de etanol al 95 % y se mantuvo en agitación constante a 4 °C por 12 horas. Posteriormente, la suspensión se centrifugó a 6000 rpm durante 20 minutos. En seguida el sobrenadante fue descartado y el sedimento obtenido se lavó usando agua destilada y nuevamente centrifugando a 6000 rpm durante 20 minutos. El proceso de lavado se llevó a cabo en cuatro ocasiones. Una vez eliminado el olor a etanol, la quitina se colocó en tubos falcon de 50.0 mL y se mantuvo en un desecador hasta que se evaporó el agua, después se almacenó a -20 °C hasta el momento en que el medio fue preparado (Roberts y Selitrennikoff, 1988; Serrano-Gómez, 2014).

Para la evaluación de la producción de quitinasas, el medio que se utilizó fue el propuesto por Agrawal y Koyasthane (2012), el cual requiere para su preparación por cada litro, 4.5 g de quitina coloidal, 0.3 g de sulfato de magnesio (MgSO₄ · 7H₂O), 3.0 g de sulfato de amonio (NH₄(SO₄)), 2.0 g de fosfato monobásico (KH₂PO₄), 1.0 g de ácido cítrico, 15.0 g de agar Difco, 0.15 g de púrpura de bromocresol y 0.2 g de Tween-80. Antes de aforar el medio de cultivo con agua destilada estéril a 1.0 L se ajustó el pH a 4.7. Enseguida se esterilizó a 15 lb de presión y 120 °C durante 15 minutos. Después de inocular las bacterias, las placas se incubaron durante 48 horas a 30 °C. Las cepas que cambiaron la coloración del medio de amarillo a violeta se consideraron positivas para la actividad de producción de quitinasas.

2.3.4 Producción de sideróforos

Para la determinación de la producción de sideróforos se utilizó el medio CAS-Agar (Schwyn y Neilands, 1987). La preparación del medio se realizó a partir de dos soluciones A y B. La solución A se preparó con 60.5 mg de Cromo Azurol S (CAS), 1.0 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ en 10.0 mL de 10.0 mM HCl, 72.9 mg de HDTMA (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio). El CAS se disolvió en 50.0 mL de agua destilada, posteriormente se agregaron los 10.0 mL de la solución férrica, en seguida se adicionó el HDTMA y finalmente se ajustó la solución con agua destilada a un volumen de 100.0 mL. La solución B fue el medio MM9 (1 % de glucosa, 0.5 g de NaCl, 0.3 g de KH_2PO_4 , 0.1 NH_4Cl , 5.0 g de Soytona, 30.0 g de MES; una vez ajustado el pH ajustado a 6.8, aforar a 1.0 L y agregar 15.0 g de agar).

Las soluciones se esterilizaron por separado a 15 lb de presión y 120 °C durante 15 minutos. Posteriormente se dejaron enfriar hasta que alcanzaron una temperatura igual o menor a 50 °C, enseguida se mezclaron 10.0 mL de la solución A (solución CAS) por cada 100.0 mL de la solución B para el volumen total de medio CAS-agar. Una vez que se realizó la inoculación de las bacterias en el medio, las placas fueron incubadas durante 96 horas a 30 °C. El cambio de coloración en el medio de cultivo de azul a amarillo indicó resultado positivo en la producción de sideróforos.

2.3.5 Producción de ácido cianhídrico (HCN)

En esta prueba se utilizó el medio sólido TY, el cual se preparó empleando 6.0 g de triptona, 3.0 g de extracto de levadura, 0.38 g de cloruro de calcio y 15.0 g de agar; los reactivos se disolvieron en 1L de agua y el medio se esterilizó a 15 lb de presión y 120 °C por 15 minutos. Después de inocular las bacterias, la placa se cubrió con papel filtro humedecido con una solución de 0.5 % de carbonato de sodio en 0.5 % de ácido pícrico (Lorck, 1948; Ahmad et al., 2008). Posteriormente las placas se sellaron con parafilm y se incubaron durante 48 horas a 30 °C. El cambio del papel filtro a color naranja o rojo indicó un resultado positivo.

2.3.6 Solubilización de fósforo

Para determinar la actividad de solubilización de fósforo se empleó el medio Pikovskaya suplementado con púrpura de bromocresol (Pikovskaya, 1948, Corrales-Ramírez et al., 2014). En la preparación del medio de cultivo se emplearon: 5.0 g de extracto de levadura, 10.0 g de glucosa, 5.0 g de fosfato de calcio tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), 0.5 g de sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$), 0.2 g de cloruro de potasio (KCl), 0.1 g de sulfato de magnesio (MgSO_4), 0.0001 g de sulfato de manganeso (MnSO_4), 0.0001 g de sulfato de hierro (FeSO_4), 0.01 g de púrpura de bromocresol. Estos reactivos fueron disueltos en 500 mL de agua destilada, una vez ajustado el pH de la solución a 7.2, se agregaron 15.0 g de agar, en seguida el medio se aforó a 1.0 L y se esterilizó a 15 lb de presión y 120 °C durante 15 minutos.

Una vez inoculadas las bacterias, las placas se incubaron en oscuridad durante 72 horas a 30 °C. El cambio de coloración del medio de cultivo de morado a amarillo indicó resultado positivo para la solubilización de fósforo.

2.3.7 Solubilización de potasio

Para evaluar la capacidad de solubilización de potasio de las bacterias se empleó el medio Pikovskaya modificado (Modificado de Velázquez-Gurrola y Ramos-Alegría, 2015). El medio se preparó con: 5.0 g de extracto de levadura, 10.0 g de glucosa, 5.0 g de nitrato de potasio (KNO_3), 0.5 g de sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$), 0.2 g de cloruro de potasio (KCl), 0.1 g de sulfato de magnesio (MgSO_4), 0.0001 g de sulfato de manganeso (MnSO_4), 0.0001 g de sulfato de hierro (FeSO_4), 0.002 g de verde de bromocresol. Estos reactivos se disolvieron en 500.0 mL de agua destilada, una vez ajustado el pH de la solución a 7.2, el medio se aforó a 1.0 L con agua destilada, se agregaron 15.0 g de agar y se esterilizó a 15 lb de presión y 120 °C durante 15 minutos.

Después de realizar la inoculación de las bacterias las placas se incubaron durante 72 horas a 30 °C. El cambio de coloración en el medio de azul a amarillo indicó resultado positivo para la solubilización de potasio.

2.4 Evaluación *in vitro* de la actividad antagonica de las bacterias aisladas

Este ensayo se realizó en placas de Petri con medio sólido PDA casero (Anexo 1). En su mayoría todas las cepas aisladas fueron inoculadas a partir de cultivos en glicerol, en medio líquido TY. Los cultivos fueron incubados en agitación constante durante 48 horas a 30 °C y 110 rpm; mientras que para las Actinobacterias el inóculo se obtuvo a partir del cultivo de esporas en medio sólido. Para la obtención del inóculo de *F. oxysporum* f.s. *lycopersici* (FOL) raza 1, se colocó un disco de micelio de 5.0 mm de diámetro en medio sólido PDA casero, y se incubó durante siete días a 25°C.

Por cada placa se evaluaron cuatro cepas de bacterias diferentes, las cuales se localizaron en los extremos opuestos de la placa. En el centro de la placa se colocó un disco de micelio de 5.0 mm del hongo FOL, una vez que el cultivo alcanzó 1.0 cm de crecimiento se colocaron 5.0 µL del cultivo líquido de cada aislado. Como control se inoculó el hongo en una placa sin bacterias. Se realizó sólo una repetición para cada bacteria. Las placas se incubaron durante cinco días a 25 °C. La formación de un halo de inhibición o la reducción del crecimiento del hongo por invasión del crecimiento bacteriano indicó un resultado positivo de la capacidad antagonica.

Las bacterias con estas características fueron seleccionadas para realizar un ensayo cuantitativo de inhibición contra *F. oxysporum* f.s. *lycopersici* raza 1, en el cual las bacterias se evaluaron de forma individual en ensayos duales con tres repeticiones por aislado; el medio utilizado fue PDA casero. Inicialmente en las placas se colocó un disco de micelio de 5.0 mm del hongo en un extremo de la placa y se dejó incubar a 25 °C hasta que alcanzó 1.0 cm de diámetro de crecimiento, posteriormente se colocaron 5.0 µL del cultivo de la bacteria en el extremo opuesto del hongo a una distancia de 6.0 cm. Las placas se incubaron durante ocho días, después se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio usando la fórmula reportada por Jeyaseelan et al., (2012):

$$\left(\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{R-r}{r} * 100\right) \quad (1)$$

donde R es el radio del crecimiento del hongo del control, y r corresponde al radio del crecimiento del hongo en presencia de la bacteria.

2.4.1 Cuantificación de la actividad antagónica contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 1 y 2

Para evaluar la actividad antagónica contra *F. oxysporum* f.s. *lycopersici* (*FOL*) raza 1 y raza 2 se seleccionaron los aislados con actividad antagónica contra *FOL* raza 1, de acuerdo a sus porcentajes de inhibición. Para aquellas bacterias con inhibición invasiva se eligieron las que obtuvieron porcentajes de inhibición mayores a 50 %, mientras que para las bacterias con la capacidad de formar halos de inhibición fueron seleccionadas las que mostraron al menos un 19 % de inhibición.

La evaluación se llevó a cabo en ensayos duales, similares a los realizados en la evaluación contra *FOL* raza 1. Ambas razas de *FOL* fueron obtenidas de la colección de aislados de Armenta-López (2013) resguardadas en el laboratorio de fitopatología del CICESE. El inóculo bacteriano se ajustó a una concentración de 1×10^6 UFC, a partir de un cultivo en medio líquido TY que inició a una densidad óptica de 0.05 (620 nm) y que fue incubado durante 48 horas a 30 °C y 110 rpm. Para las Actinobacterias se colectaron esporas de un cultivo de 7 días, mientras que el inóculo de ambas cepas del hongo se tomó de un cultivo en PDA incubado durante 5 días a 25 °C.

Los ensayos duales se llevaron a cabo evaluando las cepas de bacterias seleccionadas contra cada una de las razas de *FOL*, en placas de Petri con medio PDA casero. Inicialmente en las placas se colocó el disco de micelio de 5.0 mm de *FOL* en un extremo de la placa y se incubó a 25 °C hasta que alcanzó 1 cm de diámetro de crecimiento, posteriormente se inocularon 5.0 µL del cultivo de la bacteria en el extremo opuesto del hongo a una distancia de 6.0 cm. Las placas fueron incubadas durante un periodo de ocho días para la raza 1 y diez días para la raza 2, posteriormente se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio usando la fórmula reportada por Jeyaseelan et al., (2012) mostrada en la sección anterior.

2.5 Selección de aislados bacterianos

La selección de bacterias por su potencial de promoción del crecimiento se hizo considerando los aislados que mostraron resultado positivo en cuatro o más de las pruebas colorimétricas realizadas. Para bacterias con actividad antagónica, se eligieron aquellas que tuvieron un porcentaje de inhibición contra *FOL* raza 1 y 2 mayor al 20 % para las que forman un halo de inhibición y superior al 50 % para aquellas que

presentaron inhibición invasiva, así como al menos un resultado positivo en las pruebas colorimétricas evaluadas. Solamente las bacterias que cumplieron con los parámetros de selección establecidos fueron identificadas molecularmente.

2.6 Identificación molecular de aislados bacterianos

La identificación de las cepas se realizó a través de la secuenciación de los genes del 16S rRNA. Se purificó DNA genómico de cada una de las cepas seleccionada usando el kit Genra Puregen (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante, y se amplificó el gen 16S rRNA por PCR usando los primers 27F (5'-AGAGTTTGA TCMTGGCTCAG-3') (Lane, 1991) y 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Turner et al., 1999).

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25.0 µL, conteniendo 1.0 µL de DNA genómico (~10.0 ng), 2.5 µL de Taq Buffer 10 X, 0.5 µL de una mezcla de dNTPs (10.0 mM), 0.5 µL del Primer 27F (10.0 µM), 0.5 µL del Primer 1492R (10.0 µM), 0.2 µL de Taq DNA polimerasa (1.25 U/µL), (Thermo Fisher) y 19.8 µL de agua destilada. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Bio-Rad T-100, bajo las siguientes condiciones: un paso de desnaturalización inicial de 95 °C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 48 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto y un ciclo final 72 °C por 10 minutos.

Los productos de PCR se verificaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 %. Los que mostraron el tamaño de alrededor de 1500 pares de bases y la calidad esperada (sin la presencia de productos inespecíficos) fueron purificados usando el Kit Wizard SV Gel and PCR Cleaning Up System (Promega, USA) siguiendo la metodología indicada por el fabricante. Los productos purificados se secuenciaron por el método de Sanger (Sanger et al., 1965) (Eton Biocience, Inc). Las secuencias obtenidas fueron comparadas usando Blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) con la base de datos de nucleótidos de GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

2.7 Caracterización de aislados seleccionados

Todos los aislados seleccionados, tanto por sus características de promoción de crecimiento (doce aislados) y actividad antagónica (ocho aislados), fueron evaluados para cuantificar la producción de ácido indol acético, determinar la capacidad de formar biofilm, fijar nitrógeno, solubilizar zinc y la actividad de la ACC-desaminasa. Además, aquellos seleccionados por su actividad antagónica fueron evaluados contra otros hongos fitopatógenos.

2.7.1 Preparación de inóculo

De cada aislado evaluado, el inóculo utilizado para cuantificar la producción de ácido indol acético y producción de biofilm se obtuvo inoculando las cepas en medio líquido TY, éstas se incubaron por dos días en agitación constante a 30 °C y 110 rpm. A partir de este cultivo primario se preparó un nuevo cultivo a una densidad óptica inicial de 0.05 (620 nm), el cual se dejó 48 horas en agitación a 30 °C y 110 rpm.

Para las pruebas de fijación de nitrógeno, solubilización de zinc y actividad de la ACC-desaminasa el cultivo se obtuvo de la misma forma, adicionalmente cada inóculo fue centrifugado a 5000 rpm durante 5 minutos, descartando el sobrenadante y realizando dos lavados usando una solución Tris al 10.0 mM, posteriormente las células fueron suspendidas en 1.0 mL de esta solución. En todas las pruebas el inóculo de los aislados pertenecientes al grupo de las Actinobacterias se obtuvo de esporas en glicerol las cuales se colectaron de un cultivo en medio sólido con diez días de crecimiento.

2.7.2 Cuantificación de la producción de ácido indol acético

Cada cepa se inoculó por triplicado a una concentración de 1×10^6 UFC en medio líquido TY suplementado con 500.0 µg/mL de triptófano (Ahmad et al., 2008). Este cultivo se mantuvo en agitación constante durante 48 horas a una temperatura de 30 °C y 110 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación, el cultivo fue centrifugado a 10,000 rpm durante 3 minutos y del sobrenadante se colocaron 200.0 µL en microplacas de 96 cavidades, posteriormente en cada cavidad se adicionaron 100.0 µL del reactivo Salkovsky (Gordon y Weber, 1951). Para el desarrollo de la curva de calibración las concentraciones de AIA empleadas fueron

ajustadas a 100.0, 50.0, 20.0, 10.0 y 5.0 mg/mL, la densidad óptica fue medida a 540 nm usando un lector de placas Multiskan Sky de ThermoFisher y el software Thermo Scientific SkanIt PC.

2.7.3 Formación de biofilm

Este ensayo se realizó en microplacas de poliestireno de 96 cavidades, a cada cavidad se le añadieron 300.0 μ L de cultivo bacteriano, en medio TY, a una concentración de 1×10^6 UFC, y cada aislado se inoculó por triplicado. Las placas se incubaron a 30 °C y 50 rpm durante 48 horas. Cumplido el tiempo de incubación se adicionaron 75.0 μ L de cristal violeta al 10 %, dejando reposar por 15 minutos, posteriormente se realizaron tres lavados con agua destilada. La formación de un anillo teñido de violeta indicó la formación de biofilm (O'Toole et al., 1999; Hamon y Lazazzera, 2012).

2.7.4 Fijación de nitrógeno

Para determinar la fijación de nitrógeno de las bacterias se empleó el medio propuesto por Baldani et al., (2014), éste se preparó a partir de dos soluciones A y B. La solución A compuesta por 5.0 g de ácido málico, 0.5 g de fosfato dipotásico (K_2HPO_4), 0.5 g de sulfato de hierro ($FeSO_4$), 0.010 g de sulfato de manganeso ($MnSO_4$), 0.2 g de sulfato de magnesio ($MgSO_4$), 0.1 g de cloruro de sodio ($NaCl$), 0.002 g de molibdato de sodio (Na_2MoO_4), 0.02 g de cloruro de calcio ($CaCl_2$), 0.002 g de azul de bromotimol y 1.75 g de agar; estos reactivos fueron disueltos en 950.0 mL de agua destilada. La solución B se preparó adicionando 4.0 g de hidróxido de potasio (KOH) en 50.0 mL de agua destilada. Ambas soluciones se esterilizaron por separado a 15 lb de presión y 120 °C durante 15 minutos. Posteriormente se dejaron enfriar hasta que alcanzaron una temperatura entre los 45 °C y 50 °C y enseguida se mezclaron. Como control positivo para esta prueba se empleó el mismo medio suplementado con cloruro de amonio (2.5 g/L) como fuente de nitrógeno.

El medio de cultivo se colocó en placas de Petri de 10 cm y cada aislado se inoculó por triplicado adicionando 10.0 μ L del cultivo, las placas permanecieron incubadas durante ocho días a 30 °C, el resultado positivo se observó por un cambio en la coloración del medio de amarillo a verde.

2.7.5 Solubilización de zinc

En esta prueba se utilizó el medio Pikovskaya suplementado con óxido de zinc (ZnO). El medio se preparó a partir de 10.0 g de glucosa, 5.0 g de extracto de levadura, 0.5 g de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, 0.02 g de cloruro de potasio (KCl), 0.1 g de sulfato de magnesio heptahidratado $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$, 0.0001 g de sulfato de manganeso (MnSO_4) , 0.0001 g de sulfato de hierro (FeSO_4) , 12.0 g de óxido de zinc (ZnO) y 0.25 g de azul de bromotimol (0.025 %). Antes de aforar a un litro se ajustó a pH 7.0, posteriormente el medio fue esterilizado a 120 °C y 15 Lb de presión por 15 minutos (Tagele et al., 2019; Komal y Kalavati, 2018).

Se colocaron 200.0 μL del medio en cada pozo de una microplaca de 96 cavidades, cada aislado se inoculó por triplicado adicionando 2.0 μL de inóculo por cavidad. Las microplacas fueron incubadas a 30 °C durante 48 horas, el cambio en la coloración del medio de azul a amarillo indicó resultado positivo (Komal y Kalavati, 2018).

2.7.6 Actividad de ACC (1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico) desaminasa

Para esta prueba se utilizó el medio mínimo DF (Dworkin y Foster, 1958) el cual requiere para su preparación 4.0 g de KH_2PO_4 , 6.0 g de Na_2HPO_4 , 0.2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.0 g de glucosa, 2.0 g de ácido glucónico, 2.0 g de ácido cítrico, 1.0 mL de solución de elementos traza (1.0 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10.0 mg H_3BO_3 , 11.19 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 124.6 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 78.22 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 10.0 mg MoO_3). Antes de aforar el medio de cultivo a 1.0 L se ajustó el pH a 7.2 y enseguida se esterilizó a 15 Lb de presión y 120 °C durante 15 minutos. Una vez estéril, el medio se dejó enfriar hasta que alcanzó una temperatura igual o menor 50 °C, enseguida se adicionaron 300.0 μL de una solución 0.5 M de ACC la cual se disolvió en agua y se esterilizó por filtración usando un filtro de jeringa de 0.2 μm (Penrose y Glick, 2003). En esta prueba, como control positivo se utilizó el medio DF suplementado con $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ (2.0 g/L) y como control negativo el mismo medio DF (Penrose y Glick, 2003).

El ensayo se llevó a cabo en placas de Petri de 8 cm de diámetro, en los diferentes medios se inocularon 10.0 μL de cada cultivo bacteriano, por placa se inocularon los 21 aislados y 10.0 μL de la solución Tris 10 mM (como control), el ensayo se realizó por duplicado. Las placas fueron incubadas durante cuatro días a 30 °C. El crecimiento uniforme de los aislados sobre en el medio DF suplementado con ACC se consideró resultado positivo (Govindasamy et al., 2009).

2.7.7 Evaluación de actividad antagónica

Los aislados bacterianos seleccionados por su actividad antagónica fueron evaluados bajo condiciones *in vitro* contra *Lasioidiplodia theobromae*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium solani* y *F. falciforme*.

Cada bacteria se evaluó de forma individual en ensayos duales contra cada fitopatógeno en PDA casero. El inóculo bacteriano se obtuvo siguiendo el mismo procedimiento que en ensayos anteriores donde se cuantificó la capacidad antagónica, ajustando a una concentración de 1×10^6 UFC. Los fitopatógenos se obtuvieron de la colección de aislados del Laboratorio de Fitopatología del CICESE.

En cada ensayo se inocularon 5.0 μ L del cultivo de la bacteria y en el extremo opuesto, a una distancia de 6 cm, se colocó un disco de micelio de 5.0 mm del hongo. En la evaluación contra *M. phaseolina* y *L. theobromae* ambos microorganismos se inocularon al mismo tiempo y fueron incubados a 30 °C durante cinco días. En el caso de *F. solani* y *F. falciforme*, primero se colocó el disco de micelio del hongo y se dejó incubando a 25 °C hasta que el hongo alcanzara 1.0 cm de diámetro de crecimiento. Finalmente se inoculó la bacteria y se dejó en incubación por 10 días a 25 °C.

Concluido el tiempo de incubación se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio usando la fórmula reportada por Jeyaseelan et al., (2012) mostrada anteriormente.

2.8 Evaluación *in vitro* del efecto de los aislados bacterianos seleccionados sobre la germinación de semillas de tomate (*S. lycopersicum* L.)

Para este ensayo se evaluó el efecto de los aislados con características de potencial promoción de crecimiento y con actividad antagónica en experimentos separados. En cada uno se utilizaron semillas de tomate var. Bonny Best las cuales fueron esterilizadas superficialmente (Goudjal et al., 2016). Enseguida diez semillas se sumergieron en dos mililitros de suspensión bacteriana ajustada a una concentración de 1×10^6 UFC durante 60 minutos. Posteriormente se colocaron cinco semillas en placas de Petri de 150 mm x 15 mm con agar agua al 0.8 %. Las placas se colocaron en posición semivertical y se incubaron durante dos días a 25 °C en oscuridad. Transcurrido este tiempo se incubaron con un fotoperiodo de 18 horas de luz y seis de oscuridad a ~ 25 °C durante diez días (Sachdev et al., 2009; Udin Rashed et al., 2016). Al final del ensayo se evaluó el porcentaje de germinación de la semilla, así como la longitud de tallo y raíz de la

plántula. Con los datos obtenidos se llevó a cabo un análisis ANOVA y una comparación múltiple de medias por el método de Tukey con un intervalo de confianza de 95 % usando el programa Statistica 8.0.

2.9 Ensayos *in vivo*

2.9.1 Manejo de plantas para ensayos *in vivo*

Estos ensayos se hicieron con plantas de tomate, las cuales se mantuvieron en el invernadero de Fitopatología del CICESE. Para obtener las plántulas se emplearon semillas de tomate variedad Bonny Best. Los riegos se realizaron de forma manual inicialmente cada tercer día y conforme fueron creciendo las plantas se regaron diariamente. Además, se llevaron a cabo monitoreos diarios de la demanda hídrica influenciada por el efecto de la radiación solar, temperatura y evapotranspiración de la planta, y cuando fue necesario se incrementó la cantidad de agua aplicada.

Al inicio de los ensayos los riegos se realizaron con agua, a partir de la cuarta semana de haber comenzado el experimento, se fertilizó en cada riego aplicando 100 mL de una solución de triple 17 (0.5 g/L), la cual contiene 17 % de nitrógeno, 17 % fósforo y 17 % potasio.

2.9.2 Evaluación de la promoción del crecimiento de los aislados seleccionados

La capacidad de promoción del crecimiento vegetal de las bacterias se evaluó en plantas tomate de la variedad Bonny best. Considerando los resultados del total de las pruebas *in vitro* que se llevaron a cabo fueron seleccionadas los aislados rbES015, rbES061, rbES075, rbES87, rbES90 y rbES098 para evaluarse. Los controles negativos fueron: el biofungicida comercial Bacillioss (*Bacillus subtilis*) de la compañía Bioamin S.A. de C.V y agua destilada estéril. El inóculo de las bacterias seleccionadas se obtuvo siguiendo la misma metodología que en los ensayos duales *in vitro*.

Las plantas se obtuvieron a partir de la germinación de semillas en charolas de plástico de 72 cavidades usando sustrato Cosmopeat ©. Se emplearon plantas con 30 días de nacidas, las cuales tuvieron una altura

promedio de 5.8 cm y mostraban la aparición de una hoja verdadera. La inoculación se realizó a las raíces de las plantas.

El inóculo de las bacterias seleccionadas se obtuvo de la misma forma que en los ensayos anteriores (capítulo 2, sección 2.4.1), a partir de este cultivo se prepararon 50.0 mL de inóculo ajustado a una concentración de 1×10^6 UFC, en esta solución fueron inmersas las raíces de cada planta, en seguida se realizó el trasplante a macetas de plástico de 6", las cuales fueron llenadas con sustrato Cosmopeat © estéril. Ocho días después se realizó una segunda inoculación, por planta se aplicaron 20.0 mL de inóculo ajustado a una concentración de 1×10^6 UFC.

Para este ensayo se empleó un diseño experimental completamente al azar, con cinco repeticiones por tratamiento. La evaluación de las plantas se realizó 50 días después del trasplante. Las variables evaluadas fueron: altura de la planta (cm), longitud de la raíz (cm), número de hojas, diámetro de tallo (cm), peso fresco y peso seco de dosel y raíz (g).

2.9.3 Evaluación de la actividad antagónica de los aislados seleccionados contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 1 y 2

De los ocho aislados con actividad antagónica fueron seleccionadas cinco cepas (rbES158, rbES182, rbES245, rbES262 y rbES331) a partir de los resultados de las pruebas *in vitro* realizadas, para evaluar su efecto contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* razas 1 y 2 en plantas de tomate de la variedad Bonny Best. Como control positivo se usó el biofungicida comercial Bacillios (*Bacillus subtilis*) de la compañía Bioamin S.A. de C.V. y como control negativo agua destilada estéril. En total se evaluaron 14 tratamientos: cada aislado de manera individual, la interacción de cada aislado bacteriano con los hongos fitopatógenos, el control positivo con y sin el inóculo de los hongos y un control negativo (inoculado con agua destilada estéril). El inóculo de las bacterias seleccionadas se obtuvo siguiendo la misma metodología que en los ensayos duales *in vitro* (Capítulo 2, sección 2.4.1); mientras que el inóculo de cada hongo se obtuvo de un cultivo en semillas de sorgo (20.0 g) con vermiculita (5.0 g) con 10 días incubación a 30 °C (Modificado de Srivastava et al., 2010).

Se emplearon plantas con 25 días de nacidas, las cuales tuvieron una altura promedio de 5.2 cm y mostraban la aparición de una hoja verdadera.

La obtención de las plantas, el inóculo bacteriano, la inoculación inicial y la segunda inoculación se llevaron a cabo de la misma forma que en el ensayo donde se evaluó el efecto de aislados bacterianos en la promoción del crecimiento en plántulas de tomate (Capítulo 2, sección 2.9.2). Diez días después de la segunda inoculación de los aislados bacterianos se realizó la inoculación de los hongos fitopatógenos. Cada planta fue inoculada con 0.5 g del cultivo del hongo en las semillas de sorgo de cada una de las razas (concentración de $\sim 1 \times 10^6$ UFC de la raza 1 y 2). El inóculo de los hongos se mezcló, posteriormente se aplicó en tres perforaciones en el sustrato cerca del tallo. El diseño experimental empleado fue completamente al azar, con seis repeticiones por tratamiento, la evaluación se realizó 60 días después de la siembra.

Las variables evaluadas fueron: altura de la planta (cm), longitud de la raíz (cm), número de hojas, diámetro de tallo (cm), peso fresco y peso seco de biomasa aérea y raíz (g). Adicionalmente se identificó la presencia de síntomas de la enfermedad como pudrición de la raíz, daño por necrosis en tejido vascular y amarillamiento de hojas.

Posteriormente, de todas las plantas infectadas con los patógenos se realizó el aislamiento de ambas razas del hongo a partir de tejido de la corona de la planta y raíces con ligera necrosis. Mientras que cada aislado bacteriano se recuperó de raíces sin lesión. Para ello el tejido se esterilizó por flameado y se inoculó en medio PDA casero. Las placas se incubaron a 25 °C hasta observar el crecimiento para recuperar los microorganismos. Los hongos patógenos se identificaron de acuerdo a las características morfológicas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Mientras, que las cepas bacterianas se identificaron de acuerdo a las características morfológicas del género de cada inóculo.

2.9.4 Análisis estadístico

Con los resultados obtenidos de los ensayos *in vivo* de cada variable (altura, diámetro de tallo, peso fresco y peso seco) se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente una comparación múltiple de medias por el método de Tukey ($p \leq 0.05$) utilizando el paquete Statistica 8.0.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Aislamiento de bacterias de muestras de suelo de la rizósfera del arbusto

Solanum hindsianum

Se analizaron muestras de suelo colectado de la rizósfera de *S. hindsianum* distribuidas en 12 sitios en los estados de Baja California y Baja California Sur (Figura 2).

En total se obtuvieron 343 aislados bacterianos (Tabla 2), la mayor cantidad en la muestra M-10 (20.40%) colectada en la localidad de Vizcaíno en Baja California Sur; mientras que en las muestras M-2 (3.79%) y M-3 (4.37%) se obtuvieron el menor número de aislados.

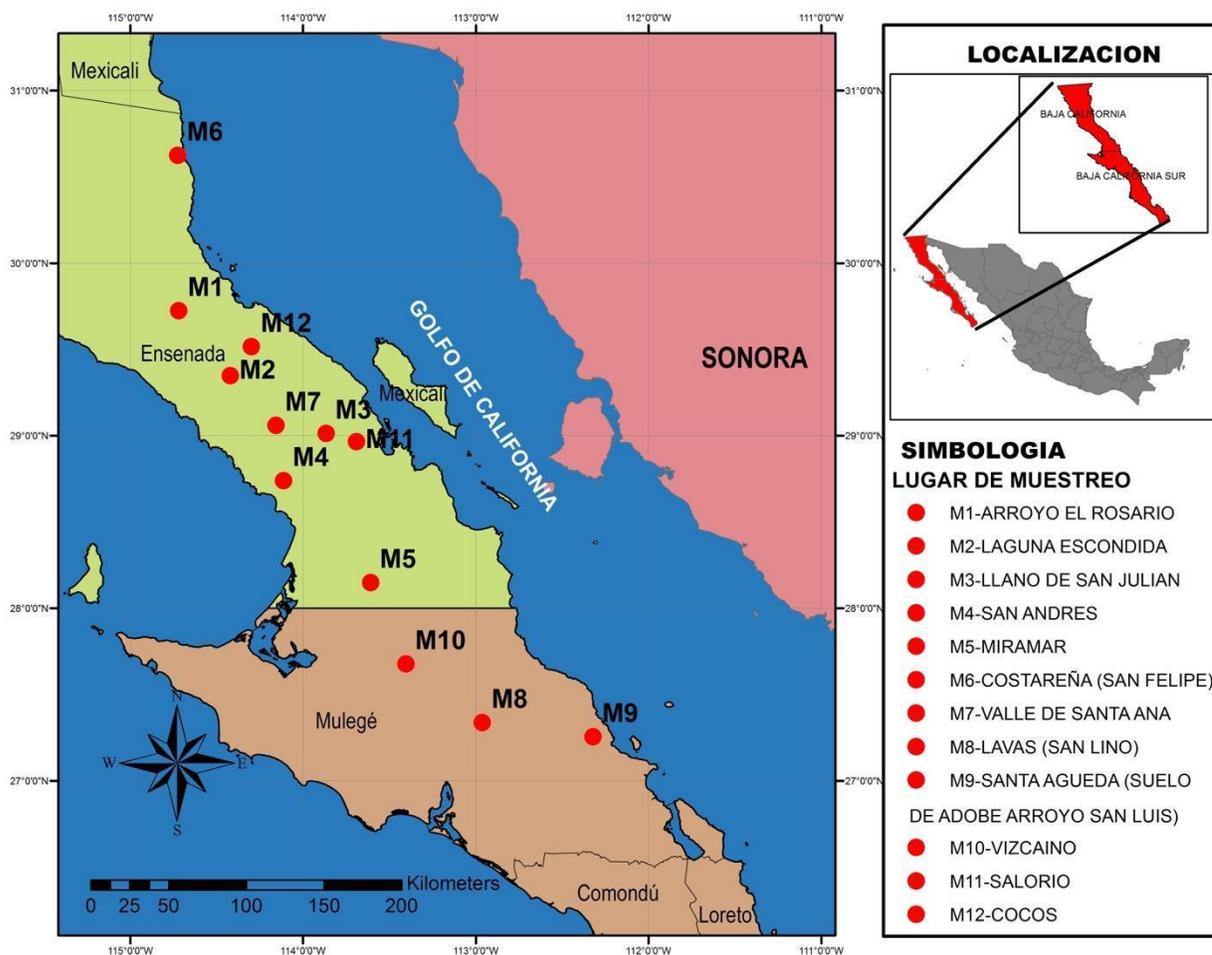


Figura 2. Distribución de los sitios de muestreo.

Tabla 2. Aislados obtenidos de las doce muestras de suelo colectados de la rizósfera del arbusto *S. hindsianum*.

Muestra	Sitio de muestreo	Número de aislados obtenidos
M-1	Arroyo el Rosario	19
M-2	Laguna escondida	13
M-3	Llano de San Julián	15
M-4	San Andrés	23
M-5	Miramar	19
M-6	Costareña (San Felipe)	12
M-7	Valle de Santa Ana	22
M-8	Lavas (San Lino)	23
M-9	Santa Agueda	58
M-10	Vizcaíno	70
M-11	Salorio	40
M12	Cocos	29
Total de aislados		343

3.2 Evaluación *in vitro* de las características de promoción de crecimiento vegetal de las bacterias aisladas

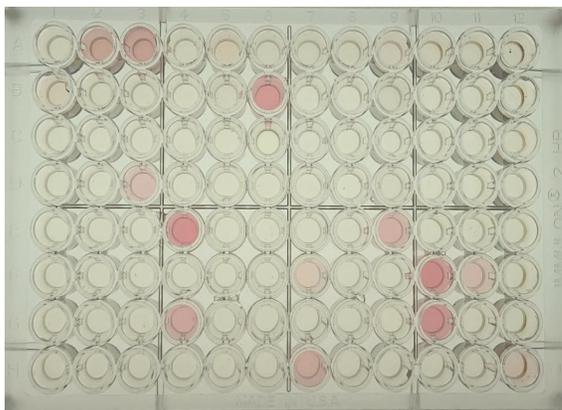
En las seis pruebas colorimétricas realizadas, el número de aislados que mostró resultado positivo fue diferente (Figura 3, Tabla 3); se obtuvieron 134 aislados con producción de AIA, 36 con producción de quitinasas, 31 producen sideróforos, 30 producen HCN, 85 solubilizan potasio y 228 solubilizan fósforo. El mayor número de aislados con resultados positivos provino de la muestra M-10.

Tabla 3. Resultados positivos por muestra de las seis pruebas colorimétricas realizadas.

Muestra	Producción				Solubilización	
	AIA	Qui	Sid	HCN	K	P
M-1	13	1	6	0	5	14
M-2	8	3	4	0	7	8
M-3	7	2	0	0	1	11
M-4	13	4	4	4	9	19
M-5	11	4	5	6	10	16
M-6	9	2	2	0	5	8
M-7	17	8	5	4	10	19
M-8	9	3	0	5	4	15
M-9	18	7	0	2	6	41
M-10	20	6	5	6	14	44
M-11	6	0	0	3	6	17
M12	3	0	0	0	8	16
Total	134	36	31	30	85	228

AIA: Ácido indol acético, Qui: quitinasas, Sid: sideróforos, HCN: ácido cianhídrico

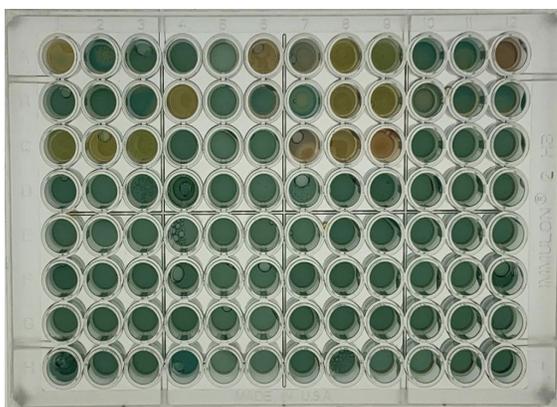
Producción de AIA



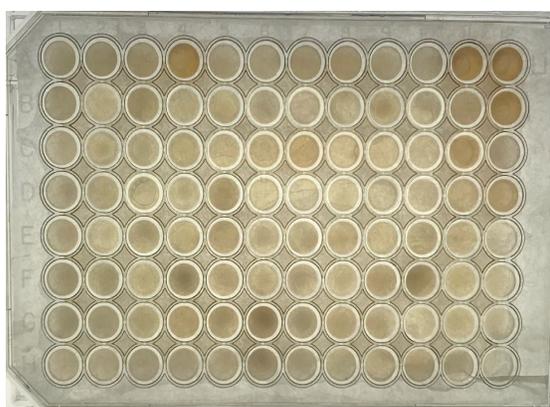
Producción de quitinasas



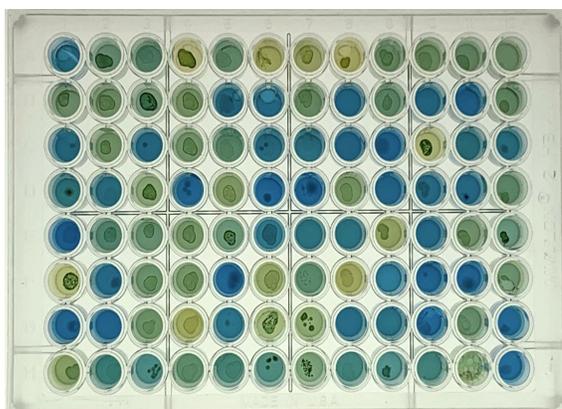
Producción de sideróforos



Producción de HCN



Solubilización de potasio



Solubilización de fósforo

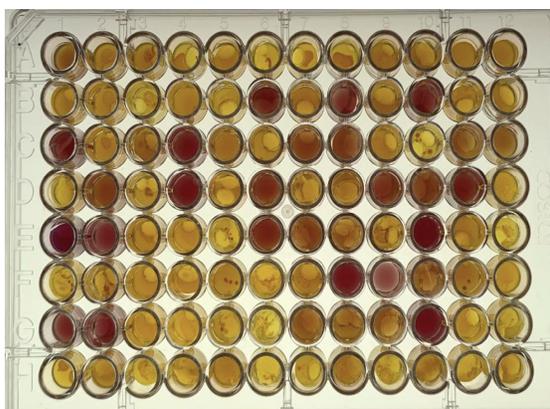


Figura 3. Ejemplos de resultados obtenidos de las seis pruebas colorimétricas realizadas.

3.3 Evaluación *in vitro* de la actividad antagónica de las bacterias

Al evaluar cualitativamente la actividad antagónica de los 343 aislados obtenidos sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, 44 mostraron tener actividad (Figura 4), de estos, 34 mostraron antagonismo por competencia y nueve antagonismo por formación de halo de inhibición. En la muestra M-11 se concentró el mayor número de resultados positivos (Tabla 4). La cuantificación del porcentaje de inhibición mediante ensayos duales de los 44 aislados con actividad antagónica contra FOL raza 1 indicó porcentajes entre 5.02 % hasta 69.83 % (Tabla 5).

De los 43 aislados, fueron seleccionadas 15 cepas cuyos porcentajes de inhibición fueron mayores a 50 % en el caso de inhibición invasiva (12 aislados) y superiores a 19 % para aquellos con formación de halo de inhibición (tres aislados). Las cepas seleccionadas bajo estos criterios para evaluarse contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) raza 1 y 2 fueron: rbES158, rbES164, rbES182, rbES201, rbES232, rbES235, rbES245, rbES253, rbES254, rbES256, rbES262, rbES269, rbES280, rbES285, rbES331.

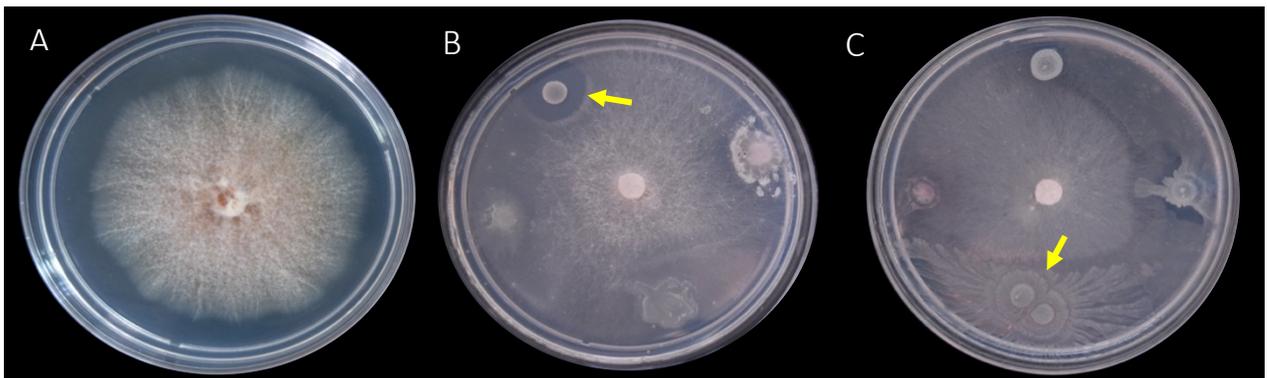


Figura 4. Ejemplo de selección de aislados por su actividad antagónica. A) *F. oxysporum*. B) Aislado seleccionado por formación de halo de inhibición. C) Aislado seleccionado por tener inhibición invasiva.

Tabla 4. Cepas bacterianas que mostraron actividad antagónica contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raza 1.

Muestra	Nº de aislados con actividad antagónica	Aislados con resultado positivo
M-1	0	-
M-2	0	-
M-3	1	rbES164
M-4	1	rbES158
M-5	0	-
M-6	0	-
M-7	0	-
M-8	0	-
M-9	10	rbES178, rbES182, rbES187, rbES192, rbES193, rbES199, rbES200, rbES201, rbES285, rbES290
M-10	7	rbES211, rbES213, rbES219, rbES222, rbES227, rbES307, rbES320
M-11	13	rbES232, rbES233, rbES235, rbES243, rbES245, rbES248, rbES252, rbES253, rbES254, rbES256, rbES328, rbES329, rbES331
M12	11	rbES261, rbES262, rbES266, rbES267, rbES268, rbES269, rbES272, rbES273, rbES275, rbES277, rbES280

Tabla 5. Resultados de evaluación de aislados bacterianos en cultivos duales contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 1.

Aislado	Tipo de inhibición	Porcentaje de inhibición
rbES158	Halo de inhibición	24.04
rbES164	Halo de inhibición	24.04
rbES178	Inhibición invasiva	34.23
rbES182	Inhibición invasiva	58.15
rbES187	Inhibición invasiva	23.50
rbES192	Inhibición invasiva	40.48
rbES193	Inhibición invasiva	27.30
rbES199	Inhibición invasiva	20.92
rbES200	Inhibición invasiva	4.89
rbES201	Inhibición invasiva	61.95
rbES211	Inhibición invasiva	11.27
rbES213	Inhibición invasiva	33.28
rbES219	Inhibición invasiva	16.16
rbES222	Inhibición invasiva	25.27
rbES227	Inhibición invasiva	27.85
rbES232	Inhibición invasiva	66.84
rbES233	Inhibición invasiva	54.07
rbES235	Inhibición invasiva	58.15
rbES243	Inhibición invasiva	37.22
rbES245	Inhibición invasiva	69.83
rbES248	Inhibición invasiva	9.64
rbES252	Inhibición invasiva	49.04
rbES253	Inhibición invasiva	69.15
rbES254	Inhibición invasiva	57.47
rbES256	Inhibición invasiva	55.16
rbES261	Inhibición invasiva	26.90
rbES262	Inhibición invasiva	68.61
rbES266	Inhibición invasiva	47.69
rbES267	Inhibición invasiva	19.15
rbES268	Inhibición invasiva	37.77
rbES269	Inhibición invasiva	54.34
rbES272	Halo de inhibición	23.91
rbES273	Inhibición invasiva	35.32
rbES275	Inhibición invasiva	29.07
rbES277	Inhibición invasiva	22.26
rbES280	Inhibición invasiva	51.90
rbES285	Halo de inhibición	63.99
rbES290	Halo de inhibición	9.64
rbES307	Halo de inhibición	9.91
rbES320	Halo de inhibición	5.02
rbES328	Halo de inhibición	10.46
rbES329	Halo de inhibición	7.20
rbES331	Halo de inhibición	23.09

3.4 Cuantificación *in vitro* de la capacidad antagónica contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* razas 1 y 2

Los 15 aislados evaluados mostraron diferentes porcentajes de inhibición; mientras que contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 1 estos tuvieron un porcentaje de inhibición en un intervalo de 16.51 al 68.42 %, contra la raza 2 los intervalos fueron desde 13.28 % a 76.71 % (Tabla 6, Figura 5).

Tabla 6. Porcentajes de inhibición obtenidos en evaluación de cultivos duales de aislados bacterianos contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 1 (FOL_{R1}) y raza 2 (FOL_{R2})

Aislado	Porcentaje de inhibición	
	FOL _{R1}	FOL _{R2}
rbES158	24.08	17.80
rbES164	19.40	16.43
rbES182	50.36	52.05
rbES201	49.36	76.71
rbES232	55.34	65.75
rbES235	47.85	53.42
rbES245	68.42	76.71
rbES253	31.54	45.20
rbES254	59.05	52.05
rbES256	52.50	73.97
rbES262	45.99	46.57
rbES269	35.35	47.94
rbES280	16.57	34.24
rbES285	22.90	13.28
rbES 331	20.10	16.71

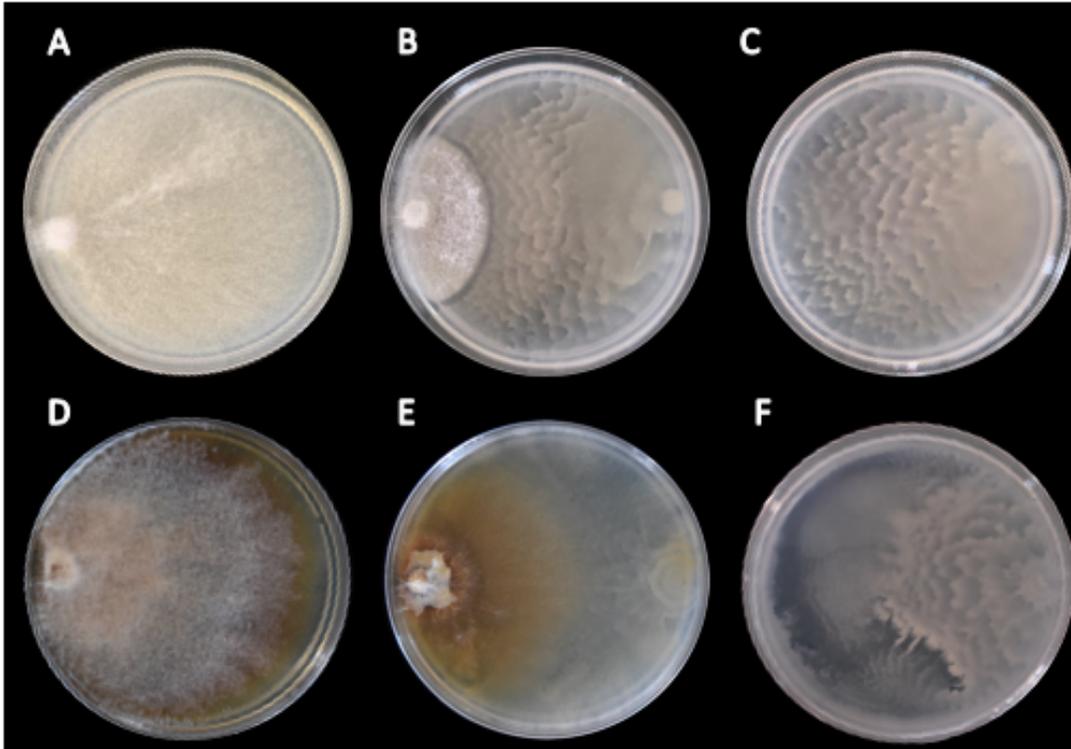


Figura 5. Ensayo dual evaluando el aislado rbES245 contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) raza 1 y 2. A) FOL raza 1. B) Interacción entre FOL raza 1 y aislado rbES245. C) rbES245. D) FOL raza 2. E) Interacción entre FOL raza 2 y aislado rbES245. F) rbES245.

3.5 Selección e Identificación molecular de aislados

3.5.1 Aislados con características de promoción de crecimiento

Del total de los aislados evaluados se seleccionaron 18 que presentaron al menos cuatro resultados positivos en las pruebas colorimétricas realizadas. Los resultados de la identificación molecular indicaron que estos pertenecen a siete géneros de bacterias: *Chryseobacterium*, *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Microbacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* (Tabla 7).

Seis aislados fueron identificados como *Staphylococcus sciuri* (rbES001, rbES005, rbES050, rbES053, rbES057 y rbES169). Debido a que se ha reportado que esta bacteria causa infecciones en humanos (Meservey et al., 2020) a pesar de también ser una PGPR, estos aislados fueron descartados y resguardados para futuras evaluaciones, por lo que se continuó trabajando con los 12 aislados restantes.

Tabla 7. Identificación de aislados seleccionados por sus características asociadas a la promoción de crecimiento.

Muestra	Aislado	Identificación	Características de promoción de crecimiento					
			Producción				Solubilización	
			AIA	QUI	SID	HCN	K	P
M1	rbES015	<i>Bacillus megaterium</i>	+	-	+	-	+	+
M2	rbES062	<i>Bacillus</i> sp.	+	-	+	-	+	+
M10	rbES145	<i>Chryseobacterium</i> sp.	+	+	-	-	+	+
M7	rbES120	<i>Lysinibacillus</i> sp.	+	-	-	-	+	+
M4	rbES031	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	+	-	+	-	+	+
M5	rbES090	<i>Paenibacillus reinekei</i>	+	+	+	-	+	+
M4	rbES075	<i>Paenibacillus</i> sp.	+	-	+	-	+	+
M6	rbES041	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	-	+	-	+	-
M2	rbES061	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	-	+	-	+	+
M5	rbES086	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	-	+	-	+	+
M5	rbES087	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	-	+	-	+	+
M6	rbES098	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	+	-	-	+	+
M1	rbES001	<i>Staphylococcus sciuri</i>	+	-	+	-	+	+
M4	rbES005	<i>Staphylococcus sciuri</i>	+	-	-	-	+	+
M7	rbES050	<i>Staphylococcus sciuri</i>	+	+	+	-	+	+
M7	rbES053	<i>Staphylococcus sciuri</i>	+	+	+	-	+	+
M7	rbES057	<i>Staphylococcus sciuri</i>	+	-	+	-	+	+
M1	rbES169	<i>Staphylococcus</i> sp.	+	-	+	-	+	+

AIA: ácido indol acético, Qui: quitinasas, SID: sideróforos, HCN: ácido cianhídrico, + resultado positivo, - resultado negativo

3.5.2 Aislados con actividad antagónica

Se seleccionaron ocho aislados para su identificación molecular debido a su actividad antagónica contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 1 y raza 2, de los cuales cinco tienen inhibición invasiva con un porcentaje de inhibición mayor al 50% y cuatro forman halo de inhibición con porcentajes mayores al 20%; además todos los aislados tuvieron al menos un resultado positivo en las pruebas colorimétricas realizadas previamente (Tabla 8). Los resultados de la identificación molecular indicaron que los diferentes aislados pertenecen a los géneros *Arthrobacter*, *Bacillus* y *Streptomyces*.

Tabla 8. Identificación de aislados seleccionados por cumplir los parámetros de selección para actividad antagonista.

Aislado	Identificación molecular	Tipo de antagonismo	Producción		Solubilización	
			AIA	SID	Potasio	Fósforo
rbES158	<i>Streptomyces luteovirgatus</i>	Halo de inhibición	-	+	+	+
rbES182	<i>Bacillus</i> sp.	Inhibición invasiva	+	+	+	+
rbES232	<i>Bacillus subtilis</i>	Inhibición invasiva	+	-	+	+
rbES245	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	Inhibición invasiva	+	-	+	-
rbES254	<i>Bacillus subtilis</i>	Inhibición invasiva	+	-	+	-
rbES256	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	Inhibición invasiva	-	-	+	+
rbES262	<i>Bacillus</i> sp.	Inhibición invasiva	+	-	-	-
rbES331	<i>Arthrobacter</i> sp.	Halo de inhibición	+	-	-	-

AIA: ácido indol acético, SID: sideróforos, + resultado positivo, - resultado negativo.

3.6 Caracterización de aislados seleccionados por su actividad antagonista y sus características de promoción de crecimiento

En la prueba para cuantificar la producción de ácido indol acético, se identificó que el aislado rbES158 no produjo AIA, el aislado rbES015 obtuvo el valor más bajo correspondiente a 3.29 mg/mL, y el valor más alto lo mostró la cepa rbES098 con 72.61 mg/mL. Los resultados en la prueba de formación de biofilm mostraron 12 aislados con resultado positivo. En la prueba de fijación de nitrógeno, ocho aislados que pertenecen a los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* mostraron resultado positivo. Ocho aislados, pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Pseudomonas* y *Streptomyces*, mostraron la capacidad de solubilizar zinc. En la prueba para determinar actividad de ACC-desaminasa los aislados rbES090, rbES182 y rbES232 mostraron resultados positivos. Del total de las pruebas realizadas los aislados rbES182 y rbES232 mostraron la capacidad de producir AIA, formar biofilm, fijar nitrógeno, solubilizar Zinc y actividad de ACC-desaminasa (Tabla 9).

Con respecto a la evaluación extendida de actividad antagonista, los ocho aislados bacterianos evaluados mostraron efecto inhibitorio contra los fitopatógenos evaluados (Tabla 10). Contra *L. theobromae* los porcentajes de inhibición fueron desde 10.58 % hasta 52.01 %, siendo el aislado rbES262 (Figura 6B) el que obtuvo el mayor porcentaje de inhibición. Para *M. phaseolina* se obtuvieron valores desde 13.78 % hasta 66.38 % siendo el aislado rbES262 (Figura 6E) el que presentó el porcentaje más alto. Para *F. solani* los

porcentajes de inhibición fueron de 18.15 % hasta 58.51 %, el más alto obtenido por el aislado rbES182 (Figura 6H). Finalmente, contra *F. falciforme* los porcentajes fueron desde 15.64 % hasta 60.75 % siendo el aislado rbES245 (Figura 6K) el que obtuvo el porcentaje de inhibición más alto. En general el aislado rbES262 fue el que mostró la mejor actividad de inhibición y el rbES331 el que presentó menor inhibición contra todos los hongos evaluados.

Tabla 9. Resultados de pruebas realizadas con aislados seleccionados.

Aislado	Características evaluadas				
	Cuantificación de AIA (mg/ml)	Formación de Biofilm	Fijación de nitrógeno	Solubilización de ZnO	ACC desaminasa
rbES158	0	-	-	-	-
rbES015	3.29	+	-	-	-
rbES120	4.52	-	-	-	-
rbES182	6.55	+	+	+	+
rbES256	8.24	+	+	+	-
rbES331	8.60	-	-	-	-
rbES245	8.81	+	+	-	-
rbES062	9.57	+	-	-	-
rbES254	10.37	+	+	+	-
rbES262	11.12	+	+	-	-
rbES232	11.55	+	+	+	+
rbES061	12.09	-	+	+	-
rbES031	14.54	-	-	-	-
rbES075	16.08	-	-	-	-
rbES145	18.38	-	-	+	-
rbES087	32.52	+	-	+	-
rbES041	52.87	+	-	-	-
rbES086	54.66	-	-	-	-
rbES090	56.12	-	-	-	+
rbES098	72.61	+	+	-	-

AIA: Ácido indol acético, + resultado positivo, - resultado negativo.

Tabla 10. Porcentajes de inhibición obtenidos en evaluación mediante ensayos duales de aislados bacterianos contra cinco hongos fitopatógenos.

Aislado	Porcentaje de inhibición			
	<i>L. theobromae</i>	<i>M. phaseolina</i>	<i>F. solani</i>	<i>F. falciforme</i>
rbES331	10.58	16.52	18.15	15.64
rbES158	11.62	17.13	18.65	17.17
rbES256	32.71	47.95	49.58	57.26
rbES232	35.57	52.56	53.35	56.10
rbES182	40.09	59.35	58.51	52.23
rbES245	45.02	49.90	48.43	60.75
rbES254	45.65	48.80	51.95	55.86
rbES262	52.01	66.38	55.86	53.49

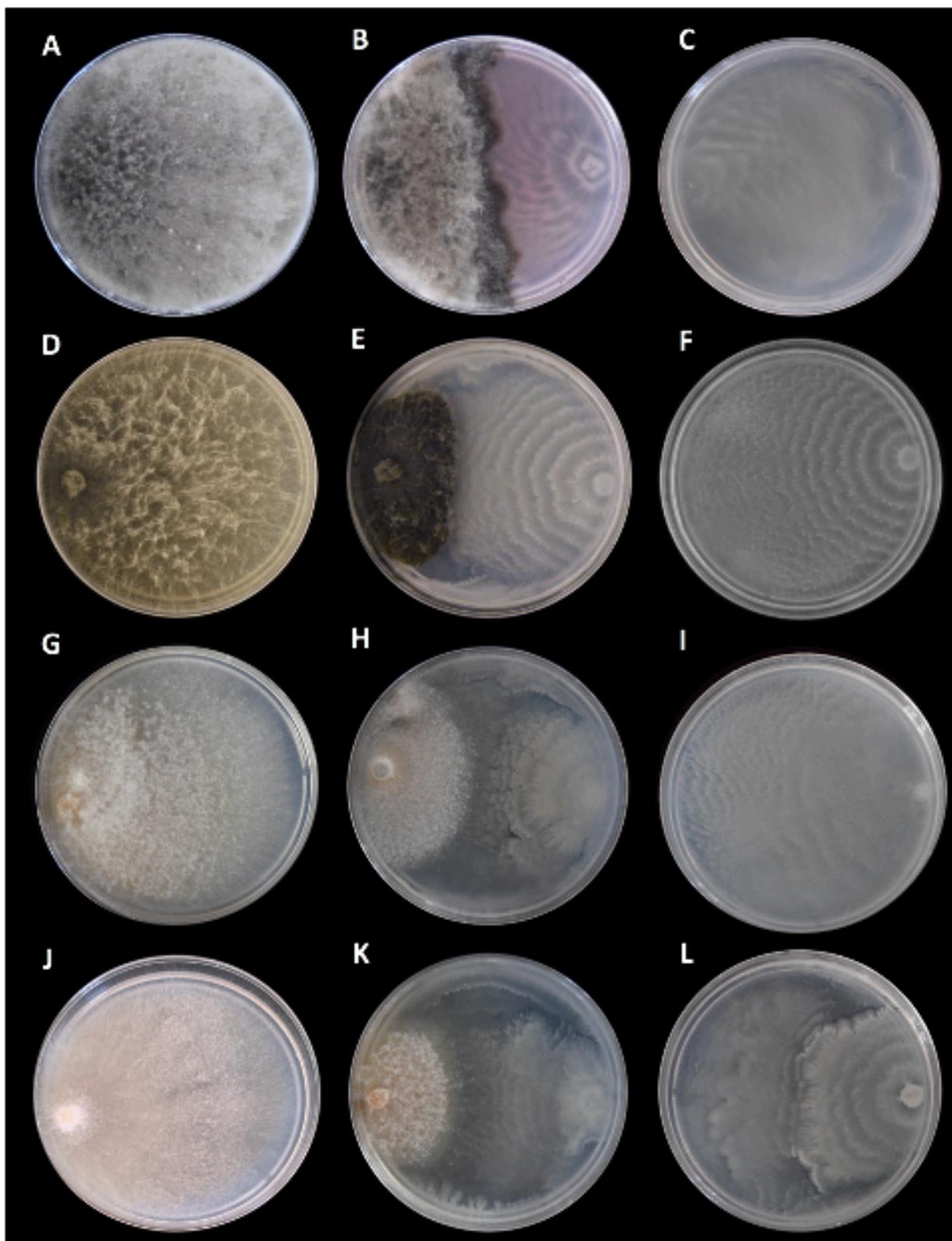


Figura 6. Aislados bacterianos obtenidos de la rizósfera de *Solanum hindsianum* en ensayos duales contra diferentes fitópatógenos. A) *L. theobromae*. B) Interacción entre *L. theobromae* y rbES262. C) rbES262. D) *M. phaseolina*. E) Interacción entre *M. phaseolina* y rbES262. F) rbE262. G) *F. solani*. H) Interacción entre *F. solani* y rbES182. I) rbES182. J) *F. falciforme*. K) Interacción entre *F. falciforme* y rbES245. L) rbES245.

3.7 Evaluación *in vitro* del efecto de los aislados bacterianos seleccionados sobre la germinación de *Solanum lycopersicum*

3.7.1 Evaluación *in vitro* del efecto de aislados bacterianos con características de promoción de crecimiento sobre la germinación de *S. lycopersicum*

Al cuarto día de evaluación las semillas inoculadas con el aislado rbES075 mostraron el 100 % de germinación. El tratamiento inoculado con el aislados rbES087 tuvo el 100 % de germinación al quinto día. Mientras que en las semillas inoculadas con los aislados rbES015 y rbES098 alcanzaron el 100 % de germinación de las semillas al sexto día; y las semillas del tratamiento rbES086 al séptimo día (Figuras 7 y 8). Los ocho tratamientos restantes aún al doceavo día de evaluación no alcanzaron el 100 % de germinación. Los resultados del análisis estadístico para las variables longitud de tallo y raíz de las plántulas obtenidas no mostraron diferencias significativas con respecto al control (Tabla 11).

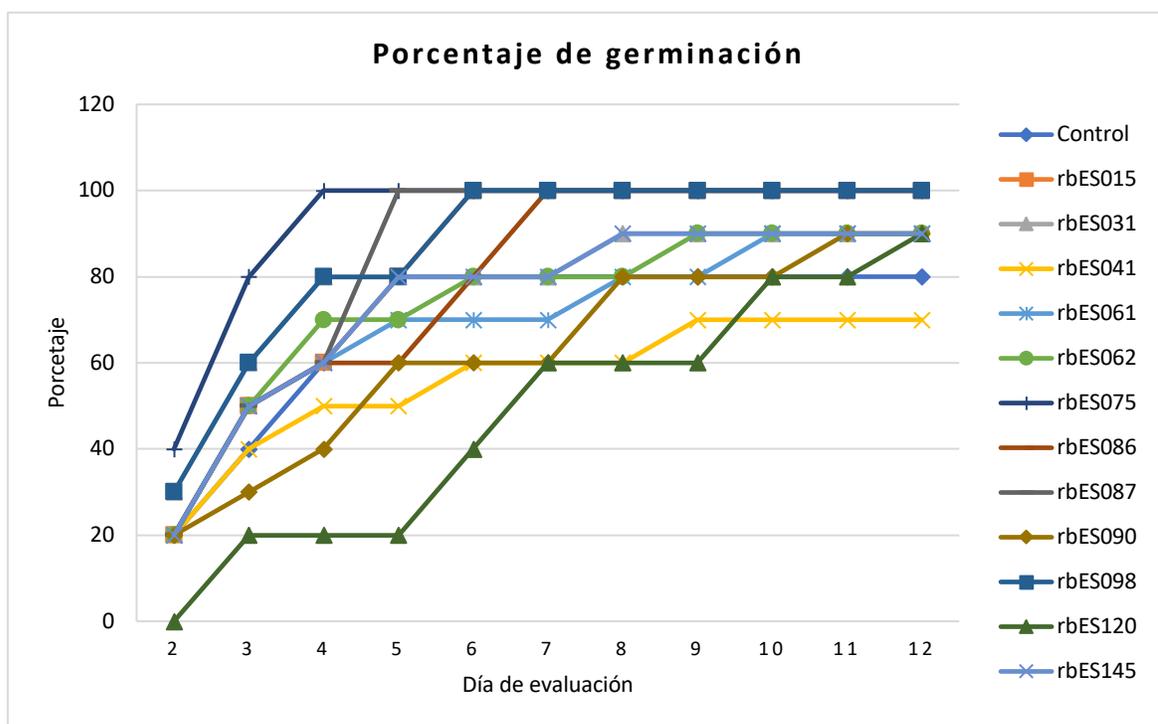


Figura 7. Evaluación del porcentaje de germinación de semillas de tomate inoculadas con aislados bacterianos seleccionados por su potencial de promover el crecimiento.

Tabla 11. Evaluación de la longitud de raíz y longitud de tallo de plántulas de tomate inoculadas con aislados bacterianos con características de potencial promoción de crecimiento.

Tratamiento	Longitud de raíz (cm)	Longitud de tallo (cm)
rbES120	4.02 ± 1.09 <i>a</i>	2.58 ± 0.82 <i>a</i>
rbES145	5.88 ± 1.16 <i>a</i>	1.80 ± 0.45 <i>a</i>
rbES031	6.28 ± 0.82 <i>a</i>	3.09 ± 0.51 <i>a</i>
Control	5.98 ± 1.29 <i>a</i>	2.33 ± 0.46 <i>a</i>
rbES015	7.18 ± 0.29 <i>a</i>	2.69 ± 0.26 <i>a</i>
rbES062	6.43 ± 1.11 <i>a</i>	2.31 ± 0.52 <i>a</i>
rbES041	6.41 ± 1.39 <i>a</i>	2.30 ± 0.56 <i>a</i>
rbES090	7.36 ± 0.58 <i>a</i>	3.49 ± 0.61 <i>a</i>
rbES086	7.36 ± 0.79 <i>a</i>	3.20 ± 0.62 <i>a</i>
rbES061	7.05 ± 1.43 <i>a</i>	2.50 ± 0.50 <i>a</i>
rbES075	8.76 ± 1.29 <i>a</i>	2.37 ± 0.33 <i>a</i>
rbES098	9.19 ± 1.23 <i>a</i>	3.02 ± 0.26 <i>a</i>
rbES087	9.67 ± 1.20 <i>a</i>	2.64 ± 0.28 <i>a</i>

Valores de media ± error estándar en la misma columna, la misma letra indica que no hubo diferencias significativas (P= 0.05).

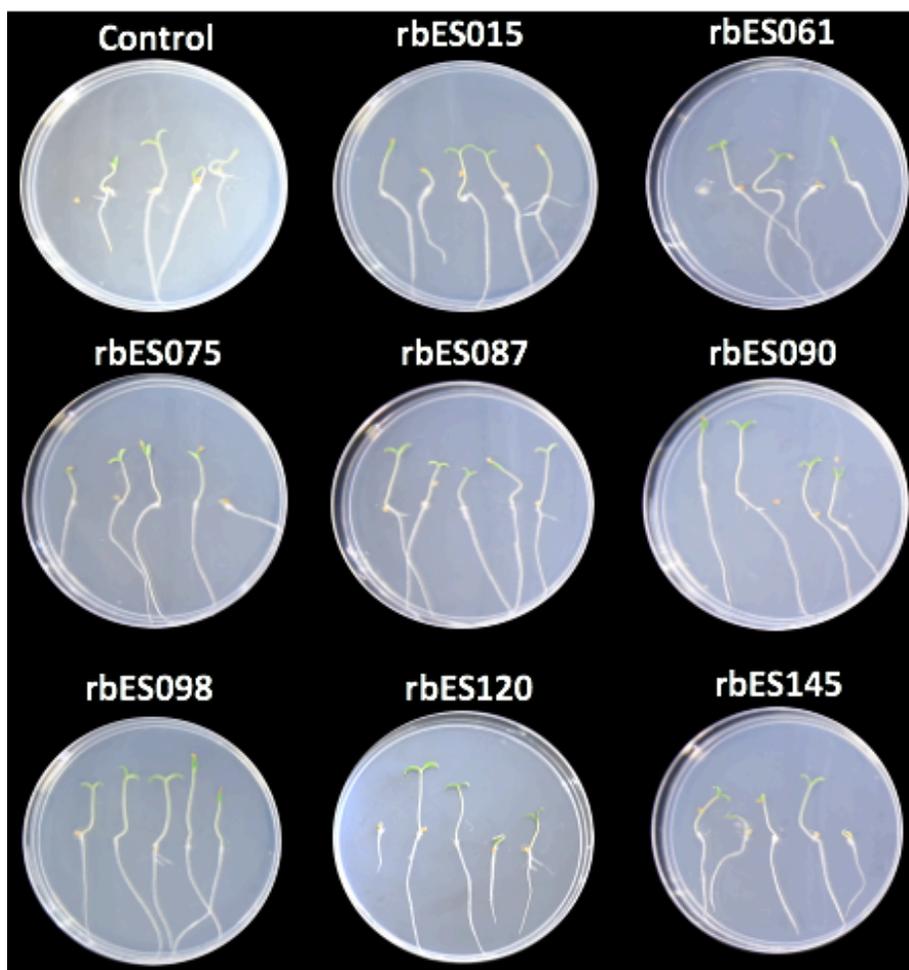


Figura 8. Evaluación *in vitro* del efecto de ocho de los doce aislados bacterianos evaluados por sus características de promoción de crecimiento sobre la germinación de *S. lycopersicum* var. Bonny Best. Fotografía tomada al momento de la evaluación del ensayo.

3.7.2 Evaluación *in vitro* del efecto de aislados bacterianos con actividad antagónica sobre la germinación de *S. lycopersicum*

En la evaluación de la longitud de tallo, los ocho tratamientos no mostraron un incremento significativo con respecto al control (Tabla 12); sin embargo, las semillas inoculadas con los aislados rbES232 y rbES331 tuvieron una disminución significativa en la longitud de la raíz con respecto al control. Adicionalmente, las semillas inoculadas con el aislado rbES331 mostraron los valores más bajos para ambas variables. Con respecto a los porcentajes de germinación, las semillas inoculadas con los aislados rbES256 y rbES262, cepas del género *Bacillus*, alcanzaron el 100 % de germinación cuatro días después de haber iniciado el ensayo; las semillas de los tratamientos rbES158, rbES182, rbES232 y rbES254 alcanzaron el 100 % de germinación al octavo día y las semillas inoculadas con los aislados rbES245 y rbES331 al final del ensayo tuvieron un 80 % de germinación (Figuras 9 y 10).

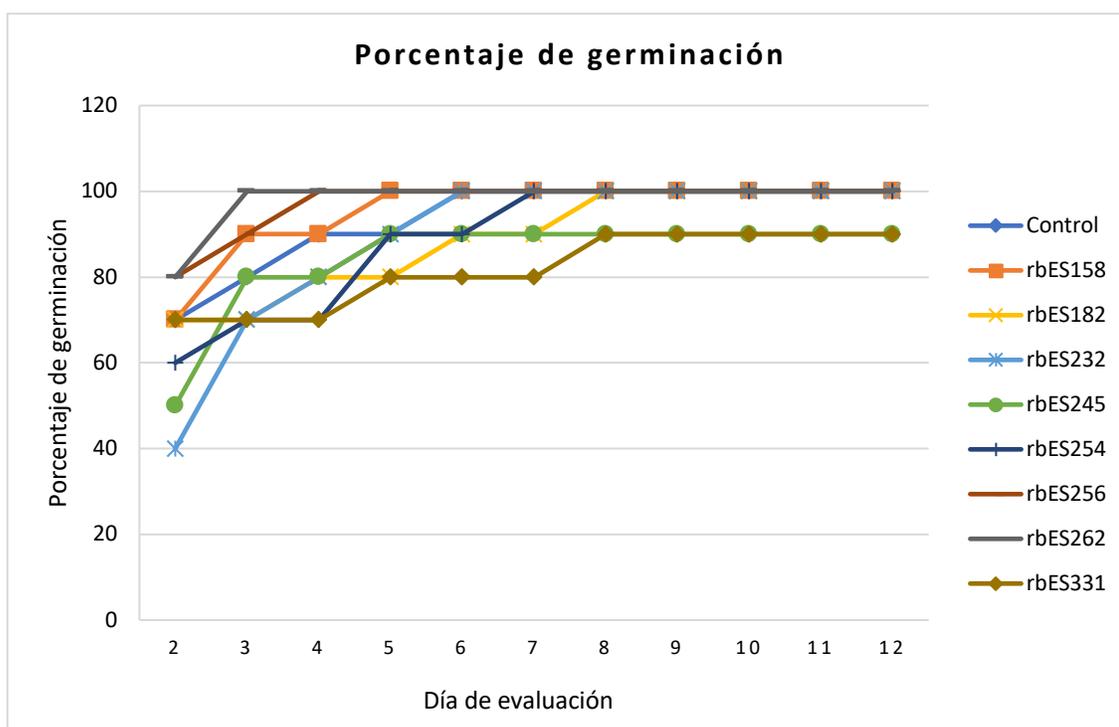


Figura 9. Porcentaje de germinación de semillas de tomate inoculadas con ocho diferentes aislados bacterianos seleccionados por su actividad antagónica.

Tabla 12. Longitud de raíz y longitud de tallo de plántulas de tomate inoculadas con aislados bacterianos con actividad antagonica.

Tratamiento	Longitud de raíz (cm)	Longitud de tallo (cm)
Control	13.88 ± 2.03 a	4.42 ± 0.84 a
rbES158	12.38 ± 2.11 a	5.03 ± 1.23 a
rbES182	10.07 ± 1.68 a	4.21 ± 0.89 a
rbES232	8.61 ± 3.85 b	3.84 ± 1.41 a
rbES245	12.65 ± 5.28 a	4.22 ± 1.64 a
rbES254	11.10 ± 3.92 a	4.24 ± 1.48 a
rbES256	12.06 ± 3.16 a	4.60 ± 0.95 a
rbES262	10.95 ± 3.84 a	4.68 ± 0.89 a
rbES331	7.32 ± 4.91 b	3.62 ± 1.60 a

Media ± error estándar en la misma columna, la misma letra indica que no hubo diferencias significativas (P= 0.05).

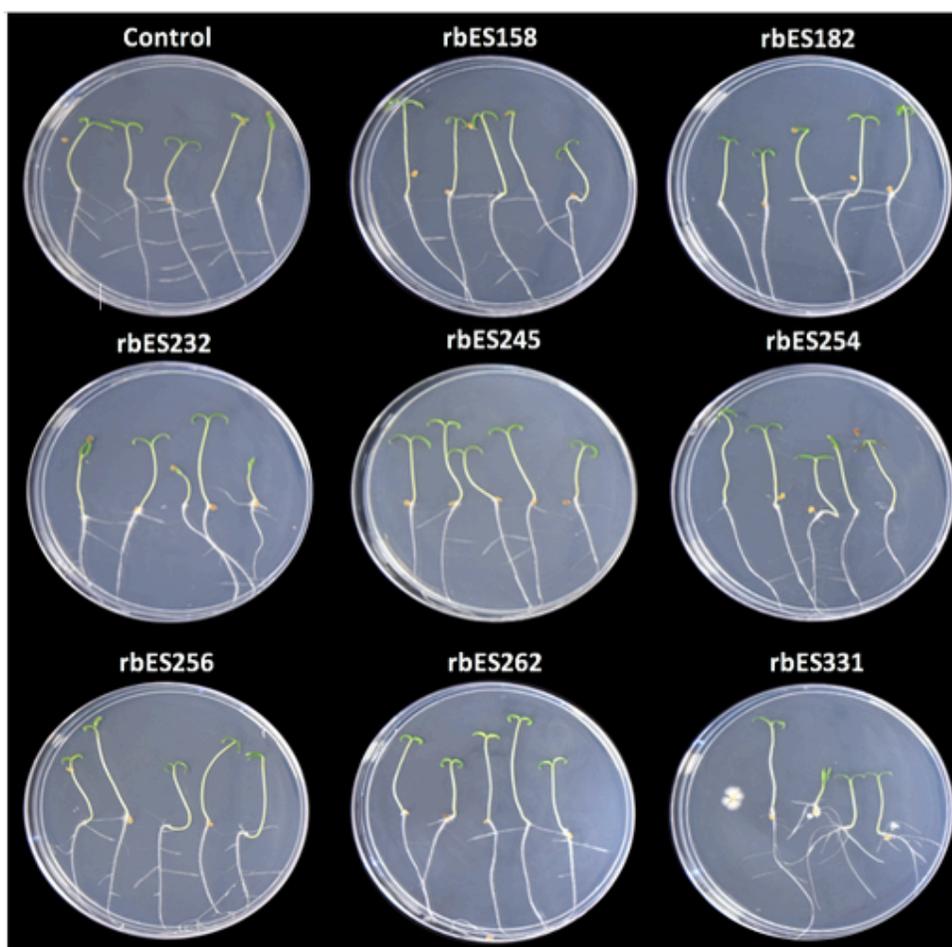


Figura 10. Evaluación *in vitro* del efecto de los aislados bacterianos con actividad antagonica sobre la germinación de semillas de *S. lycopersicum* var. Bonny Best. Fotografía tomada al momento de la evaluación del ensayo.

3.8 Evaluación de la actividad en la promoción del crecimiento en plantas de tomate

Las seis cepas bacterianas seleccionadas y evaluadas incrementaron el crecimiento de las plantas con respecto al control negativo y al producto comercial (Figura 11). Los tratamientos inoculados con los aislados bacterianos rbES015, rbES061, rbES075, rbES087 y rbES098 mostraron un incremento significativo en el diámetro de tallo en comparación con el tratamiento control. Las plantas inoculadas con el aislado rbES015 tuvieron un incremento del 211.11 % en el diámetro de tallo con respecto al control (Tabla 13). Los resultados obtenidos de la evaluación longitud de tallo mostraron que las plantas inoculadas con cinco de los aislados bacterianos tuvieron un incremento significativo en la longitud del tallo, de entre el 53.11 % a 64.61 %, en comparación con las plantas del tratamiento control (Tabla 13).

En cuanto a la variable peso fresco se observó que las plantas inoculadas con los seis aislados bacterianos nativos tuvieron un incremento significativo, de hasta un 284.59 %, en el peso fresco del follaje en comparación con las plantas del tratamiento control. Por otro lado, los resultados para la variable peso seco de follaje mostraron un incremento significativo, de hasta un 333.07 %, en las plantas que fueron inoculados con los aislados de *Pseudomonas* rbES061, rbES087, rbES090 y rbES098, con respecto al control (Tabla 13).

Al evaluar el peso fresco de la raíz los resultados mostraron que las plantas inoculadas con los seis aislados bacterianos tuvieron un incremento significativo, de hasta 526.10 %, en el peso fresco de la raíz con respecto al control. Para la variable peso seco de raíz las plantas inoculadas con cinco de los aislados bacterianos (rbES015, rbES061, rbES087, rbES090 y rbES098) tuvieron un incremento significativo en el peso seco de la raíz de hasta 372.72 % en comparación con el control (Tabla 13).

Para las variables longitud de raíz, número de hojas y número de flores no hubo diferencias significativas entre los distintos tratamientos con respecto al control. Adicionalmente las plantas inoculadas con el producto comercial no mostraron diferencias significativas para ninguna variable (Tabla 14). De acuerdo con los resultados de todas las variables se ha considerado a los aislados rbES087 y rbES090 como los mejores.

Tabla 13. Evaluación de seis variables que mostraron diferencias significativas en plantas de tomate inoculadas con aislados bacterianos con características de promoción de crecimiento.

Tratamiento	Variables evaluadas					
	Diametro de tallo (cm)	Altura de la planta (cm)	Peso fresco follaje (g)	Peso seco follaje (g)	Peso seco raíz (g)	Peso fresco raíz (g)
Control	0.27 ± 0.01 <i>a</i>	26.00 ± 2.34 <i>a</i>	7.27 ± 1.90 <i>a</i>	1.27 ± 0.41 <i>a</i>	0.22 ± 0.03 <i>a</i>	1.68 ± 0.23 <i>a</i>
rbES015	0.80 ± 0.04 <i>c</i>	38.76 ± 3.35 <i>a</i>	23.54 ± 2.58 <i>b</i>	4.58 ± 0.43 <i>b</i>	0.80 ± 0.23 <i>b</i>	9.14 ± 2.55 <i>b</i>
rbES061	0.56 ± 0.08 <i>b</i>	42.00 ± 5.47 <i>b</i>	25.18 ± 4.77 <i>b</i>	4.93 ± 1.53 <i>b</i>	1.04 ± 0.30 <i>b</i>	10.52 ± 4.18 <i>b</i>
rbES075	0.58 ± 0.10 <i>b</i>	42.60 ± 6.73 <i>b</i>	26.15 ± 2.31 <i>b</i>	4.69 ± 0.85 <i>b</i>	0.75 ± 0.14 <i>a</i>	8.08 ± 2.49 <i>b</i>
rbES087	0.64 ± 0.16 <i>b</i>	42.70 ± 5.27 <i>b</i>	27.96 ± 2.79 <i>b</i>	5.50 ± 0.92 <i>b</i>	0.91 ± 0.20 <i>b</i>	8.91 ± 1.41 <i>b</i>
rbES090	0.50 ± 0.07 <i>a</i>	42.80 ± 4.22 <i>b</i>	23.97 ± 1.73 <i>b</i>	4.90 ± 0.55 <i>b</i>	0.88 ± 0.13 <i>b</i>	7.99 ± 1.47 <i>b</i>
rbES098	0.54 ± 0.05 <i>b</i>	42.30 ± 3.54 <i>b</i>	26.40 ± 2.84 <i>b</i>	5.48 ± 1.15 <i>a</i>	1.02 ± 0.21 <i>b</i>	8.22 ± 2.48 <i>b</i>
Bacillioss	0.51 ± 0.20 <i>a</i>	29.00 ± 6.93 <i>a</i>	12.76 ± 7.10 <i>a</i>	2.34 ± 1.66 <i>a</i>	0.33 ± 0.14 <i>a</i>	3.29 ± 1.90 <i>a</i>

Valores de media ± error estándar en la misma columna, comparación múltiple por el método de Tukey (P= 0.05), letra diferente indica diferencias significativas.

Tabla 14. Evaluación de tres variables que no mostraron diferencias significativas en plantas de tomate inoculadas con aislados bacterianos con características de promoción de crecimiento.

Tratamiento	Variable evaluada		
	Longitud de raíz (cm)	Número de hojas	Número de flores
Control	33.20 ± 2.48 <i>a</i>	6.20 ± 0.83 <i>a</i>	0 ± 0 <i>a</i>
rbES015	27.80 ± 4.14 <i>a</i>	7.80 ± 0.44 <i>a</i>	1.20 ± 1.64 <i>a</i>
rbES061	26.10 ± 6.61 <i>a</i>	7.60 ± 1.51 <i>a</i>	1.80 ± 2.49 <i>a</i>
rbES075	26.80 ± 2.50 <i>a</i>	7.20 ± 1.09 <i>a</i>	1.80 ± 2.48 <i>a</i>
rbES087	28.60 ± 9.07 <i>a</i>	7.40 ± 0.89 <i>a</i>	1.40 ± 1.14 <i>a</i>
rbES090	31.00 ± 7.74 <i>a</i>	8.20 ± 0.83 <i>a</i>	1.80 ± 1.78 <i>a</i>
rbES098	30.80 ± 6.64 <i>a</i>	7.40 ± 0.89 <i>a</i>	1.00 ± 2.23 <i>a</i>
Bacillioss	31.90 ± 7.74 <i>a</i>	6.00 ± 1.00 <i>a</i>	0 ± 0 <i>a</i>

Media ± error estándar en la misma columna, la misma letra indica que no hubo diferencias significativas (P= 0.05).



Figura 11. Resultados de la evaluación en la promoción del crecimiento de aislados bacterianos en plantas de tomate. Fotografías representativas de cada tratamiento, tomadas a los 50 días post-aplicación.

3.9 Evaluación de la actividad antagónica *in planta* de aislados bacterianos contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Seis tratamientos mostraron un incremento significativo en el diámetro de la raíz, cinco de estos no fueron inoculados con las razas del hongo e incluyen al control negativo, y los tratamientos inoculados con los aislados rbES182, rbES245, rbES262 y el producto comercial (Figura 12); además del tratamiento con el aislado rbES262 que fue inoculado con ambas razas del hongo. Para esta variable los tratamientos que mostraron diferencias significativas tuvieron un incremento de un 82.0 % hasta un 114.0 % en el diámetro de la raíz en comparación con el tratamiento que solo fue inoculado con el patógeno (Tabla 15). En cuanto a la variable peso fresco de follaje, el control negativo, y los inoculados con los aislados rbES182, rbES245 y el producto comercial tuvieron un incremento significativo en el peso fresco de las plantas de entre un 102.57 % hasta 128.81 %.

Las plantas inoculadas con los aislados rbES182, rbES245, rbES262 con y sin ambas razas del hongo y el producto comercial mostraron un incremento significativo en el peso de la raíz de hasta un 267.07 % (Tabla 15). En cuanto a los resultados obtenidos al evaluar el peso seco de raíz, las plantas de los tratamientos control, rbES182, rbES245, rbES262 con y sin el hongo tuvieron un incremento significativo en el peso seco de la raíz de hasta un 165.11 % . Los resultados obtenidos para las variables longitud de raíz, número de hojas, número de flores y peso seco de follaje no mostraron diferencias significativas con respecto al control (Tabla16).

Al realizar la comparación de los resultados de las variables longitud de tallo, las plantas inoculadas con la cepa de *Arthrobacter* sp. (rbES331) con y sin ambas razas del hongo, tuvieron una disminución significativa en la longitud del tallo de hasta el 160 % (Tabla 16).

Al concluir este ensayo en la mayoría de los tratamientos la sobrevivencia de las plantas fue del 100 %, sin embargo, aquellos que fueron inoculados con el aislado rbES331 con y sin el hongo, tuvieron porcentajes de sobrevivencia del 66.66 y 33.33 % respectivamente. La muerte de las plantas de estos tratamientos ocurrió entre la segunda y tercera semana de haber iniciado el experimento, por lo que el aislado bacteriano tiene un efecto negativo en el crecimiento de la planta. En casi todos los tratamientos se recuperaron ambas razas del hongo, excepto cuando se inoculó el aislado rbES158 en este caso solo se recuperó la raza 2 (Tabla 17). Con respecto a la sintomatología observada en las plantas infectadas con el *FOL* R1 y R2, en los tratamientos inoculados con el producto comercial, el aislado rbES158, rbES245 y rbES331, las plantas mostraron ligera necrosis radicular (Tabla 18), mientras que aquellas inoculadas con

el aislado rbES182 mostraron necrosis del tallo y los haces vasculares (Tabla 18). Las plantas inoculadas con el aislado rbES262 no mostraron ningún síntoma.

Tabla 15. Evaluación de cinco variables que mostraron diferencias significativas en plantas de tomate inoculadas con aislados bacterianos con actividad antagonista.

Tratamiento	Variables evaluadas				
	Altura de la planta (cm)	Diámetro de tallo (cm)	Peso fresco follaje (g)	Peso seco follaje (g)	Peso seco raíz (g)
Control	35.16 ± 2.06 <i>a</i>	0.51 ± 0.09 <i>b</i>	26.01 ± 5.30 <i>b</i>	5.02 ± 1.14 <i>a</i>	0.89 ± 0.18 <i>b</i>
rbES158	32.25 ± 3.09 <i>a</i>	0.41 ± 0.07 <i>a</i>	19.35 ± 3.63 <i>a</i>	3.79 ± 1.14 <i>a</i>	0.70 ± 0.23 <i>a</i>
rbES182	39.91 ± 3.02 <i>a</i>	0.60 ± 0.08 <i>b</i>	27.58 ± 6.57 <i>b</i>	4.74 ± 0.93 <i>b</i>	0.98 ± 0.21 <i>b</i>
rbES245	36.41 ± 2.39 <i>a</i>	0.55 ± 0.08 <i>b</i>	29.38 ± 5.63 <i>b</i>	5.00 ± 1.20 <i>b</i>	0.82 ± 0.14 <i>b</i>
rbES262	38.08 ± 2.49 <i>a</i>	0.51 ± 0.07 <i>b</i>	23.83 ± 3.25 <i>a</i>	4.25 ± 1.12 <i>b</i>	0.95 ± 0.15 <i>b</i>
rbES331	24.66 ± 19.31 <i>a</i>	0.31 ± 0.24 <i>a</i>	15.80 ± 12.44 <i>a</i>	2.93 ± 2.40 <i>a</i>	0.52 ± 0.42 <i>a</i>
Bacillioss	37.75 ± 2.18 <i>a</i>	0.51 ± 0.04 <i>b</i>	26.93 ± 3.16 <i>b</i>	4.95 ± 0.62 <i>b</i>	0.95 ± 0.17 <i>b</i>
FOL	29.25 ± 4.04 <i>a</i>	0.28 ± 0.09 <i>a</i>	12.84 ± 3.98 <i>a</i>	2.58 ± 0.89 <i>a</i>	0.43 ± 0.21 <i>a</i>
rbES158+FOL	27.08 ± 4.52 <i>a</i>	0.31 ± 0.07 <i>a</i>	11.34 ± 5.42 <i>a</i>	2.09 ± 1.27 <i>a</i>	0.35 ± 0.16 <i>a</i>
rbES182+FOL	30.75 ± 3.18 <i>a</i>	0.41 ± 0.11 <i>a</i>	16.30 ± 3.43 <i>a</i>	3.06 ± 0.83 <i>a</i>	0.61 ± 0.23 <i>a</i>
rbES245+FOL	33.00 ± 4.43 <i>a</i>	0.50 ± 0.08 <i>a</i>	16.77 ± 2.55 <i>a</i>	3.38 ± 0.90 <i>a</i>	0.73 ± 0.13 <i>a</i>
rbES262+FOL	35.91 ± 2.87 <i>a</i>	0.51 ± 0.11 <i>b</i>	24.87 ± 4.05 <i>a</i>	4.79 ± 0.67 <i>b</i>	1.14 ± 0.32 <i>b</i>
rbES331+FOL	11.25 ± 17.63 <i>b</i>	0.11 ± 0.18 <i>a</i>	6.87 ± 11.66 <i>a</i>	1.47 ± 2.54 <i>a</i>	0.23 ± 0.38 <i>a</i>
Bacillioss+FOL	35.83 ± 4.79 <i>a</i>	0.41 ± 0.07 <i>a</i>	19.56 ± 5.57 <i>a</i>	3.68 ± 1.43 <i>a</i>	0.74 ± 0.22 <i>a</i>

Valores de media ± error estándar en la misma columna, comparación múltiple por el método de Tukey (P= 0.05) letra diferente indica diferencias significativas.

Tabla 16. Evaluación de cuatro variables que no mostraron diferencias significativas en plantas de tomate inoculadas con aislados bacterianos con actividad antagonista.

Tratamiento	Variables evaluadas			
	Longitud de raíz (cm)	Número de hojas	Número de flores	Peso fresco raíz (g)
Control	28.41 ± 1.35 <i>a</i>	7.50 ± 0.54 <i>a</i>	0.66 ± 0.51 <i>a</i>	6.59 ± 1.28 <i>a</i>
rbES158	32.00 ± 3.52 <i>a</i>	7.00 ± 0.89 <i>a</i>	0.33 ± 0.81 <i>a</i>	6.30 ± 1.93 <i>a</i>
rbES182	36.50 ± 9.24 <i>a</i>	7.00 ± 0.89 <i>a</i>	1.83 ± 1.72 <i>a</i>	9.03 ± 2.58 <i>a</i>
rbES245	34.66 ± 6.34 <i>a</i>	6.83 ± 0.40 <i>a</i>	0.16 ± 0.40 <i>a</i>	7.23 ± 1.51 <i>a</i>
rbES262	32.33 ± 6.34 <i>a</i>	6.83 ± 0.98 <i>a</i>	1.66 ± 1.50 <i>a</i>	8.12 ± 1.33 <i>a</i>
rbES331	22.83 ± 18.80 <i>a</i>	4.66 ± 3.66 <i>a</i>	0.83 ± 1.32 <i>a</i>	4.87 ± 4.38 <i>a</i>
Bacillioss	33.58 ± 5.67 <i>a</i>	6.5 ± 1.22 <i>a</i>	2.33 ± 2.06 <i>a</i>	8.38 ± 1.85 <i>a</i>
FOL	31.83 ± 4.96 <i>a</i>	5.50 ± 1.51 <i>a</i>	0 ± 0 <i>a</i>	2.46 ± 1.12 <i>a</i>
rbES158+FOL	42.50 ± 15.17 <i>a</i>	5.50 ± 1.37 <i>a</i>	0 ± 0 <i>a</i>	2.28 ± 1.02 <i>a</i>
rbES182+FOL	44.33 ± 7.08 <i>a</i>	6.83 ± 1.69 <i>a</i>	1.16 ± 1.60 <i>a</i>	4.37 ± 2.03 <i>a</i>
rbES245+FOL	37.83 ± 4.19 <i>a</i>	6.50 ± 1.04 <i>a</i>	1.16 ± 1.47 <i>a</i>	5.07 ± 1.50 <i>a</i>
rbES262+FOL	37.00 ± 7.58 <i>a</i>	7.50 ± 1.97 <i>a</i>	1.66 ± 2.25 <i>a</i>	8.63 ± 3.03 <i>a</i>
rbES331+FOL	10.08 ± 15.64 <i>a</i>	2.66 ± 4.13 <i>a</i>	0.16 ± 0.40 <i>a</i>	1.63 ± 2.71 <i>a</i>
Bacillioss+FOL	40.58 ± 10.40 <i>a</i>	6.83 ± 0.98 <i>a</i>	2.66 ± 1.63 <i>a</i>	6.20 ± 2.16 <i>a</i>

Valores de media ± error estándar en la misma columna, comparación múltiple por el método de Tukey (P= 0.05) letra diferente indica diferencias significativas.

Tabla 17. Reporte de los microorganismos recuperados de las plantas del ensayo donde se evaluó la actividad antagonista de diferentes aislados bacterianos.

Tratamiento	Microorganismo		
	Bacteria	FOL _{R1}	FOL _{R2}
Control	-	-	-
rbES158	-	-	-
rbES182	+	-	-
rbES245	+	-	-
rbES262	+	-	-
rbES331	-	-	-
Bacillioss	+	-	-
FOL	-	+	+
rbES158+FOL	-	-	+
rbES182+FOL	+	+	+
rbES245+FOL	+	+	+
rbES262+FOL	+	+	+
rbES331+FOL	-	+	+
Bacillioss+FOL	+	+	+

+ microorganismo recuperado, - microorganismo no recuperado

Tabla 18. Síntomas observados en plantas de tomate del ensayo donde se evaluó la actividad antagonista de diferentes aislados bacterianos.

Tratamiento	Síntomas observados			
	Amarillamiento de hojas	Necrosis en raíz	Necrosis en tallo	Necrosis de haces vasculares (C)
Control	-	-	-	-
rbES158	-	-	-	-
rbES182	-	-	-	-
rbES245	-	-	-	-
rbES262	-	-	-	-
rbES331	-	-	-	-
Bacillioss	-	-	-	-
FOL	+	+	+	+
rbES158+FOL	-	+	-	+
rbES182+FOL	-	-	+	-
rbES245+FOL	-	+	-	-
rbES262+FOL	-	-	-	-
rbES331+FOL	-	+	-	-
Bacillioss+FOL	-	+	-	-

+ síntomas observados, - sin síntomas



Figura 12. Plantas de tomate representativas de los diferentes tratamientos del ensayo de antagonismo. Las fotografías se tomaron 60 después del trasplante.

Capítulo 4. Discusión

En este trabajo se aislaron PGPR del arbusto endémico *Solanum hindsianum*, una planta que crece en condiciones áridas y cálidas (Rebman y Roberts, 2012), con la idea de que los aislados estarían adaptados a las condiciones climáticas del Estado de Baja California. La planta pertenece a la familia botánica Solanaceae a la cual también pertenecen plantas de importancia agrícola como el chile y el tomate, siendo este último cultivo la principal hortaliza que se produce en el estado de Baja California (SIAP, 2018a). La relación botánica entre esta planta nativa y el tomate supuso que de identificar PGPR asociadas a la planta silvestre los aislados tendrían una mayor oportunidad de establecerse en la rizósfera de plantas de tomate y promover su crecimiento. Ya anteriormente se habían aislado cepas de hongos micorrízicos de este arbusto (Torres-Chavez, 2018); por lo que esta planta resulta una fuente de microorganismos para usarse en cultivos comerciales.

Las PGPR pueden promover el crecimiento de las plantas mediante dos mecanismos de acción, de manera directa, mejorando su nutrición y de manera indirecta actuando como agentes de biocontrol, suprimiendo el daño causado por microorganismos fitopatógenos (Glick, 1995; Avis et al., 2008). En algunos estudios se ha reportado que las PGPR de los géneros *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, entre otros, pueden presentar ambos mecanismos de acción (Ahman, 2008; Martínez-Viveros et al., 2010; Panpatte et al., 2016; Singh et al., 2017b). Otras PGPR pueden mostrar un solo mecanismo, tal es el caso de cepas del género *Azospirillum*, las cuales promueven el crecimiento de la planta de manera directa a través de la fijación de nitrógeno, solubilizando fósforo y por la producción de fitohormonas como ácido indol acético (AIA), giberelinas y citocininas (El Zemran et al., 2007; García et al., 2017; Coniglio et al., 2019). En este trabajo, la mayoría de las cepas nativas identificadas presentaron un mecanismo de acción dominante. Así, los seis aislados pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Pseudomonas*, que promovieron el crecimiento de plantas de tomate, aunque mostraron capacidad de producir quitinasas y sideróforos, no tuvieron actividad antagónica contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 1. Por otro lado, las ocho cepas de los géneros *Arthrobacter*, *Bacillus* y *Streptomyces*, tuvieron como mecanismo dominante la actividad antagónica, aunque presentaron al menos un mecanismo para mejorar la disponibilidad de nutrientes y producción de AIA.

Entre los aislados que mostraron tener ambos mecanismos de acción se encuentran el *Bacillus* sp. rbES182 y *B. subtilis* rbES232, que producen AIA, solubilizan fósforo, potasio y zinc, tiene actividad de la ACC-desaminasa e inhiben el crecimiento de seis diferentes hongos fitopatógenos. Las cepas del género *Bacillus* son usadas ampliamente en agricultura debido a su actividad antagónica sobre diversos microorganismos

fitopatógenos, por su capacidad de facilitar la adquisición de nutrientes, producción de fitohormonas y de metabolitos secundarios, además muestran capacidad de producir endosporas, las cuales les permite resistir condiciones ambientales desfavorables (McKenney et al., 2013; Radhakrishnan et al., 2017).

La producción de AIA es una de las características más evaluadas en las PGPR, debido al efecto de esta fitohormona en el desarrollo del sistema radicular que incluye el incremento en la longitud de la raíz y la formación de pelos absorbentes (Rasul et al., 1998; Cassán et al., 2014). Diversos géneros, entre los que se incluyen *Bacillus*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Serratia* y *Klebsiella*, han mostrado la habilidad de producir AIA a partir del triptófano exudado por las raíces de las plantas (Kang., 2019; Castillo et al., 2015; Asaf et al., 2017; Bhardwaj et al., 2017; Sharma et al., 2017). En este trabajo se cuantificó la producción de esta fitohormona para 20 aislados. La mayor cantidad de AIA fue producida por el aislado *Pseudomonas* sp. rbES098 con 98.08 mg/mL, superior a la cepa *P. fluorescens* Ps₉ que produjo 22.02 mg/mL con la misma cantidad de triptófano en el medio (Ahman et al., 2008). En otro trabajo realizado por Chaudry et al., (2016), suplementando el medio de cultivo con 2 mg/mL de triptófano, identificaron aislados que producían hasta 147.06 mg/mL (*Serratia liquefaciens*); la mayor cantidad de AIA producido por esta cepa se atribuye a que en el medio había cuatro veces más triptófano. Adicionalmente, se ha reportado que las PGPR pueden producir otras fitohormonas como giberelinas, citocininas y ácido abscísico (Maheshwari et al., 2015), lo cual no fue determinado en este trabajo y se propone como trabajo a futuro.

Cepas de los géneros *Acitenobacter*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Streptomyces* entre otros, han sido empleados ampliamente como agentes de biocontrol (Siddiqui, 2005; Ahmad et al., 2008; Dinesh et al., 2015; Kumari y Upadhyay, 2018). Se ha demostrado que las PGPR tienen un amplio espectro de biocontrol, ya que pueden inhibir el daño causado por bacterias, hongos y nematodos fitopatógenos. Sin embargo, en la mayoría de los ensayos realizados bajo condiciones *in vitro* las PGPR se evalúan contra un solo microorganismo fitopatógeno. En menor número de trabajos se ha evaluado el amplio espectro de control de las PGPR, en uno de ellos se reporta que bacterias del género *Bacillus* y *Pseudomonas* tienen actividad antagónica contra al menos diez patógenos, entre los que se incluyen *F. oxysporum*, *F. solani* y *Rhizoctonia solani* (Ali et al., 2019). Por otro lado, diversas cepas de *Bacillus velezensis* inhiben el crecimiento de ocho diferentes fitopatógenos (seis hongos y dos bacterias) (Liu et al., 2017); y bacterias de los géneros *Ochrobactrum* y *Bacillus* inhiben el crecimiento de los hongos fitopatógenos *Sclerotinia minor*, *S. rolfsii*, *Fusarium verticilloides*, *F. solani*, *F. prooliferatum* y *F. graminearum* (Príncipe et al., 2007). En este trabajo se demostró que ocho aislados nativos tienen un amplio espectro

de biocontrol *in vitro*, inhibiendo el crecimiento de seis diferentes hongos fitopatógenos. Sin embargo, es necesario realizar ensayos en planta para proponerlas como agentes de biocontrol de amplio espectro.

El proceso de selección de las PGPR se realiza mediante la evaluación de los aislados en diversas pruebas en condiciones *in vitro*, sin embargo, se ha observado que los resultados obtenidos del proceso de selección en ocasiones no indican la capacidad de promover el crecimiento en las plantas, además el número de mecanismos de acción determinados en estas condiciones tampoco garantiza la efectividad de los aislados, la manera de asegurar el efecto de estas PGPR es mediante la evaluación sobre la plantas (Smyth et al., 2011; Kundan et al., 2015; Akinrinlola et al., 2018). Los seis aislados seleccionados para evaluar la promoción del crecimiento en planta dieron resultados positivos en al menos cuatro de las pruebas realizadas, siendo los aislados *Pseudomonas* sp. rbES061 y el *Pseudomonas* sp. rbES087, los que mostraron seis mecanismos de acción incluida la producción de AIA. Adicionalmente el aislado *Paenibacillus* sp. rbES075 promovió el 100 % de germinación de la semilla de tomate en el menor tiempo. Considerando los resultados de las pruebas *in vitro* no se observó correlación con los niveles de AIA producidos y su efecto en la promoción del crecimiento. Por ejemplo, el aislado *Pseudomonas* sp. rbES098, que produjo la mayor cantidad de AIA no tuvo el mayor porcentaje de germinación en menor tiempo, ni un mayor incremento en el peso y longitud de la planta. Aún con ello los resultados obtenidos mostraron que las plantas inoculadas con los seis aislados bacterianos tuvieron un incremento en el diámetro de tallo, longitud, peso fresco y seco la planta. Con base en los resultados, los aislados de *Pseudomonas* sp. rbES807 y *Pseudomonas* sp. rbES090 fueron los mejores aislados para usarse como biofertilizantes en el cultivo de tomate.

Al evaluar la actividad antagónica de los cinco aislados seleccionadas, se observó que todos inhibieron el crecimiento de *FOL* bajo condiciones *in vitro*, pero en plantas, sólo las inoculadas con el aislado *Bacillus* sp. rbES262 mostraron menor daño causado por *FOL*. Además, mostraron un incremento significativo en el peso fresco y seco de la raíz, así como en el diámetro del tallo con respecto a las plantas inoculadas con los patógenos. El incremento obtenido fue del 185%, 265% y 182 %, respectivamente. Incluso el efecto obtenido por este aislado fue mejor que el biofungicida comercial Bacillios. Adicionalmente, en estas plantas no se observaron síntomas característicos de la enfermedad como amarillamiento de hojas, necrosis de tallo o necrosis de haces vasculares. Por lo que se concluye que *Bacillus* sp. rbES262 fue la mejor cepa para usarse en el control de *FOL* en tomate.

Al comparar los resultados de la actividad antagónica bajo condiciones *in vitro* e *in planta*, no hubo correlación en los resultados, dado que la cepa *B. subtilis* rbES245 que mostró los mayores porcentaje de

inhibición *in vitro* de 68.42% contra la raza 1 y 76.71% contra la raza 2, no fue la que presentó mejor efecto en los ensayos *in planta*; como se mencionó antes esto correspondió a la cepa *Bacillus* sp. rbES262, que mostró porcentajes de inhibición del 45.99 % contra la raza 1 y 46.57% sobre la raza 2. Esto era de esperarse porque las cepas de biocontrol tienen varios mecanismos, aquí se observó que la mayoría de los aislados actúa compitiendo por espacio, otros producen sideróforos y algunos de ellos podrían estar sintetizando antibióticos.

Como agentes de biocontrol contra *Fusarium* se han reportado cepas de varios géneros, las cuales tienen diferentes mecanismos de acción, tal es el caso de una cepa de *Bacillus subtilis* que disminuye el daño causado por *FOL* en plantas de tomate mediante la activación de la resistencia sistémica inducida y por la producción de compuestos fenólicos (Loganathan et al., 2014). Mientras que *Brevibacillus brevis* Nagano tiene como mecanismo de acción la producción de sustancias con efecto antifúngico que reducen la germinación de esporas (Chandel et al., 2009). Por ello es probable que existan otros mecanismos en las cepas identificadas en este trabajo que ayuden a inhibir el daño causado por *FOL*, como la producción de enzimas líticas, la producción de moléculas con efecto antibiótico e incluso la activación de la respuesta sistémica inducida en la planta. En trabajos a futuro se puede determinar si la cepa *Bacillus* sp. rbES262 produce metabolitos secundarios con efecto antifúngico realizando ensayos con la técnica de difusión en agar de los extractos de la bacteria (Báez-Vallejo, 2018), y determinar si activa la respuesta sistémica inducida mediante un análisis de expresión de genes usando la técnica de RTq-PCR o un análisis Western Blot (Wang et al., 2009; Niu et al., 2016).

En la interacción planta-PGPR, también puede haber interacciones negativas, por ejemplo, las bacterias pueden producir sustancias fitotóxicas, como ácido cianhídrico (HCN) o etileno, que influyan negativamente en el crecimiento y la fisiología del hospedero (Wipps, 2001; Bhattacharyya y Jhan, 2011). Aquí observamos una interacción negativa entre las plantas de tomate y los aislados *S. luteovorticillatus* rbES158 y *Arthrobacter* sp. rbES331, los cuales causaron una disminución en el crecimiento de la planta e incluso la muerte de algunas. Ambos aislados no mostraron la producción de HCN, por lo que este efecto negativo se atribuye a la producción de metabolitos secundarios con efecto herbicida, considerando que ambas cepas pertenecen al Phylum Actinobacteria (Harir et al., 2018), sería interesante determinar qué tipo de molécula producen y conocer si la molécula con actividad antagónica hacia hongos es diferente a la que causa daño a las plantas. Dependiendo del resultado se podría usar la bacteria o la molécula producida en la formulación de herbicidas.

Considerando que las PGPR seleccionadas en este trabajo presentan un mecanismo dominante, para incrementar su potencial debe explorarse el diseño de consorcios de aislados con diferentes mecanismos de acción, ya que se ha observado que la sinergia puede derivar en una mejora en la nutrición de la planta y un amplio espectro de acción contra fitopatógenos (Janisiewicz, 1996; Nakkeeran et al., 2005; Domenech et al., 2006; Liu et al., 2016; Verma et al., 2018).

La efectividad de los microorganismos para promover el crecimiento de las plantas está relacionada con la capacidad para adaptarse y crecer en las condiciones del lugar donde se aplican (Díaz-Vargas et al., 2001; Dutta y Podile, 2010). El uso en cultivos agrícolas de PGPR nativas incrementaría la efectividad de los aislados para promover el crecimiento de las plantas debido a que estas bacterias tienen una mayor capacidad para adaptarse (Verma et al., 2018; Zahid et al., 2015). Además, son una alternativa para reducir la aplicación de fertilizantes y pesticidas y disminuir la contaminación al ambiente y los riesgos a la salud humana (Keikothaile y Spanoghe, 2011; Pankat et al., 2020). Productos comerciales formulados con cepas exóticas han presentado una baja efectividad al aplicarse, lo cual se atribuye a los problemas de los microorganismos para sobrevivir en suelos locales debido a las diferentes condiciones (Bashan, 1998; Calvo et al., 2010). Las PGPR nativas identificadas en este trabajo, podrían usarse en otras plantas de importancia agrícola en el estado de Baja California como chile, esparrago, fresa, vid, entre otros, ya que se ha reportado que este tipo de microorganismos pueden establecer simbiosis con diferentes plantas debido a su capacidad de adaptación (Drogue et al., 2012). Este trabajo contribuye al conocimiento de la diversidad de bacterias presentes en la península de Baja California y resalta su potencial para ser usadas como biocontroladores y biofertilizantes en tomate.

Capítulo 5. Conclusiones

- Se obtuvieron 343 aislados bacterianos de la rizósfera de *Solanum hindsianum*, 18 mostraron características asociadas a la promoción de crecimiento y 44 actividad antagónica.
- Los protocolos de selección seguidos en este trabajo permitieron la identificación de doce aislados bacterianos con potencial en la promoción de crecimiento y nueve con actividad antagónica. De esos se seleccionaron los mejores para evaluar su efecto en plantas de tomate.
- Dos aislados *Pseudomonas* sp. rbES087 y *Pseudomonas* sp. rbES090, mostraron la mayor capacidad de promover el crecimiento en plantas de tomate. Las plantas mostraron un incremento en la longitud y peso de raíz, altura y peso de follaje.
- Dos aislados de Actinobacterias, *Streptomyces luteoverticillatus* rbES158 y *Arthrobacter* sp. rbES331 afectaron el crecimiento de plantas de tomate, favoreciendo el daño causado por *Fusarium*.
- El aislado *Bacillus* sp. rbES262 fue el que mostró mejor actividad antagónica contra *FOL*, superando al producto comercial, por lo que podría utilizarse para el control de la marchitez vascular en plantas de tomate.

Literatura citada

- Agrawal, T., Kotashane, S.A. 2012. Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from diferente geographical locations of Chhattisgarh in Central India. Springer Plus, 1 (1), 73. doi: 10.1186/2193-1801-1-73
- Aguirre-Garrido, J.F., Montiel-Lug, D., Hernández-Rodríguez, C., Torres-Cortés, G., Millán, V., Toro, N., Martínez-Abarca, F., Ramírez-Saad, H. 2012. Bacterial community structure in the rhizosphere of three cactus species from semi-arid highlands in central Mexico. *Antonie van Leeuwenhoek*, 101, 891–904. doi: <https://doi.org/10.1007/s10482-012-9705-3>
- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M. S. 2008. Screening of free-living rhizosferic bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163, 173–181. doi: 10.1016/j.micres.2006.04.001.
- Akinrinlola, R. J., Yuen, G.Y., Drijber, R. A., Adesemoye, A. O. 2018. Evaluation of Bacillus Strains for Plant Growth Promotion and Predictability of Efficacy by In Vitro Physiological Traits. *International Journal of Microbiology*, 53, 1–11. doi:10.1155/2018/5686874
- Ali, S., Hameed, S., Shahid, M., Iqbal, M., Lazarovits, G., Imran, A. 2019. Functional Characterization of Potential PGPR Exhibiting Broad-spectrum Antifungal activity. *Microbiological Research*, 232, 126389. doi:10.1016/j.micres.2019.126389
- Ambrosini, A., Passagli, L. M. 2017. Plant growth-promoting bacteria (PGPB): Isolation and screening of PGP activities. *Current Protocols in Plant Biology*, 12 (2), 190-209. doi: 10.1002/pb.20054
- Antoun, H., Prévost, D. 2006. Ecology of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. En: Siddiqui, Z.A (Ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Springer, Netherlands. (pp. 1-38).
- Armenta-López, S. E. 2013. Caracterización de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* agente causal de la marchitez vascular del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Baja California. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 70 pp.
- Asaf, S., Khan, M. A., Khan, A. L., Waqas, M., Shahzad, R., Kim, A. Y., Kang, S. M., Lee, I.-J. 2017. Bacterial endophytes from arid land plants regulate endogenous hormone content and promote growth in crop plants: an example of *Sphingomonas* sp. and *Serratia marcescens*. *Journal of Plant Interactions*, 12(1), 31–38. doi:10.1080/17429145.2016.1274060
- Avis, T. J., Gravel, V., Antoun, H., Tweddell, R. J. 2008. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(7), 1733–1740. doi:10.1016/j.soilbio.2008.02.013
- Báez-Vallejo, N. 2018. Evaluación de actividad antifúngica de aislados bacterianos asociados a la filósfera y a la rizósfera de *Cinnamomun effusum*, *Nectandra salcifolia* y *Ocotea psychotrioides*. Tesis de Maestria en Ciencias. Instituto de Ecología A.C. 78 pp.
- Baldani, J.I., Reis, V. M., Videira, S. S., Boddey, L. H., Divan-Baldani, V. L. 2014. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and Soil*, 384: 413-431. doi: <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2186-6>

- Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, 16 (4), 729-770. doi: [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(98\)00003-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(98)00003-2)
- Bates, S. T., Farruggia, F., Gilbert, E., Gutierrez, R., Jenke, D., Makings, E., Manton, E., Newton, D., Landrum, L.R. 2009. Vascular Plants of Arizona: Solanaceae Part Two: Key to the Genera and *Solanum* L. *Canotia*, 5 (1), 1-16
- Berg, G. 2009. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84 (1), 11–18. doi:10.1007/s00253-009-2092-7
- Bhardwaj, G., Shah, R., Joshi, B., Patel, P.2017. *Klebsiella pneumoniae* VRE36 as a PGPR isolated from *Saccharum officinarum* cultivar Co99004. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 5 (01): 47-52. doi: 10.7324/JABB.2017.50108
- Bhattacharyya, P.N., Jha, D.K. 2011. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence un agriculture. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 28 (4), 1327-1350. doi: <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>
- Blancard, D. 2018. *Tomato diseases: Identification, biology and control*. (2da ed). Elsevier, Barcelona.
- Botelho, G.R., Mendonça-Hagler, L.C. 2006. Fluorescent Pseudomonads associated with the rhizosphere of crops: an overview. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(4), 401-416. doi:10.1590/s1517-83822006000400001
- Calvo, P., Ormeño-Orrillo, E., Martínez-Romero, E., Zúñiga, D. 2010. Characterization of Bacillus isolates of potato rhizosphere from andean soils of Peru and their potential PGPR characteristics. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), 899–906. doi:10.1590/s1517-83822010000400008
- Carrillo-Fasio, J. A., Montoya-Rodríguez, T. de J., García-Estrada, R. S., Cruz-Ortega, J. E., Márquez-Zequera, I., Sañudo-Barajas, A. J. 2003. Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder y Hansen, en Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el Valle de Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21 (2), 123-127.
- Cassán, F., Vanderleyden, J., Spaepen, S. 2014. Physiological and Agronomical Aspects of Phytohormone Production by Model Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Belonging to the Genus *Azospirillum*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 33, 440–459. doi: <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9362-4>
- Castillo, P., Molina, R., Andrade, A., Vigliocco, A., Alemano, S., Cassán, F.D. 2015. Phytohormones and Other Plant Growth Regulators Produced by PGPR: The Genus *Azospirillum*. En Cassán, F., Okon, Y., Creus, C. (Eds), *Handbook for Azospirillum*. Springer, Cham. (pp: 115–138).
- Chandel, S., Allan, E.J., Woodward, S. 2009. Biological Control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* on Tomato by *Brevibacillus brevis*. *Journal of Phytopathology*, 158(7-8), 470–478. doi:10.1111/j.1439-0434.2009.01635.x
- Chaudry, M. Z., Naz, A. U., Nawaz, A., Mukhtar, H., Irfan-Ul-Haq, H. 2016. Colonization of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on two different root systems. *Pakistan Journal of botany*, 48(4): 1691-1696

- Coniglio A., Mora V., Puente M., Cassán F. 2019. *Azospirillum* as Biofertilizer for Sustainable Agriculture: *Azospirillum brasilense* AZ39 as a Model of PGPR and Field Traceability. En: Zúñiga-Dávila D., González-Andrés F., Ormeño-Orrillo E. (Eds), Microbial Probiotics for Agricultural Systems. Sustainability in Plant and Crop Protection. Springer, Cham. (pp: 47-70).
- Corrales-Ramírez, L. C., Sánchez-Leal, L. C., Arévalo-Galvez, Z. Y., Moreno-Burbano, V. E. 2014. *Bacillus*: género bacteriano que demuestra ser un importante solubilizador de fosfato. *Nova*, 12(22), 165-178.
- Díaz-Vargas, P., Ferrera-Cerrato, R. Almaraz-Suarez, J.J., Alcántara-González, G. 2001. Inoculación de bacterias promotoras del crecimiento en lechuga. *Terra Latinoamericana*, 19(4), 327-335.
- Dinesh, R., Anandaraj, M., Kumar, A., Bini, Y. K., Subila, K. P., Aravind, R. 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. doi:10.1016/j.micres.2015.01.014
- Domenech, J., Reddy, M. S., Kloepper, J.W., Ramos, B., Gutierrez-Mañero, J. 2006. Combined Application of the Biological Product LS213 with *Bacillus*, *Pseudomonas* or *Chryseobacterium* for Growth Promotion and Biological Control of Soil-Borne Diseases in Pepper and Tomato. *Biocontrol*, 51(2), 245–258. doi:10.1007/s10526-005-2940-z
- Dutta, S., Podile, A.R. 2010. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): the bugs to debug the root zone. *Critical Reviews in Microbiology*, 36(3), 232–244. doi: 10.3109/10408411003766806
- Drogue, B., Doré, H., Borland, S., Wisniewski-Dyé, F., Prigent-Combaret, C. 2012. Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants? *Research in Microbiology*, 163(8), 500–510. doi:10.1016/j.resmic.2012.08.006
- Dworkin M., Foster J.W. 1958. Experiments with some microorganisms which utilize Ethane and Hydrogen. *Journal Bacteriology*: 75(5): 592–603.
- El Zemrany, H., Czarnes, S., Hallett, P.D., Alamercury, S., Bally, R., Jocteur Monzozier, J. 2007. Early changes in root characteristics of maize (*Zea mays*) following seed inoculation with the PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1. *Plant and Soil*, 291 (1-2), 109–118. doi: <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9178-0>
- FAOSTAT. 2017. Cultivos. Consultado el 1 de junio de 2019, de: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>
- Felger, R.S. 2000. Flora of the Gran desierto y Río Colorado of northwest Mexico. The Arizona board and reagents. University of Arizona Press, United States of America.
- Fernández-Herrera E., Guerrero-Ruiz, J.C., Rueda-Puente, E.O., Acosta-Ramos, M. 2013. Patógenos y síntomas asociados a la marchitez del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Texcoco México. *Biotécnia* 15(3), 46-50. doi: 10.18633/bt.v15i3.157
- Fernández-Larrea, O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas*, 62, 96-100.

- Galaviz-Bustamante, M.C. 2015. Cambios en la estructura de la comunidad bacteriana de la rizósfera de mezquite amargo (*Prosopis articulata* S. Watson) por la inoculación con la bacteria promotora de crecimiento en plantas *Bacillus pumilis* ES4. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigaciones de Ciencias Biológicas del Noroeste, Baja California Sur. 57 pp.
- García-Estrada, R., Valenzuela, G. 2011. Marchitez del tomate y pudrición de la corona y raíz. En: Castellanos, J.Z (Ed), Manual de producción de tomate en invernadero. Intagri, México. (pp. 349-356).
- García, J.E., Maroniche, G., Creus, C., Suárez-Rodríguez, R., Ramírez-Trujillo, J.A., Groppa, M. D. 2017. *In vitro* PGPR properties and osmotic tolerance of different *Azospirillum* native strains and their effects on growth of maize under drought stress. *Microbiological Research*, 202, 21–29. doi:10.1016/j.micres.2017.04.007
- Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41(2), 109–117. doi:10.1139/m95-015
- Glick, B.R. 2012. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*, 2012, 1-15. doi: <https://doi.org/10.6064/2012/963401>
- Gordon, S.A., Weber, R.P. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology*. 26 (1):192-195. doi: 10.1104/pp.26.1.192
- Goudjal, Y., Zamoum, M., Sabaou, N., Mathieu, F., Zitouni, A. 2016. Potential of endophytic *Streptomyces* spp. for biocontrol of *Fusarium* root rot disease and growth promotion of tomato seedlings. *Biocontrol Science and Technology*, 26(12), 1691–1705. doi:10.1080/09583157.2016.1234584
- Govindasamy, V., Senthilkumar, M., Mageshwaran, V., Annapurna, K. 2009. Detection and Characterization of ACC Deaminase in Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Journal Plant Biochemistry. Biotechnology*, 18 (1), 71–76. doi: <https://doi.org/10.1007/BF03263298>
- Grandillo, S., Zamir, D., Tanksley, S.D. 1999. Genetic improvement of processing tomatoes: A 20 years perspective. *Euphytica*, 110 (2), 85–97. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1003760015485>
- Gupta G., Parihar, S. S., Ahirwar, N. K., Snehi, S. K., Singh, V. 2015. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *Journal of Microbiology Biochemical and Technology*, 7 (2), 96- 102. doi: 10.4172/1948-5948.1000188
- Hamon, M.A., Lazazzera, B. A. 2002. The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 42(5), 1199–1209. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02709.x
- Harir, M., Bendif, H., Bellahcene, M., Fortas, Z., Pogni, R. 2018. *Streptomyces* Secondary Metabolites. *Basic Biology and Applications of Actinobacteria*. En Enany, S. (Ed), *Basic Biology and Applications of Actinobacteria*. IntechOpen, Londres. (pp 99-122).
- Hartmann, A., Schmid, M., Van Tuinen, D., Berg, G. 2009. Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil*, 321 (1), 235–257. doi: 10.1007/s11104-008-9814-y

- INEGI. 2017. Anuario estadístico y geográfico de Baja California 2017. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. p. 423.
- Jacobsen, C. S. 1997. Plant protection and rhizosphere colonization of barley by seed inoculated herbicide degrading *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* DBO1(pRO101) in 2,4-D contaminated soil. *Plant and Soil*, 189 (1), 139–144. doi: 10.1023/A:1004296615446
- Janisiewicz, W. 1996. Ecological diversity, niche overlap, and coexistence of antagonists used in developing mixtures for biocontrol of postharvest diseases of apples. *Biological Control*, 86(5), 476-479.
- Jeyaseelan, E.C., Tharmila, S. Niranjana, K. 2012. Antagonistic activity of *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. against *Pythium aphanidermatum* isolated from tomato damping off. *Archives of Applied Science Research*, 4 (4),1623-1627.
- Kang, S.-M.; Khan, A.L.; Waqas, M.; Asaf, S.; Lee, K.-E.; Park, Y.-G.; Kim, A.-Y.; Khan, M.A.; You, Y.-H.; Lee, I.-J. 2019. Integrated phytohormone production by the plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus tequilensis* SSB07 induced thermotolerance in soybean. *Journal of Plant Interactions*, 14 (1), 416–423. doi: 10.1080/17429145.2019.1640294
- Kaymak, H.C. 2010. Potential of PGPR in Agricultural Innovations. En: Maheshwari, D. K. (Ed.), *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*. Springer, Heidelberg. (pp. 45–79).
- Keikothaile, M., B., y Spanoghe, P. 2011. Pesticide Residues in Fruits and Vegetables. En: Stoytcheva, M. (Ed), *Pesticides, Formulations, Effects, Fate*. Consultado el 10 de julio de 2020, de <https://www.intechopen.com/books/pesticides-formulations-effects-fate/pesticide-residues-in-fruits-and-vegetables>
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., Hopwood, D.A. 2000. *Practical Streptomyces genetics*. The John Innes Foundation, Norwich.
- Komal R., Kalavati P. 2018. Isolation and screening of zinc mobilizing microorganisms from rhizospheric soil. *Paripex Indian Journal of Research*, 7 (4), 58-60. doi: <https://www.doi.org/10.36106/paripex>
- Kumari, P., Meena, M., & Upadhyay, R. S. 2018. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) isolated from the rhizosphere of *Vigna radiata* (mung bean). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 155–162. doi:10.1016/j.bcab.2018.07.029
- Kundan, R., Pant, G., Jadon, N., Agrawal, P.K. 2015. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Mechanism and Current Prospective. *Journal of Fertilizers y Pesticides*, 6(2), 155- 164. doi:10.4172/2471-2728.1000155
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. En: Stackebrandt, E., Goodfellow, M., (Eds), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons, New York. (pp. 115-175).
- Liu, K., Garrett, C., Fadamiro, H., Kloepper, J.W. 2016. Antagonism of black rot in cabbage by mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *BioControl*, 61(5), 605–613. doi:10.1007/s10526-016-9742-3
- Liu, K., Newman, M., McInroy, J.A., Hu, C.-H., Kloepper, J.W. 2017. Selection and Assessment of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria for Biological Control of Multiple Plant Diseases. *Phytopathology*, 107(8), 928–936. doi:10.1094/phyto-02-17-0051-r

- Liu, K., McInroy, J. A., Hu, C.H., Kloepper, J.W. 2018. Mixtures of Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria Enhance Biological Control of Multiple Plant Diseases and Plant-Growth Promotion in the Presence of Pathogens. *Plant Disease*, 102(1), 67–72. doi:10.1094/pdis-04-17-0478-re
- Loganathan, M., Garg, R., Venkataravanappa, V., Saha, S., Rai, A. B. 2014. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) induces resistance against *Fusarium* wilt and improves lycopene content and texture in tomato. *African Journal of Microbiology Research*, 8(11), 1105–1111. doi:10.5897/ajmr2013.5653
- Lorck, H. 1948. Production of Hydrocyanic Acid by Bacteria. *Physiologia Plantarum*, 1(2), 142–146. doi:10.1111/j.1399-30541948.tb07118.x
- Maheshwari D.K., Dheeman S., Agarwal M. 2015. Phytohormone-Producing PGPR for Sustainable Agriculture. En: Maheshwari D. (Ed), *Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem. Sustainable Development and Biodiversity*, Springer, Cham. Pp 152-182
- Mapelli, F., Marasco, R., Rolli, E., Barbato, M., Cherif, H., Guesmi, A., Ouzari, I., Daffonchio D., Borin, S. 2013. Potential for Plant Growth Promotion of Rhizobacteria Associated with *Salicornia* Growing in Tunisian Hypersaline Soils. *BioMed Research International*, 2013, 1–13. doi:10.1155/2013/248078.
- Marasco, R., Rolli, E., Fusi, M., Cherif, A., Abou-Hadid, A., El- Bahairy, U., Borin, S., Sorlini, C., Daffonchio, D. 2013. Plant growth promotion potential is equally represented in diverse grapevine root-associated bacterial communities from different biopedoclimatic environments. *BioMed Research International*, 2013, 1-17.
- Martínez-Viveros, O., Jorquera, M., Crowley, D., Gajardo, G., Mora, M. 2010. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10(3), 293-319. doi:10.4067/s0718-95162010000100006
- Meservey, A., Sullivan, A., Wu, C., Lantos, P.M. 2020. *Staphylococcus sciuri* peritonitis in a patient on peritoneal dialysis. *Zoonoses Public Health*, 67 (1):93–95. doi: 10.1111/zph.12664.
- McKenney, P., Driks, A., Eichenberger, P. 2013. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology* 11, 33–44. doi: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2921>
- Montiel-Arroyo, N., Correa-López, A. de J., Catalán-Heverástico, C., Pereyda-Hernández, J. 2016. Agroquímicos en la producción de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) en la comunidad de Olea, Guerrero, México. *Foro de Estudios sobre Guerrero*, 2(3), 43-47.
- Nakkeeran, S., Fernando, W.G.D., Siddiqui, Z.A. 2005. Plant Growth Promoting Rhizobacteria Formulations and its Scope in Commercialization for the Management of Pests and Diseases. En: Siddiqui, Z.A. (Ed), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Springer, Dordrecht. (pp. 257-296)
- Niu, D., Wang, X., Wang, Y., Song, X., Wang, J., Guo, J., Zhao, H. 2016. *Bacillus cereus* AR156 activates PAMP-triggered immunity and induces a systemic acquired resistance through a NPR1 -and SA-dependent signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 469(1), 120–125. doi:10.1016/j.bbrc.2015.11.081

- Nuñez, J.J. 2012. Management of Important Soilborne Diseases. En: Davis, M.R., Pernezny, K., Brome, J.C. (Eds.), Tomato health management. The American Phytopathological Society. St. Paul, Mn. (pp.95-101).
- Ogata-Gutiérrez, K., Chumpitaz-Segovia, C., Lirio-Paredes, J., Finetti-Sialer, M.M., Zúñiga-Dávila, D. 2017. Characterization and potential of plant growth promoting rhizobacteria isolated from native Andean crops. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11), 202-215. doi:10.1007/s11274-017-2369-4
- Ortega-García, J.G., Alejandro-Casimiro, M.A. 2010. Diagnóstico de hongos fitopatógenos de jitomate y efecto de *Trichoderma asperelum* Tc74 sobre *Fusarium* spp. Tesis de Maestría en Ciencias en Manejo Agroecológico de Plagas y Enfermedades. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI), Morelos. 82 pp.
- O'Toole, G.A., Pratt, L.A., Watnick, P.I., Newman, D. K., Weaver, V. B., Kolter, R. 1999. Genetic approaches to study of biofilms. *Methods in Enzymology*, 310, 91–109. doi: 10.1016/s0076-6879(99)10008-9
- Pankat, K., Singh, M., Anand, K., Saurabh. S., Tanvir, K., Kour, A., Yadav, A.N. y Kumar, M. 2020. Role and potential applications of plant growth-promoting rhizobacteria for sustainable agriculture. En: Khan, M.S., Zaidi, A. y Musarrat (Eds) *Microbial Strategies for crop improvement*. Elsevier, United Kingdom, Elsevier. pp: 49-60
- Panpatte D.G., Jhala Y.K., Shelat H.N., Vyas R.V. 2016. *Pseudomonas fluorescens*: A Promising Biocontrol Agent and PGPR for Sustainable Agriculture. En: Singh D., Singh H., Prabha R. (Eds) *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*. Springer, New Delhi. (pp. 257-270).
- Penrose, D.M., Glick. B. R. 2003. Methods for isolation and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia plantarum*, 118 (1): 10-15. doi:10.1034/j.1399-3054.200300086.x
- Phillips, D.A., Fox, T.C. King, M.D., Bhuvanewari, T.V., Teuber, L.R. 2004. Microbial Products Trigger Amino Acid Exudation from Plant Roots. *Plant Physiology*, 136(1), 2887–2894. doi:10.1104/pp.104.044222
- Pikovskaya, R.I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 17, 362–370.
- Príncipe, A., Alvarez, F., Castro, M. G., Zachi, L., Fischer, S. E., Mori, G. B., Jofré, E. 2007. Biocontrol and PGPR Features in Native Strains Isolated from Saline Soils of Argentina. *Current Microbiology*, 55(4), 314–322. doi:10.1007/s00284-006-0654-9
- Ramírez-Villapudua, J., Sáinz-Rodríguez, R.A. 2006. Manejo integrado de las enfermedades del tomate. Once Ríos Editores, México.
- Radhakrishnan, R., Hashem, A., Abd-Allah, E.F. 2017. *Bacillus*: A Biological Tool for Crop Improvement through Bio-Molecular Changes in Adverse Environments. *Frontiers in Physiology*, 8 (667), 1-14. doi:10.3389/fphys.2017.00667

- Rasul G., Mirza M.S., Latif F., Malik K.A. 1998. Identification of plant growth hormones produced by bacterial isolates from rice, wheat and kallar grass. En: Malik K.A., Mirza M.S., Ladha J.K. (Eds), Nitrogen Fixation with Non-Legumes. Springer, Dordrecht. (pp. 25-37).
- Rebman, J.P., Roberts, N.C. 2012. Baja California Plant Field Guide. (3rd ed.). San Diego Natural History Museum, San Diego.
- Richardson, A.E., Barea, J., McNeill, A. M., Prigent-Combaret, C. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil*, 321(1-2), 305–339. doi:10.1007/s11104-009-9895-2
- Riley, J., Rebman, J.P. y Vanderplank, S. 2015. Guía de Plantas de la región matorral rosetófilo costero noreste Baja California, México. San Diego Natural History Museum, USA.
- Roberts, W.K., Selitrennikoff, C.P. 1988. Plant and Bacterial Chitinases Differ in Antifungal Activity. *Journal of General Microbiology*, 134(1), 169–176. doi:10.1099/00221287-134-1-169
- Rueda-Puente, E. O., Castellanos-Cervantes, T., Díaz de León-Álvarez, J. L., Preciado-Rangel, P., Almaguer-Vargas, G. 2010. Bacterial community of rhizosphere associated to the annual halophite *Salicornia bigelovii* (Torr). *Terra Latinoamericana*, 28 (4), 345-353.
- Sachdev, D.P., Chaudhari, H.G., Kasture, V.M., Dhavale D.D., Chopade, B.A. 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 Journal Experimental Biology*, 47(12):993-1000.
- Sánchez-Peña, P., Cauich-Pech, S.O., Núñez-Farfán, J., Núñez-Cebreros, R.D., Hernández-Verdugo, S. Parra-Terraza, S., Villarreal-Romero, M. 2010. Incidence of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato in Sinaloa México. *Plant Disease*, 94 (11), 1376. doi: 10.1094/PDIS-04-10-0255
- Sanger, F., Brownlee, G.G., Barrell, B.G. 1965. A two-dimensional fractionation procedure for radioactive nucleotides. *Journal of Molecular Biology*, 13(2), 373-398. doi:10.1016/s0022-2836(65)80104-8
- Serrano-Gómez, C. 2014. Evaluación de *Trichoderma* spp. sobre hongos causantes de yesca en vid. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 55 pp.
- Sharma, P. Prakash-Verma, P., Mohinder, K. 2017. Phytohormones Production and Phosphate Solubilization Capacities of Fluorescent *Pseudomonas* sp. Isolated from Shimla Dist. of Himachal Pradesh. *International Journal of Current Microbiology Applied Sciences*, 6(9): 2447-2454. doi: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.609.301>
- SIAP. 2017. Avance de Siembras y Cosechas: Resumen nacional por estado. Consultado el 10 de junio de 2019, de: http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalCultivo.do
- SIAP. 2018a. Avances de siembras y cosechas resumen por cultivo. Consultado de 11 de junio de 2019, de: http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenDelegacion.do
- SIAP. 2018b. Anuario estadístico de la producción agrícola. Consultado de 27 de noviembre de 2018, de <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>

- SIAP. 2018c. Baja california: infografía agroalimentaria. Consultado de 18 de octubre de 2018, de <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>
- Siddiqui Z.A. 2005. PGPR: Prospective Biocontrol Agents of Plant Pathogens. En: Siddiqui Z.A. (Ed) PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer, Dordrecht. (pp. 11-142).
- Singh, V.K., Singh, H.B., Upadhyay, R.S. 2017a. Role of fusaric acid in the development of “Fusarium wilt” symptoms in tomato: Physiological, biochemical and proteomic perspectives. *Plant Physiology and Biochemistry*, 118, 320–332. doi: 10.1016/j.plaphy.2017.06.028
- Singh, N., Raina, D., Singh, M., Ghosh, M., Heflish, A.I.A.I. 2017b. Exploitation of promising native strains of *Bacillus subtilis* with antagonistic properties against fungal pathogens and their PGPR characteristics. *Journal of Plant Pathology*, 99 (1), 27-38. doi: <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v99i1.3809>
- Smyth, E.M., McCarthy, J., Nevin, R., Khan, M.R., Dow, J.M., O’Gara, F., Doohan, F.M. 2011. In vitro analyses are not reliable predictors of the plant growth promotion capability of bacteria; a *Pseudomonas fluorescens* strain that promotes the growth and yield of wheat. *Journal Applied Microbiology*, 111(3):683-692. doi:10.1111/j.1365-2672.201105079.x
- Soussi, A., Ferjani, R., Marasco, R., Guesmi, A., Cherif, H., Rolli, E., Cherif, A. 2015. Plant-associated microbiomes in arid lands: diversity, ecology and biotechnological potential. *Plant and Soil*, 405(1-2), 357–370. doi:10.1007/s11104-015-2650-y
- Srivastava, R., Khalid, A., Singh, U.S., Sharma, A.K. 2010. Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungus, fluorescent *Pseudomonas* and *Trichoderma harzianum* formulation against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* for the management of tomato wilt. *Biological Control*, 53(1), 24–31. doi: 10.1016/j.biocontrol.2009.11.012
- Schwyn, B., Neilands, J.B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160 (1), 47–56. doi: 10.1016/0003-2697(87)90612-9
- Tagele, S.B., Kim, S. W., Lee, H.G., Lee, Y.S. 2019. Potential of novel sequence type of *Burkholderia cenocepacia* for biological control of root rot maize (*Zea mays* L.) cause by *Fusarium temperatum*. *International Journal of Molecular Sciences* 20 (5), 1005. doi: 10.3390/ijms20051005
- Torres-Chávez, R.M. 2018. Hongos micorrízicos asociados a *Solanum hidsianum*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 46 pp.
- Turner, S., Pryer, K.M., Miao V.P. Palmer, J.D. 1999. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(4), 327–338. doi: 10.1111/j.1550-7408.1999tb04612.x.
- Uddin Rashed, M.R., Rani Roy M.R., Paul, S.K., Haque, M.M. 2016. *In vitro* Screening of Salt Tolerant Genotypes in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Horticulture* 3(04): 1-8. doi:10.4172/2376-0354.1000186

- Velázquez-Gurrola, A. Ramos-Alegría, M.P. 2005. Beneficios de microorganismos solubilizadores de P y K en la recuperación y mantenimiento de suelos agrícolas. En: VIII Congreso Mundial de la Palta, Lima, Perú, 13-18 de septiembre . 495-499 p.
- Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255 (2), 571-586. doi: 10.1023/A:1026037216893
- Verma, R. K., Sachan, M., Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Mishra, R. K., Tripathi, D. K., Sharma, S. 2018. Role of PGPR in Sustainable Agriculture: Molecular Approach Toward Disease Suppression and Growth Promotion. En Meena, V. (Ed), *Role of Rhizospheric Microbes in Soil*. Springer, Singapore. (pp. 259–290).
- Wang S, Wu H, Qiao J, Ma, L., Liu, J., Xia, Y., Gao, X. 2009. Molecular mechanism of plant growth promotion and induced systemic resistance to tobacco mosaic virus by *Bacillus* spp. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(10):1250-1258. doi: 10.4014/jmb.0901.008
- Whipps, J.M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52(1), 487–511. doi:101093/jexbot/52.suppl_1.487
- Wieland, G., Neumann, R., Backhaus, H. 2001. Variation of Microbial Communities in Soil, Rhizosphere, and Rhizoplane in Response to Crop Species, Soil Type, and Crop Development. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12), 5849–5854. doi:10.1128/aem.67.12.5849-5854.2001
- Zahid, M., Abbasi, M.K., Hameed, S., Rahim, N. 2015. Isolation and identification of indigenous plant growth promoting rhizobacteria from Himalayan region of Kashmir and their effect on improving growth and nutrient contents of maize (*Zea mays* L.). *Frontiers in Microbiology*, 6, 1-10. doi:10.3389/fmicb.2015.00207
- Zhang, N., Wang, D., Liu, Y., Li, S., Shen, Q., Zhang, R. 2014. Effects of different plant root exudates and their organic acid components on chemotaxis, biofilm formation and colonization by beneficial rhizosphere-associated bacterial strains. *Plant and Soil*, 374(1-2), 689–700. doi:10.1007/s11104-013-1915-6
- Zheng, W., Zeng, S., Bais, H., LaManna, J. M., Hussey, D. S., Jacobson, D. L., Jin, Y. 2018. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Reduce Evaporation and Increase Soil Water Retention. *Water Resources Research*, 54(5), 3673–3687. doi:10.1029/2018wr022656
- Zúñiga-Dávila, D., Tolentino, J., García M., Pérez, W., Matsubara, M., Ogata-Gutiérrez, K. 2011. Characterization of rhizospheric bacteria isolated from maca (*Lepidium meyenii* W.) in the highlands of Junin-Peru. En: *Microorganisms in Industry and Environment: From Scientific and Industrial Research to Consumer Products*, Lisboa, Portugal, 2-4 de diciembre. World Scientific, p. 21–25.

Anexos

Anexo I: Protocolos para preparación de medios de cultivo para aislamiento de bacterias

Medio ISP4 (1 Litro)

10.0 g Almidón

1.0 g Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)

1.0 g Sulfato de magnesio (SO_4Mg)

1.0 g Cloruro de sodio (NaCl)

2.0 g Sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$)

2.0 g Carbonato de calcio ($CaCO_3$)

0.001 g Sulfato ferrosol ($FeSO_4$)

0.001 g Cloruro de magnesio ($MnCl_2$)

0.001 g Sulfato de zinc ($ZnSO_4$)

15 g Bacto agar

*Ajustar pH a 7.0 y llevar a 1.0 L con agua destilada. Esterilización en autoclave a 15 lb de presión y 120 °C durante 15 minutos.

Medio B de King (1 Litro)

20.0 g Peptona (Difco)

1.5 g Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)

1.5 g Sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)

10.0 m Glicerol

15 g Agar

*Llevar a 1.0 L con agua destilada y esterilizar en autoclave a 15 lb de presión y 120 °C durante 15 minutos.

Medio LB (Luria Bertani) (1 Litro)

10.0 g Triptona

5.0 g Extracto de levadura

5.0 g Cloruro de sodio (NaCl)

15.0 g Agar

*Llevar a 1.0 L con agua destilada y esterilizar en autoclave a 15 lb de presión y 120 °C durante 15 minutos.

Medio Soya-Manitol (1 Litro)

20.0 g Harina de soya baja en grasa

20.0 g Manitol

15.0 g Agar

*Llevar a 1.0 L con agua destilada y esterilizar en autoclave a 15 lb de presión y 120 °C durante 15 minutos.

Agar de avena (1 Litro)

60.0 g Avena molida

12.5 g Bacto agar

*Ajustar pH del medio a 6.0 antes de aforar, después llevar a 1.0 L con agua destilada y esterilizar en autoclave a 15 lb de presión y 120 °C durante 15 minutos.

Agar Papa Dextrosa casero (PDA) (1 Litro)

20.0 g Dextrosa

15.0 g Agar

*Llevar a 1.0 L con caldo de papa y esterilizar en autoclave a 15 lb de presión y 120 °C durante 15 minutos. Para preparar el caldo hervir 200 g de papas en rodajas y peladas en agua destilada durante 30 minutos. En seguida filtrar a través de una gasa, reservando el líquido.

TY (1 Litro)

6.0 g Triptona

3.0 g Extracto de levadura

0.38 g Cloruro de calcio (CaCl₂)

15.0 g Agar

*Llevar a 1.0 L con agua destilada y esterilizar en autoclave a 15 lb de presión y 120 °C durante 15 minutos.

YPD (1 liter)

2.0 g Extracto de levadura

2.0 g Peptona

5.0 g Dextrosa

15.0 g Agar

*Llevar a 1.0 L con agua destilada y esterilizar en autoclave a 15 lb de presión y 120 °C durante 15 minutos.