



BACTERIAS DE LA RIZOSFERA DE GARBANZO CON CAPACIDAD ANTAGÓNICA A HONGOS FITOPATÓGENOS Y DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO DE LA PLANTA[†]

[BACTERIA OF THE CHICKPEA RHIZOSPHERE WITH ANTAGONISTIC CAPACITY TO PHYTOPATHOGENOUS FUNGI AND PLANT GROWTH PROMOTION]

Ernesto Fernández-Herrera^{1*}, María Eugenia Martínez-Rentería¹, Sergio Francisco Moreno-Salazar¹, Nadia Jiménez-Peña² and Irene Iliana Ramírez-Bustos³

¹ Universidad de Sonora, Departamento de Agricultura y Ganadería, Carretera Bahía de Kino km 21. Hermosillo, Sonora, México. C.P. 83000.

Email: ernesto.fernandez@guayacan.uson.mx

² Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo Carretera México-Texcoco, km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México 56230.

³ Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Posgrado en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa. Cuernavaca, Morelos, México. C.P. 62210.

*Corresponding author

RESUMEN

La enfermedad conocida como "rabia del garbanzo", causada por *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani*, es una de las principales limitantes en la producción de garbanzo en México. En su manejo tradicionalmente se ha utilizado el control químico, lo que ha impactado negativamente en los agroecosistemas. El control biológico es una opción ecológica para el manejo de las enfermedades de las plantas a través del uso de hongos y bacterias benéficas. La presente investigación tuvo como objetivos aislar e identificar bacterias de la rizosfera de plantas de garbanzo con capacidad antagonista *in vitro* hacia *F. oxysporum*, *F. solani* y *R. solani*, y de promoción del crecimiento de la planta. Se evaluó la capacidad de los aislamientos para producir sideróforos, ácido giberélico y de solubilizar fósforo. Se obtuvieron 67 aislamientos bacterianos, de los cuales dos (AG-B007 y AG-B038) se seleccionaron por presentar un fuerte antagonismo *in vitro* hacia *F. oxysporum*, *F. solani* y *R. solani*. Estos aislamientos presentaron producción de sideróforos en medio CAS, solubilización de fósforo inorgánico en rangos de 164 a 171 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y ácido giberélico de 29 a 55 $\mu\text{g mL}^{-1}$. La inoculación de los aislamientos AG-B007 y AG-B038 promovió el crecimiento en plantas de garbanzo bajo condiciones de invernadero. Los dos aislamientos se identificaron como pertenecientes al género *Bacillus*, mediante secuenciación del gen RNAr 16S.

Palabras clave: *Cicer arietinum*; *Fusarium* spp.; *Rhizoctonia solani*; *Bacillus subtilis*; sideróforos; solubilización de fósforo.

SUMMARY

The disease known as "chickpea rabies", caused by *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani*, is one of the main limitations of chickpea production in Mexico. Traditionally, chemical control has been used, which has negative impact on agroecosystems. Biological control is an ecological alternative for the management of plant diseases by the use of antagonistic bacteria and fungi. The objective of the present investigation was to isolate and identify rhizobacteria of chickpea plants with *in vitro* antagonistic capacity towards *F. oxysporum*, *F. solani* and *R. solani* and plant growth promotion. The ability of the isolates to produce siderophores, gibberellic acid and solubilize phosphorus was evaluated. Sixty-seven bacterial isolates were obtained, of which two (AG-B007 and AG-B038) were selected because of strong *in vitro* antagonism towards *F. oxysporum*, *F. solani* and *R. solani*. These isolates presented siderophore production in CAS medium, solubilization of inorganic phosphorus in ranges of 164 to 171 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and gibberellic acid in values of 29 to 55 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The inoculation of the AG-B007 and AG-B038 isolates promoted growth in chickpea plants under greenhouse conditions. The two isolates were identified as belonging to the genus *Bacillus* by sequencing the 16S RNAr gene.

Key words: *Cicer arietinum*; *Fusarium* spp.; *Rhizoctonia solani*; *Bacillus subtilis*; siderophores; phosphate solubilization.

[†] Submitted May 03, 2018 – Accepted October 21, 2018. This work is licensed under a CC-BY 4.0 International License
There is an erratum note for this article in volume 22(1), 2019: 239

INTRODUCCIÓN

El cultivo del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) tiene gran importancia mundial debido al número de hectáreas plantadas anualmente; ocupa el segundo lugar en importancia en el mundo entre las leguminosas de grano seco, solo después del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) (Morales y Durón, 2004). En México, en el año agrícola 2016, la superficie dedicada a la producción de este cultivo fue de 66 096 ha sembradas, con una producción de 116 076 t; Sinaloa y Sonora fueron los principales estados productores al aportar 45 y 30% de la producción nacional, respectivamente (SIAP, 2017).

Las enfermedades que afectan al garbanzo constituyen una limitante para su producción en muchas partes del mundo, sobre todo cuando no se utilizan cultivares con resistencia (Jendoubi et al., 2017). *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* y *Fusarium solani* son patógenos de esta leguminosa, causantes de la pérdida de plantas en todas las áreas productoras del mundo (Nene et al., 2012). En México, la enfermedad conocida como “marchitez” o “rabia del garbanzo” es ocasionada por un complejo de hongos: *F. oxysporum*, *F. solani*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*; que causan pérdidas importantes en la producción de garbanzo (Morales y García, 2004; Paredes-Escalante et al., 2009). Al estudiar la marchitez del garbanzo en 50 campos agrícolas, Zemouli-Benfreha et al. (2014) encontraron incidencias de hasta 100% y severidades moderadas; *F. oxysporum* fue la principal especie aislada (43%) de plantas enfermas, seguida de *F. solani* (32%). Algunas de las estrategias empleadas para el manejo de esta enfermedad son el uso de variedades resistentes, rotación de cultivos, solarización, el retiro de socas y uso de semillas libre de patógenos o tratadas con fungicidas, aunque los resultados han sido limitados o poco satisfactorios (Landa et al., 2004; Paredes-Escalante et al., 2009).

El control químico es el método más usado para controlar las enfermedades que ocasionan las especies de *Fusarium*; sin embargo, en los últimos años el control biológico ha cobrado mayor importancia (Omar et al., 2006; Basco et al., 2017). Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés) son de los principales organismos usados como agentes de control biológico (Kumar et al., 2011). Las PGPR promueven el crecimiento de las plantas de manera directa e indirecta (Ortíz-Castro et al., 2009). La promoción directa del crecimiento se da a través de mejorar la disponibilidad de nutrientes (fósforo, nitrógeno, potasio y minerales esenciales), o mediante la producción de sustancias que regulan el crecimiento y desarrollo vegetal (giberelinas, auxinas, citocininas, etileno). De estos mecanismos de acción de las rizobacterias, la solubilización de fosfatos orgánicos e inorgánicos en el suelo a través de la producción de fosfatasas y ácidos

orgánicos incrementa la disponibilidad del fósforo en la nutrición de las plantas (Mohammadi, 2012; Corrales-Ramírez et al., 2014). Se ha reportado el aislamiento e inoculación de bacterias solubilizadoras de fósforo con capacidad de mejorar el crecimiento vegetal, en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*), café (*Coffea arabica*), chícharo (*Pisum sativum*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*), entre otros cultivos (Oteino et al., 2015; Cisneros-Rojas et al., 2017; Flores-Zárate et al., 2018). Por otra parte, la producción de giberelinas es otro mecanismo importante en la promoción de crecimiento vegetal durante la asociación rizobacteria-planta (Bottini et al., 2004). Probanza et al. (2002), al inocular bacterias productoras de giberelinas (GA₁, GA₃, GA₄, GA₂₀) del género *Bacillus* (*B. licheniformis* y *B. pumilus*) en plantas de *Pinus pinea*, encontraron incrementos significativos en área foliar, peso seco y contenido de nitrógeno en comparación a las plantas no inoculadas, sugiriendo que la promoción del crecimiento ocurrió por la producción de giberelinas bacterianas. Algunos de los géneros bacterianos que han mostrado una alta capacidad de producir ácido giberélico son *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Bradyrhizobium* y *Azospirillum* (Bottini et al., 2004; Morrone et al., 2009; Patel y Saraf, 2017).

La promoción indirectamente del crecimiento por parte de las rizobacterias se debe a la inhibición de fitopatógenos (Gupta et al., 2015). Entre estos mecanismos de control destaca la inducción de resistencia sistémica inducida (RSI), producción de antibióticos (2,4-diacetilfloroglucinol, pirrolnitrina y pioluteorina) y sideróforos (catecolatos, hidroximatos e hidroxicarboxilatos) (Kumar et al., 2011; Aguado-Santacruz et al., 2012; Bhattacharyya y Jha, 2012). Los sideróforos son pequeñas moléculas orgánicas producidas por microorganismos que capturan el hierro del ambiente y reducen la disponibilidad para los fitopatógenos, los que participan significativamente en el control biológico de fitopatógenos (Saha et al., 2016). Diversos estudios han reportado la utilización de rizobacterias productoras de sideróforos para el control de patógenos como *Colletotrichum lindemuthianum*, *C. gloeosporioides*, *Phytophthora cinnamomi*, *P. capsici*, *F. oxysporum*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Pythium splendens*, etc. (Buysens et al., 1996; Valencia-Cantero et al., 2005; Santoyo et al., 2010; Ko et al., 2011; Santos-Villalobos et al., 2012; Arya et al., 2018). Yu et al. (2011) reportaron que la inoculación de cepa productora de sideróforos *B. subtilis* CAS15 redujo la incidencia de la marchitez del chile causada por *F. oxysporum* f. sp. *capsici* hasta en 56.9.

Con base en lo anterior, la presente investigación tuvo como objetivos: a) Aislar e identificar bacterias asociadas a la rizosfera de plantas de garbanzo, con potencial de inhibir en condiciones *in vitro* a patógenos

causantes de la “rabia del garbanzo”, b) Estudiar la capacidad de las bacterias para producir sideróforos, ácido giberélico y de solubilizar fósforo, y c) Evaluar la capacidad de las bacterias para promover el crecimiento de plantas de garbanzo bajo condiciones de invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo y aislamiento de rizobacterias

Los aislamientos se realizaron a partir de plantas sanas de garbanzo de 3 meses de edad, seleccionadas aleatoriamente de un cultivo de garbanzo, ubicado en el poblado Miguel Alemán, municipio de Hermosillo, Sonora. El suelo del lugar de colecta presentaba textura franco arenosa, pH de 7.5 y materia orgánica de 0.8%. Las raíces de las plantas colectadas cubiertas con suelo rizosférico se llevaron al laboratorio y se procesaron inmediatamente. Se realizaron diluciones seriales con base en 10 g de suelo rizosférico contenidos en un matraz Erlenmeyer, al que se le agregaron 90 mL de solución salina (0.85% NaCl) y se agitó vigorosamente. La muestra se diluyó sucesivamente hasta 10^{-4} . De las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} , se colocaron 100 mL en cajas Petri con medio LB (Luria Bertani; Merck®) y se estriaron con un asa previamente esterilizada. Las cajas se incubaron a 28 °C durante 72 h en ausencia de luz. Se seleccionaron colonias morfológicamente diferentes, para su resiembra por estría en cajas con medio LB, hasta obtener cultivos puros. Durante las resiembras, los cultivos se incubaron bajo las mismas condiciones.

Aislamiento de hongos fitopatógenos

De plantas garbanzo con síntomas de marchitez y necrosis de raíz, se tomaron muestras de tejido vegetal, las cuales se desinfestaron, enjuagaron y secaron, para posteriormente sembrarse en medio de cultivo PDA (Difco®) e incubarse a 28 °C. Se realizó la identificación morfológica de los aislamientos fúngicos a partir de montajes de tejido de cultivos de 10 días de edad; se usaron las características descritas por Leslie y Summerell (2006) para *F. oxysporum* y *F. solani*, y las de Sneh et al., (1996) para *R. solani*. Para corroborar la patogenicidad de los aislamientos, cinco plantas de garbanzo se inocularon con los aislamientos obtenidos.

Pruebas de antagonismo hacia hongos fitopatógenos

La capacidad antagónica *in vitro* de los aislamientos bacterianos hacia *F. oxysporum*, *F. solani* y *R. solani*, se evaluó de la siguiente manera: en el centro de una caja Petri, con medio PDA, se colocó un disco de 5 mm de diámetro con micelio de cada uno de los hongos

evaluados; cada aislamiento bacteriano se sembró por estría en los cuatro puntos equidistantes alrededor del hongo y a 3 cm de distancia. Las cajas que sirvieron como testigo solo se sembraron con el hongo, sin la bacteria. Cada aislamiento bacteriano se evaluó por triplicado (tres cajas Petri). Las cajas Petri se incubaron por 7 días a 28 °C en ausencia de luz. Al final del periodo de incubación, se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento del patógeno usando la fórmula descrita por Ezziyani et al., (2004a): porcentaje de inhibición = $(R1-R2)/R1 \times 100$, donde R1 es el radio mayor (radio patógeno testigo) y R2 es el radio menor (radio del patógeno en enfrentamiento con la bacteria).

Evaluación de la producción de sideróforos

Para la detección de sideróforos se usó el ensayo universal agar cromo azurol S (CAS) descrito por Schwyn y Neilands (1987). En este ensayo el complejo CAS/HDTMA (hexadecyl trimetil amonio) se une fuertemente con el hierro férrico para producir un color azul, cuando una colonia bacteriana libera un sideróforo, éste remueve el hierro del complejo y el color del agar cambia de azul a naranja. El ensayo se realizó por triplicado, para lo cual se sembraron diluciones de la bacteria por picadura en tres sitios equidistantes en medio agar CAS. Las placas se incubaron a 28 °C por 72 h. El nivel de producción de sideróforos por aislamiento se registró como el diámetro del halo naranja producido por la colonia.

Determinación de la capacidad productora de ácido giberélico (AG₃)

La determinación de ácido giberélico se basó en su conversión en ácido giberelónico (Berríos et al., 2004). Se inoculó una asada de cada cultivo bacteriano puro en tubos de ensayo con 5 mL de medio enriquecido estéril (1.5 g de peptona de carne, 3 g de extracto de levadura, 6 g de peptona de gelatina y 1 g de glucosa por litro de medio) (Lopper y Scroth, 1986). Los tubos se incubaron durante 24 horas a 28 °C en agitación constante. El contenido bacteriano de cada tubo se vertió en un matraz Erlenmeyer de 250 mL que contenía 100 mL de medio enriquecido estéril. Los matraces se incubaron a 28 °C con agitación durante 72 h y se centrifugaron. El sobrenadante se filtró con un embudo de separación, se le adicionó agua y se ajustó el pH de la solución a 1-2 (0.1 M HCL). Se agregó acetato de etilo y se agitó vigorosamente durante 60 s. La fase acuosa se transfirió a otro embudo de separación; el procedimiento se repitió al añadir acetato de etilo. La fase acuosa se descartó y la fase orgánica se transfirió al primer embudo de separación. El AG₃ se volvió a extraer del acetato de etilo con porciones sucesivas de 20, 15 y 10 mL de buffer de fosfatos con pH 7.4; se agitó cada vez durante 60 s y se combinó cada extracción en un matraz; se aforó a 50

mL con buffer de fosfatos. La determinación de AG₃ se determinó por espectrofotometría a longitud de onda de 254 nm.

Solubilización de fosfato inorgánico

Los aislamientos bacterianos se hicieron crecer en medio líquido Pikovskaya a 30 °C a 300 rpm durante 2 días. Alícuotas de 1 mL de cada aislamiento se transfirieron en matraces Erlenmeyer que contenían 200 mL de medio líquido Pikovskaya, y se incubaron a 30 °C a 300 rpm durante 7 días. Se usó medio esterilizado sin inoculación como testigo. De cada cultivo se tomaron 10 mL, los cuales se centrifugaron; el sobredanante se usó para cuantificar el fósforo liberado al medio líquido, de acuerdo con la metodología descrita por Murphy y Riley (1962).

Inoculación en plántulas

Para evaluar el efecto de las bacterias en el crecimiento de plantas de garbanzo, se establecieron plantas bajo condiciones de invernadero. Se probaron tres tratamientos: 1) Aislamiento AG-B007, y 2) Aislamiento AG-B038; estos dos aislamientos bacterianos correspondieron a aquellos con alta capacidad para inhibir el crecimiento *in vitro* de *F. oxysporum*, *F. solani* y *R. solani*; y 3) Testigo. Las semillas de garbanzo, previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 0.5% durante dos minutos, se sembraron en charolas de poli estireno de 128 cavidades con sustrato a base de turba (Sunshine®). Las plántulas de garbanzo de 5 días de emergidas, se inocularon con 1 mL de suspensión de bacteriana con 1×10^8 células disueltas en NaCl al 0.85%. Las plantas testigo recibieron 1 mL de solución salina. Todas las plantas se regaron diariamente con agua destilada esterilizada. Las siguientes variables se evaluaron en plantas de 50 días de edad: altura, peso fresco y peso seco total. Se utilizó un diseño completamente al azar, se sembraron dos charolas por tratamiento, correspondientes a dos aislados bacterianos y un testigo sin inocular. Se tomaron en total 20 plantas al azar por tratamiento (10 por cada charola germinadora). Los datos se sometieron a un análisis de varianza y comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$), con el programa estadístico SAS 9.1 (SAS, 2003).

Identificación molecular y análisis filogenético

El DNA de los dos aislamientos bacterianos con mayor capacidad antagonista a *F. oxysporum*, *F. solani* y *R. solani* se aisló con el método de CTAB, y se amplificó por PCR con los oligonucleótidos universales F2C (5'-AGAGTTTGATCATGGCTC -3') y C (5'-ACGGGCGGTGTGTAC -3') para la amplificación de un fragmento de 1400 bases del gen 16S rDNA (Shi et

al., 1997). Las amplificaciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µL en un termociclador (C1000 Thermal Cycler, BioRad), con las condiciones de amplificación: 95 °C por 2 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineamiento a 60 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 1 min, con una extensión final a 72 °C por 5 min. Los productos amplificados se visualizaron en geles de agarosa al 2% y se tiñeron con GelRed® para su documentación, y se purificaron con ExoSap-IT®PCR Product Cleanup (Affymetrix, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se secuenció en ambas direcciones un fragmento de 1 kb de la región RNAr 16S, a partir del producto de PCR original F2C/C de 1.4 kb usando el primer C y el primer U1 (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG -3') (Shi et al., 1997). Las secuencias complementarias del gen 16S de cada aislado se analizaron y corrigieron manualmente con ChromasPro v. 2.1.5 (<http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html>). Una vez editadas las secuencias se utilizó el paquete informático Basic Local Alignment Search Tool (BLAST: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para realizar alineamientos para identificar los genes homólogos entre los genes ya secuenciados, los que se encuentran depositados en el GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las secuencias de los aislamientos bacterianos AG-B007 y AG-B038 de garbanzo se alinearon con el apoyo del programa informático Clustal Omega (Sievers et al., 2011), donde se incluyeron otras especies dentro del género *Bacillus* disponibles en el GenBank. Para conocer los sitios nucleotídicos conservados y con variación, se realizó un alineamiento por medio del software MEGA 7.0. El análisis filogenético se realizó con el programa PAUP* versión 4.0a. Las hipótesis filogenéticas se obtuvieron a partir de los criterios de distancias genéticas por medio de Neighbour-joining (NJ), Máxima Verosimilitud (ML). El análisis de NJ se realizó bajo el criterio de Kimura 2 parámetros (Kimura, 1980), con 1000 réplicas aleatorias de bootstrap hasta encontrar la topología de las relaciones entre los organismos analizados. Se utilizó a *E. coli* AM946981 como grupo externo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento y antibiología *in vitro* hacia fitopatógenos

Se obtuvieron 67 aislamientos bacterianos a partir del muestreo realizado de suelo rizosférico de plantas de garbanzo en la Costa de Hermosillo, Sonora. Las bacterias presentaron diferentes características morfológicas en tamaño, forma, coloración, consistencia y bordes de colonias. Del total de aislamientos, solo dos (AG-B007 y AG-B038) se

preseleccionaron por su capacidad de inhibir el crecimiento de *F. oxysporum*, *F. solani* y *R. solani*.

Los resultados de antagonismo indican que los dos aislamientos bacterianos ejercen control sobre los hongos fitopatógenos evaluados, al inhibir su crecimiento *in vitro* en diferentes grados (Figura 1). El aislamiento AG-B038 mostró los mayores porcentajes de inhibición hacia *F. oxysporum* (78%), *F. solani* (77%) y *R. solani* (88%) con respecto al testigo.

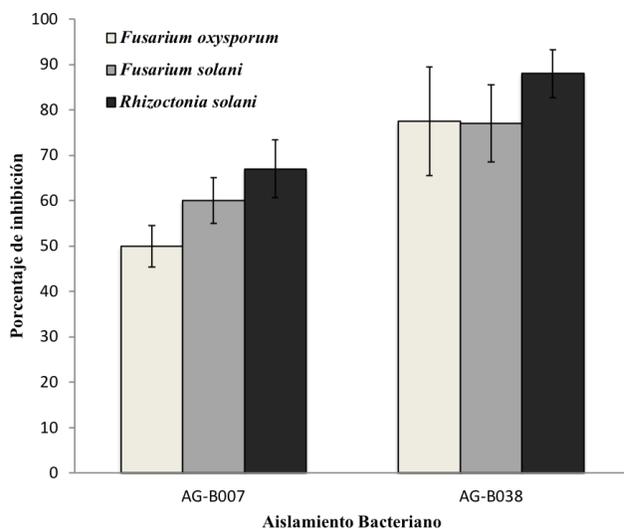


Figura 1. Antagonismo *in vitro* de dos aislamientos bacterianos de la rizosfera de garbanzo contra *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani*. Cada barra representa la media de tres repeticiones. La línea de cada barra representa la desviación estándar.

La inhibición de *F. oxysporum*, *F. solani* y *R. solani* por parte de los aislamientos bacterianos pudo deberse a su capacidad para producir sideróforos, los que inhibieron el crecimiento de los hongos manera indirecta o por la producción de metabolitos antifúngicos en el medio de cultivo. Al respecto, algunos autores indican que la inhibición del crecimiento e incluso la destrucción del micelio de hongos fitopatógenos en pruebas de antagonismo *in vitro*, se debe a la producción de varios antibióticos por parte de las bacterias, como pirrolnitrina, pioluteorina y 2,4-diacetil-floroglucinol, los cuales presentan un amplio espectro antifúngico y bacteriano (De la Fuente et al., 2004; Ezziyani et al., 2004b). Al respecto, Reyes et al. (2011) evaluaron la actividad antagónica *in vitro* de cepas de *Bacillus* contra *Macrophomina phaseolina*, con porcentajes de inhibición de 38% en medio agar nutritivo y 65% en medio agar soya tripticasa, indicando que la inhibición pudo ocurrir debido a la producción de metabolitos secundarios que se difundieron en el medio de cultivo, tales como

enzimas hidrolíticas (quitinasas y β - glucanasas) y de compuestos antibióticos. Así mismo, Trujillo et al. (2007) reportaron altos porcentajes de inhibición *in vitro* de hongos fitopatógenos (*Fusarium* spp., *Alternaria alternata* y *Curvularia* sp.) con cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia*, sugiriendo que la producción de metabolitos como los sideróforos desempeñan una función vital en el antagonismo de los fitopatógenos.

Producción de sideróforos

Los dos aislamientos bacterianos seleccionados en este estudio mostraron su capacidad para crecer en condiciones limitantes de hierro, de acuerdo con los resultados del ensayo agar CAS. Los aislamientos AG-B038 y AG-B007 mostraron halos de decoloración de 13 y 14 mm, lo que indica la producción de sideróforos por parte de los aislamientos evaluados, lo que podría limitar el crecimiento de microorganismos fitopatógenos al secuestrar el hierro disponible en el medio. La producción de sideróforos por bacterias de la rizosfera es uno de los principales mecanismos involucrados en el control biológico de las enfermedades de las plantas (Shanmugaiah et al., 2015). Este mecanismo es común en bacterias como *Azospirillum brasilense*, la cual es capaz de controlar a *Colletotrichum acutatum* en cultivos de fresa mediante la producción de sideróforos de tipo catecol (Tortora et al., 2011). Santoyo et al. (2010) reportaron que la cepa bacteriana ZUM80 (*Pseudomonas fluorescens*) productora de sideróforos, logró restringir el crecimiento de *Colletotrichum lindemuthianum*, *C. gloeosporioides* y *P. cinnamomi* en 76, 72 y 70%, respectivamente. Aguado-Santacruz et al. (2012) señalan que los sideróforos microbianos juegan un papel clave en el control de microorganismos fitopatógenos, al reducir las cantidades de hierro disponibles para el crecimiento de éstos, o bien por activar los sistemas de resistencia sistémica inducida en las plantas. Previamente se ha reportado el control biológico de la marchitez por *F. oxysporum* f. sp. *capsici*, en plantas de *C. annuum* por cepas de *Bacillus* productoras de sideróforos (Yu et al., 2011) o cepas de *Pseudomonas* en plantas de *S. lycopersicum* para el control de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Liu et al., 2010).

Solubilización de fósforo inorgánico

Los dos aislamientos bacterianos seleccionados en este estudio presentaron capacidad para solubilizar fósforo insoluble en valores de 164 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para AG-B007 y 171 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para el aislamiento AG-B038, a los 7 días de incubación con agitación. Estos resultados son similares a los reportados por Kundu et al. (2009) quienes al evaluar la capacidad de solubilización de fósforo de bacterias (*Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Klebsiella* y *Enterobacter*) de la rizosfera de garbanzo

encontraron valores de solubilización en rangos de 2.2 a 227.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en medio Pikovskaya. Los aislamientos estudiados tienen una capacidad importante para solubilizar fósforo inorgánico, lo que podría influir positivamente en el crecimiento vegetal de las plantas de garbanzo. Diversos estudios han demostrado que el uso de bacterias solubilizadoras de fósforo para movilizar fuentes de fósforo poco disponibles en el suelo, puede reducir la aplicación de fertilizantes químicos, con lo que se mejora el crecimiento vegetal y la productividad de los cultivos (Vikram *et al.*, 2008; Madani *et al.*, 2011). La producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular es el principal mecanismo por el cual las rizobacterias hacen disponible al fósforo para la absorción de las plantas (Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria, 2010); los géneros bacterianos *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Enterobacter* son algunos de los más frecuentemente reportados como microorganismos solubilizadores de fósforo (Mohammadi, 2012; Seshachala y Tallapragada, 2012; Tejera-Hernández *et al.*, 2013).

Producción de ácido giberélico

Los aislamientos bacterianos evaluados produjeron ácido giberélico en rangos que oscilan de 29 a 55 $\mu\text{g mL}^{-1}$. El aislado AG-B038 produjo mayor concentración de ácido giberélico (55 $\mu\text{g mL}^{-1}$), mientras que el AG-B007 produjo 29 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Las giberelinas comprenden un grupo grande de ácidos diterpenoides carboxílicos que son ubicuos en plantas superiores, en los cuales ciertos miembros funcionan como reguladores endógenos del crecimiento, los que promueven la expansión de órganos y los cambios de desarrollo, y que también son producidas por hongos y bacterias (Hedden y Thomas, 2012). En este sentido, Gutiérrez-Mañero *et al.* (2001) indican que las rizobacterias *Bacillus pumilus* y *Bacillus licheniformis* son productoras de cantidades altas de ácido giberélico y tienen una fuerte actividad para promover el crecimiento en *Alnus glutinosa*, lo que sugiere que esta promoción es mediada principalmente por la producción de giberelinas. De igual forma, Probanza *et al.* (2002) al inocular bacterias promotoras del crecimiento vegetal del género *Bacillus* (*B. licheniformis* y *B. pumilus*) en plantas de *Pinus pinea*, notaron que éstas promovieron el crecimiento vegetal, probablemente por la producción de giberelinas. A pesar de que los mecanismos por los cuales las PGPR promueven el crecimiento y desarrollo de las plantas son diversos, algunos autores sugieren que la producción de fitohormonas, como el ácido giberélico y las auxinas, se encuentra entre los principales mecanismos de promoción (Gutiérrez-Mañero *et al.*, 2001; Joo *et al.*, 2004; Cassán *et al.*, 2014).

Efecto en la promoción del crecimiento

Los dos aislamientos bacterianos que mostraron actividad antagónica a *F. oxysporum*, *F. solani* y *R. solani*, también mostraron un efecto benéfico en el crecimiento de plantas de garbanzo. El análisis de varianza para las variables altura, peso fresco total y peso seco total mostró diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Tabla 1). Se encontró que el aislado AG-B038 fue el que mostró los mayores incrementos en las variables evaluadas, en comparación con las plantas testigo. El efecto benéfico de las PGPR en diversos parámetros del crecimiento y desarrollo, ha sido reportado por otros autores en cultivos como *L. esculentum* (Hernández-Suárez *et al.*, 2010), *C. annuum* (Yu *et al.*, 2011), *Hevea brasiliensis* (Hidayati *et al.*, 2014), *Malus domestica* (Karlidag *et al.*, 2007), *Rubus idaeus* (Orhan *et al.*, 2006), entre otros.

Los incrementos en los diferentes parámetros de crecimiento observados en el presente estudio, pueden ser atribuidos a la cualidad de las bacterias de producir ácido giberélico o solubilizar fósforo, lo que pudo mejorar la absorción de agua y nutrientes al alterar la elongación y arquitectura de las raíces (Dodd *et al.*, 2010). Al respecto, Shahzad *et al.* (2016) reportaron que la inoculación de *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1, cepa productora de ácido giberélico, incrementó significativamente diversos parámetros del crecimiento como longitud de raíz, peso fresco, peso seco y contenido de clorofila en plantas de arroz, en comparación con aquellas plantas tratadas solo con ácido giberélico (AG₃) o agua. Hidayati *et al.* (2014) reportaron que las bacterias endófitas *Bacillus cereus* y *Pseudomonas aeruginosa* produjeron de 27 y 23.63 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de giberelinas, lo que incrementó significativamente la longitud de las raíces y la germinación de semillas de *H. brasiliensis*. También Noh *et al.* (2014) al estudiar el efecto de dos aislamientos bacterianos solubilizadores de fósforo en la producción de materia seca en plantas de tomate, encontraron incrementos de 32 y 42% en comparación a las plantas testigo, respectivamente; esto sugirió que la solubilización de fosfatos probablemente influyó en la promoción del crecimiento.

Identificación molecular y análisis filogenético

Las secuencias del gen ARNr 16S de los aislamientos AG-B007 y AG-B038 se depositaron en la base de datos del NCBI, con número de acceso MG641043 y MG641044, respectivamente. La comparación de estas secuencias con las de algunas especies pertenecientes al Phylum Firmicutes, indicó que los aislamientos AG-B007 y AG-B038 se agrupan en el mismo clado, junto a aislamientos de *B. subtilis* (MF983545, MF983540 y MG011588) (Figura 2). En diversos estudios los aislamientos de *Bacillus* spp. han mostrado que

estimulan positivamente el crecimiento y desarrollo de diversas plantas (Gutiérrez-Mañero *et al.*, 2001; Hernández-Suárez *et al.*, 2010), o bien que antagonizan el crecimiento *in vitro* (Rios-Velasco *et*

al., 2016) o *in vivo* de hongos fitopatógenos que afectan a los cultivos agrícolas.

Tabla 1. Efecto de dos aislamientos bacterianos en el crecimiento y peso (fresco y seco) de plantas de garbanzo (*Cicer arietinum*) de 50 días de edad en invernadero.

Tratamiento	Altura		Peso fresco total		Peso seco total	
	cm	%	g	%	g	%
AG-B007	28.20 bc	5.2	5.47 c	1.5	0.59 b	40.4
AG-B038	37.60 a	40.3	9.28 a	72.1	0.80 a	90.5
Testigo	26.80 c	0	5.39 c	0	0.42 d	0
CV	5.17		12.64		4.13	4.13

¹Incremento con respecto al testigo (considerado como 100%). ²Valores con la misma letra dentro de la misma columna son iguales estadísticamente (Tukey, $p < 0.05\%$).

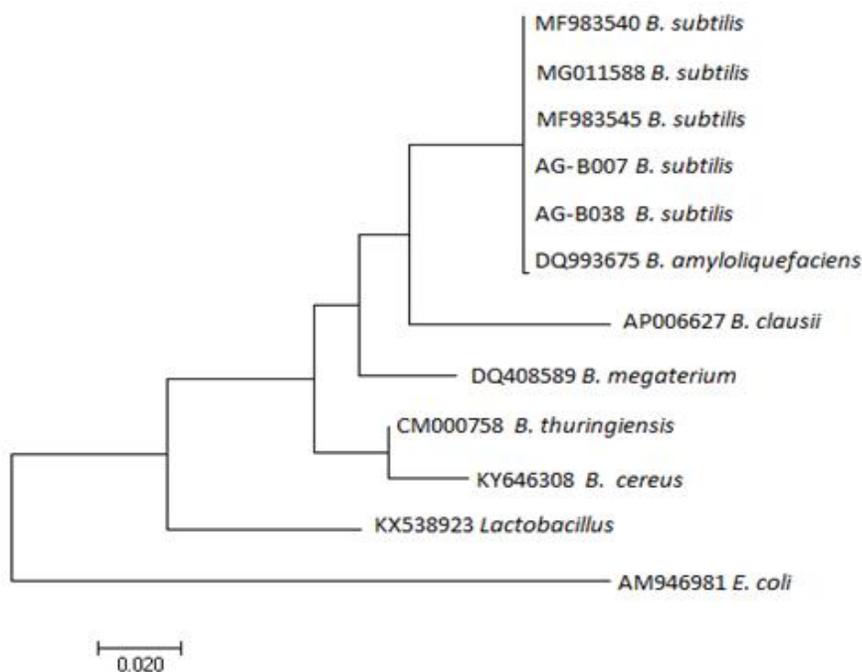


Figura 2. Análisis filogenético de aislamientos de *Bacillus subtilis* con capacidad antagonista a fitopatógenos con origen en el suelo y de promoción del crecimiento en plantas de garbanzo. Se utilizó a *E. coli* AM946981 como grupo externo.

CONCLUSIONES

Se seleccionaron aislamientos bacterianos potencialmente eficientes en el control biológico de patógenos de la raíz en plantas de garbanzo, y que bajo condiciones *in vitro* inhiben hasta en 88% el crecimiento de *R. solani*. Estos aislamientos también mostraron capacidad de promover el crecimiento de plantas de garbanzo en invernadero, posiblemente por la producción de metabolitos secundarios como el ácido giberélico.

REFERENCIAS

Aguado-Santacruz, G.A., Moreno-Gómez, B., Jiménez-Francisco, B., García-Moya, E., Preciado-Ortiz, R.E. 2012. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Revista Fitotecnia Mexicana* 35: 9-21.
<http://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v35n1/v35n1a4.pdf>. Consultada: 30 de enero de 2018.

- Arya, N., Rana, A., Rajwar, A., Sahgal, M., Sharma, A.K. 2018. Biocontrol efficacy of siderophore producing indigenous *Pseudomonas* strains against *Fusarium* wilt in tomato. *National Academy Science Letters* 41: 133-136. DOI: 10.1007/s40009-018-0630-5.
- Basco, M.J., Bisen, K., Keswani, C., Singh, H.B. 2017. Biological management of *Fusarium* wilt of tomato using biofortified vermicompost. *Mycosphere* 8: 467-483. DOI: 10.5943/mycosphere/8/3/8.
- Berríos, J., Illanes, A., Aroca, G. 2004. Spectrophotometric method for determining gibberellic acid in fermentation broths. *Biotechnology Letters* 26: 67-70. DOI: 10.1023/B:BILE.0000009463.98203.8b.
- Bhattacharyya, P. N., Jha, D.K. 2012. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28: 1327-1350. DOI: 10.1007/s11274-011-0979-9.
- Bottini, R., Cassán, F., Piccoli, P. 2004. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65: 497-503. DOI: 10.1007/s00253-004-1696-1.
- Buysens, S., Heungens, K., Poppe, J., Hofte, M. 1996. Involvement of pyochelin and pyoverdine in suppression of *Pythium*-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 865-871. <https://aem.asm.org/content/aem/62/3/865.full.pdf>. Consultada: 10 de octubre de 2018.
- 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: 10.1007/s00344-013-9362-4.
- Cisneros-Rojas, C.A., Sánchez-de Prager, M., Menjivar-Flores, J.C. 2017. Efecto de bacterias solubilizadoras de fosfatos sobre el desarrollo de plántulas de café. *Agronomía Mesoamericana* 28: 149-158. DOI: 10.15517/am.v28i1.22021.
- Corrales-Ramírez, L.C., Arévalo-Gálvez, Z.Y., Moreno-Burbano, V.E. 2014. Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *Nova (Colombia)* 12: 67-79. <http://unicolmayor.edu.co/publicaciones/index.php/nova/article/view/251/501>. Consultada: 7 de octubre de 2018.
- De la Fuente, L., Thomashow, L., Weller, D., Bajsa, N., Quagliotto, L., Chernin, L., Arias, A. 2004. *Pseudomonas fluorescens* UP61 isolated from birdsfoot trefoil rhizosphere produces multiple antibiotics and exerts a broad spectrum of biocontrol activity. *European Journal of Plant Pathology* 110: 671-681. DOI: 10.1023/B:EJPP.0000041569.35143.22.
- Dodd, I.C., Zinovkina, N.Y., Safronova, V.I., Belimov, A.A. 2010. Rhizobacterial mediation of plant hormone status. *Annals of Applied Biology* 157: 361-379. DOI: 10.1111/j.1744-7348.2010.00439.x.
- Ezziyyani, M., Pérez-Sánchez, C., Emilia, R.M., Rubio, L., Candela, M.E. 2004a. Biocontrol por *Streptomyces rochei* -Ziyani- de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología* 26: 69-78. <http://revistas.um.es/analesbio/article/view/30471/29651>. Consultada: 25 de enero de 2018.
- Ezziyyani, M., Pérez-Sánchez, C., Emilia, R.M., Sid, A.A., Candela, M.E. 2004b. Evaluación del biocontrol de *P. capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*. *Anales de Biología* 26: 61-68. <https://www.um.es/analesdebiologia/numeros/26/PDF/07-EVALUACION.pdf>. Consultada: 4 de enero de 2018.
- Flores-Zárate, M., Bautista-Cruz, A., Aragón-Cuevas, F., Martínez-Gallegos. 2018. Coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato y su efecto en la germinación y desarrollo del frijol. *Interciencia* 43: 137-143. https://www.interciencia.net/wp-content/uploads/2018/03/137-BAUTISTA-43_02.pdf. Consultada: 8 de octubre de 2018.
- Gupta, G., Singh, P.S., Kumar, A.N., Kumar, S.S., Singh, V. 2015. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *Microbial and Biochemical Technology* 7: 96-102. DOI: 10.4172/1948-5948.1000188.
- Gutiérrez-Mañero, F.J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehouchi, J., Tadeo, F.R., Talon, M. 2001. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins.

- Physiologia Plantarum 111: 206-211. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2001.1110211.x.
- Hedden, P., Thomas, S. G. 2012. Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochemical Journal* 444: 11-25. DOI: 10.1042/BJ20120245.
- Hernández-Suárez, M., Hernández-Castillo, F.D., Lira-Saldivar, R.H., Gallegos-Morales, G. 2010. Biocontrol de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* sp. con microencapsulados de *Bacillus subtilis* y su efecto en el crecimiento y rendimiento de tomate. *Revista Agraria Nueva Epoca* 7: 17-25. [http://www.uaaan.mx/agraria/attachments/articulo/54/Agraria_2010\(7\)1-3-2.pdf](http://www.uaaan.mx/agraria/attachments/articulo/54/Agraria_2010(7)1-3-2.pdf). Consultada: 1 enero de 2018.
- Hidayati, U., Chaniago, I.A., Munif, A., Siswanto., Santosa, D.A. 2014. Potency of plant growth promoting endophytic bacteria from rubber plants (*Hevea brasiliensis* Mull. Arg). *Journal of Agronomy* 13: 147-152. DOI: 10.3923/ja.2014.147.152.
- Jendoubi, W., Bouhadida, M., Boukteb, A., Béji, M., Kharrat, M. 2017. *Fusarium* wilt affecting chickpea crop. *Agriculture* 7: 23. DOI: 10.3390/agriculture7030023.
- Joo, G.J., Kim, Y.M., Lee, I.J., Song, K.S., Rhee I.K. 2004. Growth promotion of red pepper plug seedlings and the production of gibberellins by *Bacillus cereus*, *Bacillus macroides* and *Bacillus pumilus*. *Biotechnology Letters* 26: 487-491. DOI: 10.1023/B:BILE.0000019555.87121.34.
- Karlidag, H., Esitken, A., Turan, M., Sahin, F. 2007. Effects of root inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient element contents of leaves of apple. *Scientia Horticulturae* 114: 16-20. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.04.013>.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120. DOI: 0022--2844/80/0016/0111/~02.00.
- Ko, H.S., Tindwa, H., Jin, R.D., Lee, Y.S., Hong, S.H., Hyun, H.N., Nam, Y., Kim, K.Y. 2011. Investigation of siderophore production and antifungal activity against *Phytophthora capsici* as related to iron (III) nutrition by *Lysobacter antibioticus* HS124. *Korean Journal of Soil and Fertilizer* 44: 650-656. DOI: 10.7745/KJSSF.2011.44.4.650.
- Kumar, A., Prakash, A., Johri, B.N. 2011. *Bacillus* as PGPR in crop ecosystem. In: Maheshwari, D. K. (ed.). *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystem*. Springer-Verlag Berlín Heidelberg. pp. 37-59.
- Kundu, B.S., Nehra, K., Yadav, R., Tomar, M. 2009. Biodiversity of phosphate solubilizing bacteria in rhizosphere of chickpea, mustard and wheat grown in different regions of Haryana. *Indian Journal of Microbiology* 49: 120-127. DOI: 10.1007/s12088-009-0016-y.
- Landa, B.B., Navas-Cortés, J.A., Jiménez-Díaz, R.M. 2004. Integrated management of *Fusarium* wilt of chickpea with sowing date, host resistance, and biological control. *Phytopathology* 94: 946-960. DOI: 10.1094/PHYTO.2004.94.9.946.
- Leslie, J.F., Summerell, B.A. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing. Iowa, USA. 388 p.
- Liu, J., Gilardi, G., Sanna, M., Gullino, M.L., Garibaldi, A. 2010. Biocontrol of *Fusarium* crown and root rot of tomato and growth-promoting effect of bacteria isolated from recycled substrates of soilless crops. *Phytopathologia Mediterranea* 49: 163-171. <http://www.fupress.net/index.php/pm/article/view/3095/8146>. Consultada: 27 diciembre de 2018.
- Lopper, J.E., Scroth, M.N. 1986. Influence of bacterial sources on indole-3 acetic acid on root elongation of sugarbeet. *Phytopathology* 76: 386-389. DOI: 10.1094/Phyto-76-386.
- Madani, H., Malboobi, M.A., Bakhshkelarestaghi, K., Stoklosa, A. 2011. Biological and chemical phosphorus fertilizers effect on yield and P accumulation in rapessed (*Brassica napus* L.). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 40: 210-214. DOI: 10.15835/nbha4026079.
- Mohammadi, K. 2012. Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *Resources and Environment* 2: 80-85. DOI: 10.5923/j.re.20120201.10.
- Morales, G.J.A., Durón, N.L.J. 2004. Aspectos generales. In: Morales, G.J.A., Durón, N.L.J., Martínez, D.G., Núñez, M.D.J.H., Fu, C.A.A. (eds.). *El Cultivo de Garbanzo Blanco en Sonora*. Libro Técnico Núm. 6. INIFAP,

- Campo Experimental Costa de Hermosillo, Sonora, México. pp. 11-24.
- Morales, G.J.A., García, R.J. 2004. Enfermedades. *In*: Morales, G.J.A., Durón, N.L.J., Martínez, D.G., Núñez, M.D.J.H., Fu, C.A.A. (eds.). El Cultivo de Garbanzo Blanco en Sonora. Libro Técnico Núm. 6. INIFAP, Campo Experimental Costa de Hermosillo, Sonora, México. pp. 225-243.
- Morrone, D., Chambers, J., Lowry, L., Kim, G., Anterola, A., Bender, K., Peters, R.J. 2009. Gibberellin biosynthesis in bacteria: separate ent-copalyl diphosphate and ent-kaurene synthase in *Bradyrhizobium japonicum*. *FEBS Letters* 583: 475-480. DOI: 10.1016/j.febslet.2008.12.052.
- Murphy J., Riley, J.P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta* 27: 31-36. DOI: 10.1016/S0003-2670(00)88444-5.
- Nene, Y.L., Reddy, M.V., Haware, M.P., Ghanekar, A.M., Amin, K.S. 2012. Field diagnosis of chickpea diseases and their control. *Information Bulletin No. 28 (revised)*. Patancheru, A.P. 502 324, International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. India. 56 p.
- Noh, M.J., Yam, C.C., Borges, G.L., Zuñiga, A.J.J., Godoy, H.G. 2014. Aislados bacterianos con potencial biofertilizante para plántulas de tomate. *Terra Latinoamericana* 32: 273-281. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792014000400273. Consultada: 29 de noviembre de 2017.
- Omar, I., O'Neill, T.M., Rossall, S. 2006. Biological control of fusarium crown and root rot of tomato with antagonistic bacteria and integrated control when combined with the fungicide carbendazim. *Plant Pathology* 55: 92-99. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2005.01315.x.
- Orhan, E., Esitken, A., Ercisli, S., Turan, M., Sahin, F. 2006. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Scientia Horticulturae* 111: 38-43. DOI: 10.1016/j.scienta.2006.09.002.
- Ortiz-Castro, R., Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., López-Bucio, J. 2009. The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling and Behavior* 4: 701-712. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2801380/pdf/psb0408_0701.pdf. Consultada: 1 de enero de 2018.
- Oteino, N., Lally, R.D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K.J., Dowling, D.N. 2015. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in Microbiology* 6: 745. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00745.
- Paredes-Escalante, J.E., Carrillo-Fasio, J.A., García-Estrada, R.S., Allende-Molar, R., Sañudo-Barajas, J.A., Valdez-Torres, J.B. 2009. Microorganismos antagonistas para el control del complejo de hongos causantes de la rabia del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el estado de Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 27: 27-35. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61211414004>. Consultada: 26 de noviembre de 2018.
- Paredes-Mendoza, M., Espinosa-Victoria, D. 2010. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana* 28: 61-70. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57316076007>. Consultada: 27 de noviembre de 2017.
- Patel, T., Saraf, M. 2017. Biosynthesis of phytohormones from novel rhizobacterial isolates and their in vitro plant growth-promoting efficacy. *Journal of Plant Interactions* 12: 480-487. DOI: org/10.1080/17429145.2017.1392625.
- Probanza, A., Lucas, G.J.A., Ruiz, P.M., Ramos, B., Gutiérrez, M.F.J. 2002. *Pinus pinea* L. seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR *Bacillus* (*B. licheniformis* CECT 5106 and *B. pumilus* CECT 5105). *Applied Soil Ecology* 20: 75-84. DOI: 10.1016/S0929-1393(02)00007-0.
- Reyes, R.A., Ruiz, S.E., Yam, C.C., Dzul, C.M. 2011. Selección de *Bacillus* spp., con actividad antagonista *in vitro* contra *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en diferentes medios de cultivo. *Fitosanidad* 15: 117-121. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209122297007>. Consultada: 24 de noviembre de 2017.
- Rios-Velasco, C., Caro-Cisneros, J.N., Berlanga-Reyes, D.I., Ruíz-Cisneros, M.F., Ornelas-Paz, J.J., Salas-Marina, M.A., Villalobos-Pérez, E., Guerrero-Prieto, V.M. 2016.

- Identification and antagonistic activity *in vitro* of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34: 84-99. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1507-1.
- Saha, M., Sarkar, S., Sarkar, B., Sharma, B.K., Bhattacharjee, S., Tribedi, P. 2016. Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environmental Science Pollution Research* 23: 3984-3999. DOI: 10.1007/s11356-015-4294-0.
- Santoyo, G., Valencia-Cantero, E., Orozco-Mosqueda, M.C., Peña-Cabriales J.J., Farías-Rodríguez, R. 2010. Papel de los sideróforos en la actividad antagónica de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 hacia hongos fitopatógenos. *Terra Latinoamericana* 28: 53-60. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57316076006>. Consultada: 24 noviembre de 2017.
- Santos-Villalobos, S., Barrera-Galicia, G.C., Miranda-Salcedo, M.A., Peña-Cabriales, J.J. 2012. *Burkholderia cepacia* XXVI siderophore with biocontrol capacity against *Colletotrichum gloeosporioides*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28: 2615-2623. DOI: 10.1007/s11274-012-1071-9.
- SAS Institute. 2003. SAS/STAT User's Guide Release 9.1. SAS Institute. Cary, NC, USA.
- Schwyn, B., Neilands, J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160: 47-56. DOI: 10.1016/0003-2697(87)90612-9.
- Seshachala, U., Tallapragada, P. 2012. Phosphate solubilizers from the rhizosphere of *Piper nigrum* L. in Karnataka, India. *Chilean Journal of Agricultural Research* 72: 397-403. DOI:10.4067/S0718-58392012000300014
- Shahzad, R., Waqas, M., Latif, K.A., Asaf, S., Aaqil, K.M., Kang, S-M., Yun, B-W., Lee, I-J. 2016. Seed-borne endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 produces gibberellins and regulates endogenous phytohormones of *Oryza sativa*. *Plant Physiology and Biochemistry* 106: 236-243. DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.05.006.
- Shanmugaiah, V., Nithya, K., Harikrishnan, H., Jayaprakashvel, M., Balasubramanian, N. 2015. Biocontrol mechanisms of siderophores against bacterial plant pathogens. In: Rajesh, K.V., Kurtulus, B.K. (eds.). *Sustainable Approaches to Controlling Plant Pathogenic Bacteria*. CRC Press. pp. 167-186. DOI: 10.1201/b18892-9
- Shi, T., Reeves, R.H., Gilichinsky, D.A., Friedmann, E.I. 1997. Characterization of viable bacteria from Siberian permafrost by 16S rDNA sequencing. *Microbial Ecology* 33: 169-179.
- SIAP (Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2017. Avance de siembras y cosechas, resumen nacional por cultivo. <https://www.gob.mx/siap/>. Consultada: 22 de agosto de 2017.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., Thompson, J.D., Higgins, D.G. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology* 7: 539. DOI: 10.1038/msb.2011.75.
- Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S., Dijst, G. 1996. *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular, Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. 578 p.
- Tejera-Hernández, B., Heydrich-Pérez, M., Rojas-Badía M.M. 2013. Aislamiento de *Bacillus* solubilizadores de fosfatos asociados al cultivo del arroz. *Agronomía Mesoamericana* 24: 357-364. <http://www.scielo.sa.cr/pdf/am/v24n2/a12v24n2.pdf>. Consultada: 24 de enero de 2018.
- Tortora, M.L., Díaz-Ricci, J.C., Pedraza, R.O. 2011. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Archives of Microbiology* 193: 275-286. DOI: 10.1007/s00203-010-0672-7.
- Trujillo, I., Díaz, A., Hernández, A., Heydrich, M. 2007. Antagonismo de cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia* contra hongos fitopatógenos del arroz y el maíz. *Revista Protección Vegetal* 22: 41-46. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v22n1/rpv06107.pdf>. Consultada: 4 diciembre de 2017.
- Valencia-Cantero, E., Villegas-Moreno, J., Sánchez-Yañez, J.M., Peña-Cabriales, J.J., Farías-Rodríguez, R. 2005. Inhibición de *Fusarium oxysporum* por cepas mutantes de *Pseudomonas fluorescens* Zum80 incapaces de producir sideróforos. *Terra Latinoamericana* 23: 81-88.
- Vikram, A., Alagawadi, A.R., Hamzehzarghani, H., Krishnaraj, P.U. 2008. Efficacy of phosphate solubilizing bacteria on the yield and phosphorus uptake of green gram (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *The Americas Journal*

- of Plant Science and Biotechnology 2: 80-84. [http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/0812/AmJPSB_2\(1&2\)/AmJPSB_2\(2\)80-84o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/0812/AmJPSB_2(1&2)/AmJPSB_2(2)80-84o.pdf). Consultada: 14 de enero de 2017.
- Yu, X., Ai, C., Xin, L., Zhou, G. 2011. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a bioncontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. European Journal of Soil Biology 47: 138-145. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2010.11.001. Consultada: 24 diciembre de 2017.
- Zemouli-Benfreha, F., Djamel-eddine, H., Merzoug, A. 2014. *Fusarium* wilt of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) in north-west Algeria. African Journal of Agricultural Research 9: 168-175. DOI: 10.5897/AJAR2013.6694