



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

Área Temática: Fisiología y Genética Vegetal

FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA "PRESIDENTE JUÁREZ"

T E S I S

***Pseudomonas fluorescens* Y SU EFECTO EN LA TOLERANCIA DE
ARÁNDANO A HONGOS FITOPATÓGENOS**

Que como requisito para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta:

José Alonso Álvarez García

Tutor: Doctora en Biotecnología de Plantas

Dra. Ma. del Carmen Rocha Granados

Cotutor: Doctor en Ciencias

Dr. Gustavo Santoyo Pizano

Uruapan, Michoacán, México. Julio 2017



**El presente trabajo se realizó en el
Laboratorio de Fisiología Vegetal y el
Invernadero de Frutillas de la Facultad de
Agrobiología “Presidente Juárez” de la
Universidad Michoacana de San Nicolás de
Hidalgo**

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT, por el apoyo brindado durante el desarrollo del proyecto y por motivar la formación de nuevos profesionistas que sean competitivos.

A la Dra. Ma. del Carmen Rocha Granados por confiar y dedicar su tiempo a este proyecto. Mi agradecimiento y respeto por todo el apoyo brindado, por ser estusiasta en su trabajo, innovadora y por promover la investigación.

A la mesa de sinodales, el Dr. José López Medina, el Dr. Gustavo Santoyo Pizano, a la Dra. Patricia Delgado Valerio y a la Dra. Tztzqui Chávez Barcenás, por sus valiosas aportaciones para el enriquecimiento del proyecto.

A mi esposa Susana, por estar a mi lado apoyándome en buenos y malos momentos, y motivarme a cumplir nuestras metas.

A mis padres por darme la vida y coadyuvar en lograr nuestros objetivos tanto profesionales como personales.

A mis hermanos por ser la fuerza para seguir adelante.

Al Dr. Patricio por apoyarme en el proyecto y brindar un espacio de su tiempo.

A mis compañeros de laboratorio que hicieron pasar momentos agradables y hacer mucho más rápida la estancia.

Al Dr. Mauricio Schoebitz quien me recibió con toda la amabilidad, tiempo y espacio durante la estancia de investigación en Concepción, Chile. Mi respeto y admiración por compartir todos sus conocimientos.

A mis amigos que han sido parte de mi formación y quienes me motivan a seguir adelante día a día.

DEDICATORIAS

A Dios por permitirme levantarme día a día y seguir adelante.

A mi esposa Susana, por apoyarme, motivarme y acompañarme durante cada etapa de mi vida. Hemos logrado cumplir una etapa más de nuestra formación profesional y quiero estar contigo para cumplir todas nuestras metas que hemos planeado.

A mis padres quienes a pesar de todas las circunstancias nos sacaron adelante.

A mis hermanos quienes forman parte de mi vida y que son la fuerza para no dejarme vencer.

A mis amigos por motivarme y apoyarme durante los diferentes procesos que hemos cruzado.

CONTENIDO

CONTENIDO.....	i
ÍNDICE DE CUADROS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ABSTRACT.....	v
RESUMEN.....	vii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. .REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Origen y distribución del arándano.....	4
2.1.1. Especies de importancia económica.....	5
2.1.2. <i>Vaccinium</i> sp.....	5
2.2. Principales enfermedades del cultivo.....	6
2.3. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal.....	9
2.3.1. Principales mecanismos de acción.....	10
2.3.1.1. Fitohormonas.....	10
2.3.1.2. Controladoras de estrés.....	10
2.3.1.3. Competencia por el hierro y producción de sideróforos.....	11
2.3.1.4. Antibiosis.....	12
2.3.1.5. Inducción de resistencia en plantas.....	12
2.3.1.6. Producción de enzimas líticas.....	14
2.4. <i>Pseudomonas fluorescens</i> Migula.....	14
III. MATERIALES Y METODOS.....	15
3.1. Confrontaciones <i>in vitro</i>	15
3.1.1. Material biológico.....	15
3.1.2. Tiempos de exposición.....	16
3.1.3. Diseño experimental.....	16
3.2. Tolerancia de arándano a hongos fitopatógenos.....	17
3.2.1. Ubicación del experimento.....	17
3.2.2. Material biológico.....	17
3.2.3. Cinética de crecimiento bacteriano.....	18
3.2.4. Cuantificación de unidades formadoras de colonias por	

	mililitro.....	18
	3.2.5. Inoculación de las plantas de arándano con <i>P. fluorescens</i> y hongos fitopatógenos.....	20
	3.2.6. Diseño experimental.....	21
	3.2.7. Parametros a evaluar.....	22
	3.2.8. Analisis de datos.....	24
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
	4.1. Confrontaciones <i>in vitro</i> a las 0 hrs.....	25
	4.1.1. Reto 1:4.....	25
	4.1.2. Reto 1:1.....	27
	4.2. Confrontaciones <i>in vitro</i> a 24 hrs.....	28
	4.3. Respuesta de arándano a la interacción de <i>P. fluorescens</i> y hongos fitopatógenos.....	30
	4.3.1. Cinética de crecimiento bacteriano.....	30
	4.3.2. Unidades formadoras de colonias por mililitro.....	31
	4.3.3. Efecto de las interacciones entre las variables.....	32
	4.3.4. Interacciones entre arándano, hongos fitopatógenos y las cepas de <i>P. fluorescens</i>	34
	4.3.5. Síntomas visuales en cv. Biloxi.....	44
	4.3.6. Determinación de inoculación eficiente de microorganismos en cv. Biloxi.....	46
	4.3.7. Sintomas visuales en selección UM811.....	47
	4.3.8. Determinación de inoculación eficiente de microorganismos en la selección UM811.....	49
	4.3.8.1. Identificación de bacterias por restricción enzimática.....	50
V.	CONCLUSIONES.....	51
VI.	LITERATURA CITADA	52

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		PAG.
1	Tratamientos de inhibición <i>in vitro</i> con <i>Pseudomonas fluorescens</i> .	17
2	Tratamientos de las interacciones entre genotipo, hongo fitopatógeno y cepas de <i>P. fluorescens</i> .	22
3	Fórmulas para determinar la concentración de clorofila.	23
4	Periodo de incubación para lograr la fase exponencial y estacionaria de las cepas de <i>P. fluorescens</i> .	31
5	Uniades formadoras de colonias por mililitro.	31
6	Análisis de varianza de la concentración de clorofila (CC), altura de la planta (AP), diámetro del tallo (DT), número de brotes (NB), peso seco de raíz (PSR) y peso seco del área foliar (PSF), en función del genotipo, hongo fitopatógeno y cepa de <i>P. fluorescens</i> .	32
7	Análisis de la concentración de clorofila (CC), altura de la planta (AP), diámetro del tallo (DT), número de brotes (NB), peso seco de raíz (PSR) y peso seco del área foliar (PSF), en respuesta a los factores de manera independiente.	34
8	Altura de la planta, diámetro del tallo y número de brotes de plantas de arándano, en función del genotipo interactuando con hongos fitopatógenos y cepas de <i>P. fluorescens</i> .	38
9	Microorganismos aislados en muestras de plantas de arándano cv. Biloxi.	46
10	Microorganismos aislados en muestras de plantas de arándano selección UM811.	49

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PAG.
1	Pedigrí de cv. Biloxi.	6
2	Protocolo para la cuantificación de Unidades Formadoras de Colonias por Mililitro (UFC).	20
3	Inhibición <i>in vitro</i> de hongos fitopatógenos por cepas de <i>P. fluorescens</i> , reto 1:4.	26
4	Crecimiento micelial de hongos fitopatógenos ante <i>P. fluorescens</i> , reto 1:4.	26
5	Confrontación <i>in vitro</i> de fitopatógenos de arándano a causa de <i>P. fluorescens</i> , reto 1:1.	27
6	Crecimiento micelial de hongos fitopatogenos ante <i>P. fluorescens</i> , reto 1:1.	28
7	Confrontaciones realizadas a diferentes tiempos con las cepas de <i>P. fluorescens</i> y los hongos fitopatógenos, reto 1:4.	29
8	Confrontaciones realizadas a diferentes tiempos con las cepas de <i>P. fluorescens</i> y los hongos fitopatógenos, reto 1:1.	30
9	Concentración de clorofila total (CC) en dos genotipos de arándano, cv. Biloxi y selección UM811.	36
10	Peso seco de raíz (PSR) en los dos genotipos de arándano, cv. Biloxi y selección UM811.	40
11	Peso seco del área foliar (PSF) en los dos genotipos de arándano, cv. Biloxi y selección UM811.	41
12	Respuesta morfológica de la interacción entre arándano cv. Biloxi y los micrororganismos.	45
13	Respuesta morfológica de la interacción entre arándano selección UM811 y los microorganismos.	48
14	Restricción enzimática con EcoR1 & HindIII.	50

ABSTRACT

The blueberry is a relative young crop in Mexico, it is cultivated from the beginning of the year 2000 and since then it has grown gradually. Currently in Mexico are harvested 15.489 tonnes per year, Michoacán occupies the fourth place in production while Jalisco is located in the first place (SIAP, 2015). The main problems arise for those diseases in plants that have the greatest incidence from the second year and if they do not addressed properly can lead to the destruction of while plantation. These diseases are mainly caused by pathogens that attack the root, such as *Phytophthora cinnamomi*, *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. and *Armillaria mellea*. *Pseudomonas fluorescens*, is considered one of the most competitive PGPB and that can be a solution for the control of phytopathogenic microorganisms. In the present investigation are shows the results of the interaction between blueberry (*Vaccinium* sp.), four strains of *P. fluorescens* and three fungal pathogens. First tests were carried out *in vitro* inhibition among the strains of *P. fluorescens* U16, U240, U256, U270 and the pathogenic fungi *Phytophthora cinnamomi*, *Fusarium* sp., and *Phomopsis vaccinii*, where after six days of analysis and assessment at different times to be able to obtain relevant data. The results obtained show that there is a degree of *in vitro* inhibition against *P. cinnamomi* and *Fusarium* sp. of 75 and 18%, respectively, pathogens that attack the roots of the plants; however, *P. fluorescens* not inhibit to *Phomopsis vaccinii*. Subsequently, were inoculated strains of *P. fluorescens* in blueberry plants cv. Biloxi and the selection UM811 using a bacterial suspension, after 45 days the phytopathogenic fungi was inoculated using a suspension of conidia. They were analyzed for a period of five months under greenhouse conditions, evaluating a total of eight variables to determining the best strain where the plant gets a normal physiological development. The results show that the strains of *P. fluorescens* help to the normal development of the blueberry plants cv. Biloxi and selection UM811. The strains U16, U240 and U270 are those that have a greater impact on the evaluated variables, alone or in interaction with the phytopathogens, plants showed an increase in the concentration of total chlorophyll in a 48%, the height of the plants in a 47%, and a 26% in the stem diameter, the dry weight of the root in a

64% and the dry weight of the leaf area in a 36%, compared with the control plants. In general, the plants inoculated with different strains of *P. fluorescens* achieved a proper development, even in the presence of phytopathogens.

Key Word: Blueberry, phytopathogens, *in vitro*, *P. fluorescens*, inoculation.

RESUMEN

El arándano es un cultivo joven en México, cultivándose desde principios del año 2000 y que ha crecido desde entonces gradualmente. Actualmente en México se cultivan 15,489 toneladas, Michoacán ocupa el cuarto lugar en producción mientras que Jalisco se ubica en primer lugar (SIAP, 2015). Los principales problemas surgen por las enfermedades en las plantas que tienen su mayor incidencia a partir del segundo año y si no son atendidas de manera correcta pueden llegar a destruir la plantación. Estas enfermedades son causadas principalmente por fitopatógenos que atacan la raíz, tales como *Phytophthora cinnamomi*, *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. y *Armillaria mellea*. *Pseudomonas fluorescens*, es considerada una de las PGPB con mayor competitividad y que puede ser una solución para el control de microorganismos fitopatógenos. En el presente trabajo de investigación se muestran los resultados de la interacción entre arándano (*Vaccinium* sp.), cuatro cepas de *P. fluorescens* y tres hongos fitopatógenos. Primeramente se realizaron pruebas de inhibición *in vitro* entre las cepas de *P. fluorescens* UM16, UM240, UM256, UM270 y los hongos fitopatógenos *Phytophthora cinnamomi*, *Fusarium* sp., y *Phomopsis vaccinii*, donde después de seis días de análisis y evaluaciones a diferentes tiempos se lograron obtener datos relevantes. Los resultados obtenidos demuestran que existe un grado de inhibición *in vitro* contra *P. cinnamomi* y *Fusarium* sp. de 75 y 18%, respectivamente, patógenos que atacan la raíz de las plantas, sin embargo, *P. fluorescens* no inhibe a *Phomopsis vaccinii*. Posteriormente, se inocularon las cepas de *P. fluorescens* en plantas de arándano cv. Biloxi y la selección UM811 mediante el riego de una suspensión bacteriana, transcurridos 45 días se inoculó el hongo fitopatógeno aplicando una suspensión de conidios. Se analizaron por un periodo de cinco meses bajo invernadero, evaluando un total de ocho variables para determinar la mejor cepa que logra el desarrollo fisiológico normal de la planta. Los resultados demuestran que las cepas de *P. fluorescens* favorecen el desarrollo normal de las plantas de arándano cv. biloxi y selección UM811. Las cepas UM16, UM240 y UM270 son las que tienen mayores efectos en las variables evaluadas, solas o en interacción con los hongos fitopatógenos, las

plantas presentaron un incremento en la concentración de clorofila total en un 48%, la altura de las plantas en un 47%, y un 26% en el diámetro del tallo, el peso seco de la raíz en un 64% y el peso seco del área foliar en un 36%, comparado con las plantas testigo. De manera general, las plantas inoculadas con las diferentes cepas de *P. fluorescens* lograron un desarrollo adecuado, aun en la presencia de hongos fitopatógenos.

Palabras Clave: Arándano, fitopatógenos, *in vitro*, *P. fluorescens*, inoculación.

I. INTRODUCCIÓN

El arándano azul (*Vaccinium* sp), perteneciente a la familia de las *Ericaceae*, es nativo de los Estados Unidos y es considerado un cultivo de alto valor agronómico que puede crecer en suelos ácidos, poco drenados los cuales son considerados no aptos para otros cultivos (Ratnaparkhe, 2007). Otra característica por la cual se considera importante, es debido a su valor nutrimental, ya que es uno de los frutos más ricos en antioxidantes (Alkharouf *et al.*, 2007). Su fruto se utiliza en una amplia variedad de formas como: repostería, yogurt, helado, para preparación de *muffins*, panques, cereales y como fruto fresco (Caruso y Ramsdell, 1995; Hancock *et al.*, 2008). En México, los principales estados productores son Jalisco, Colima y Michoacán con un superficie de 853 ha que equivale al 74% de la superficie total con un rendimiento promedio de 8 ton.ha⁻¹ (SIAP, 2012).

Con relativamente poco tiempo en el país, las plantaciones actuales del arándano ya manifiestan problemas fitosanitarios. Es atacado por hongos, bacterias y virus. Entre los hongos que mayormente lo afectan se encuentran el tizón de puntas (*Phomopsis* sp.), cáncer de tallo (*Botryosphaeria carticis*) y tizón de tallo (*Botryosphaeria dothidea*). A nivel de raíz la planta es atacada por una serie de hongos que provocan pudriciones como *Phytophthora cinnamomi* y *Fusarium* sp. Los síntomas que presentan son amarillamiento, defoliación, reducción del crecimiento y coloración rojiza, *Armillaria mellea* provoca pobre crecimiento, hojas pequeñas, cloróticas y ramas marchitas (Luby *et al.*, 1991).

Para su control se usan una serie de agroquímicos tales como Ridomil®, Telone® y bromuro de metilo, entre otros, productos que afectan de manera significativa la microbiología del suelo, además de que los patógenos desarrollan resistencia a estos productos y tienen un fuerte impacto ambiental (De Weger *et al.*, 1995; Gerhardson, 2002). Asimismo, el creciente costo de pesticidas y la demanda del consumidor por productos libres de pesticidas han llevado a la sustitución de estos productos. El control biológico es considerado una alternativa para reducir el uso de agroquímicos en la agricultura (Postma *et al.*, 2003; Welbaum *et al.*, 2004).

Se ha reportado el uso de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV o PGPB) como una alternativa para el control de hongos fitopatógenos, al colonizar rápidamente las raíces de las plantas y producir antibióticos (Saharan y Nehra, 2011). Entre las especies de PGPB se han identificado a *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Entobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Serratia*, las cuales promueven el crecimiento de las plantas, mejoran la adquisición de nutrientes y suprimen organismos patógenos que provocan enfermedades (Joseph *et al.*, 2007). *Pseudomonas fluorescens* es una bacteria ubicua en suelos agrícolas y efectiva en mantener la buena salud de los suelos, siendo metabólicamente y funcionalmente más diversas (Lata *et al.*, 2002). Se ha observado que pueden suprimir una gran cantidad de bacterias, hongos y nematodos, usándose para el control de organismos patógenos y biofertilización (Siddiqui, 2006). Algunas cepas de *P. fluorescens* poseen características que la hacen idóneas para su uso en el biocontrol, ya que produce un amplio espectro de metabolitos activos como antibióticos, sideróforos, compuestos volátiles y sustancias promotoras de crecimiento, además de competir agresivamente con otros microorganismos y adaptarse al estrés del medio ambiente (Weller, 2007; Weller *et al.*, 2002).

Dadas las características que presenta *P. fluorescens* se ha propuesto el presente trabajo de investigación, bajo las siguientes hipótesis:

Hipótesis

1. *Pseudomonas fluorescens* produce una diversidad de compuestos volátiles, mismos que favorecen su antagonismo *in vitro* contra microorganismos patógenos.
2. Las cepas de *P. fluorescens* proporcionan tolerancia a especies vegetales, ante la presencia de hongos fitopatógenos.

Objetivo general

Identificar la cepa de *Pseudomonas fluorescens* que inhiba el crecimiento *in vitro* de tres hongos fitopatógenos.

Estudiar la tolerancia de arándano (*Vaccinium* sp.) cv. Biloxi y selección UM811 a hongos fitopatógenos, influenciada por *Pseudomonas fluorescens*.

Objetivos específicos

- Evaluar la inhibición *in vitro* de cuatro cepas de *Pseudomonas fluorescens* (UM16, UM240, UM256 y UM270) contra *Phytophthora cinnamomi*, *Fusarium* sp., y *Phomopsis vaccinii*.
- Determinar la mejor cepa que conceda tolerancia a arándano cv. Biloxi y selección UM811, en interacción con hongos fitopatógenos.
- Identificar la mejor interacción que logre el desarrollo fisiológico de las plantas de arándano.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

El arándano azul (*Vaccinium* sp), perteneciente a la familia de las *Ericaceae*, es nativo de los Estados Unidos y es considerado un cultivo de alto valor agronómico que puede crecer en suelos ácidos, poco drenados los cuales son considerados no aptos para otros cultivos (Ratnaparkhe, 2007). Otra característica por la cual se considera importante, es debido a su valor nutrimental, ya que es uno de los frutos más ricos en antioxidantes (Alkharouf *et al.*, 2007). Su fruto se utiliza en una amplia variedad de formas como: repostería, yogurt, helado, para preparación de *muffins*, panques, cereales y como fruto fresco (Caruso y Ramsdell, 1995; Hancock *et al.*, 2008). En México, los principales estados productores son Jalisco, Colima y Michoacán con un superficie de 853 ha que equivale al 74% de la superficie total con un rendimiento promedio de 8 ton.ha⁻¹ (SIAP, 2012).

2.1. Origen y distribución del arándano

El arándano (*Vaccinium* sp.) es nativo del este de Estados Unidos (Lim, 2012), fue domesticado a inicios del siglo XX cuando se extrajeron plantas de su medio silvestre y se trasplantaron a campos de los Estados de Nueva Inglaterra y Florida (Song y Hancock, 2011).

El género *Vaccinium* se caracteriza por poseer desde arbustos pequeños hasta árboles altos; hojas pecioladas o subsesiles, alternas, generalmente pequeñas y persistentes, coriáceas o rara vez membranáceas, anteras o aserradas; sus flores son pequeñas, blancas o rojizas, se encuentran en racimos o en fascículos axilares o terminales, rara vez solitarias, con brácteas; corola globosa a turbinada, con 4 o 5 lóbulos cortos o largos, estambres de 8 a 10, libres, filamentos cortos generalmente pubescentes; anteras con o sin apéndices, de dehiscencia poricida; ovario ínfero sobre un disco pulvinado o convexo, glabro o piloso, con 4 o 5 lóculos y varios óvulos en cada lóculo; estilo recto; estigma diminuto, simple o discretamente capitado, fruto en forma de baya subglobosa; semillas pequeñas o diminutas, comprimidas, ovoides o reniformes, la testa coriácea, el endospermo carnoso. Alrededor de 140 especies ampliamente distribuidas, principalmente en regiones de clima templado y en las montañas tropicales (Rzedowski y Calderon de Rzedowski, 2001).

Actualmente el cultivo del arándano se ha introducido en los estados de Columbia Británica (Canadá), Washington (USA), y otras partes del mundo como Gran Bretaña, Rusia, Sudáfrica, Japón, Corea, Nueva Zelanda, Australia, México y Uruguay (Lim, 2012). A principios del 2000 hubo otro auge de siembra de arándano, y California emergió por primera vez como un importante estado creciente de esta frutilla, junto con México. En México la superficie sembrada de arándano, reportada por SIAP (2015), es de 15,489 Ha, ubicando a Michoacán como el cuarto lugar en producción, mientras que Jalisco se ubica en el primer lugar.

2.1.1. Especies de importancia económica

El arándano azul se ha convertido en un cultivo internacional, ya que actualmente la superficie sembrada se ha incrementado considerablemente, debido a que la producción se ha expandido a nuevas regiones (Retamales y Hancock, 2012). El mayor incremento de este cultivo ha ocurrido en los últimos 10 a 20 años, debido a que es una fuente importante de antioxidantes para el ser humano; esta característica se le atribuye por su alta concentración de componentes fenólicos, particularmente antocianinas, característica que ha contribuido al crecimiento del cultivo (Colin y Bruce, 2002). Comercialmente, el arándano es uno de los cultivos con mayor importancia mundial: para el 2001 se producían 56,511 ton; para el 2011 la producción aumentó a 356,533 ton, lo que representa un incremento del 630% en tan sólo 10 años.

Las especies de mayor importancia económica son las de tipo arbustivo: *Vaccinium angustifolium* Alton (arándano bajo o “lowbush”); *V. ashei* Reade (arándano ojo de conejo o “rabbiteye”); *V. corymbosum* L. (arándano arbustivo del norte o “highbush”) y *Vaccinium* sp. (arándano arbustivo del sur), también considerado como como “highbush”, pero que se caracterizan por sus bajos requerimientos de frío y sus producciones tempranas (Galleta y Ballington, 1996).

2.1.2. *Vaccinium* sp.

Vaccinium sp. cv. Biloxi es el principal cultivar de arándano producido en México; éste es un arbusto alto del sur, tetraploide y fue desarrollado por el Servicio de Investigación Agrícola del Departamento de Estados Unidos de la cruce entre el cultivar Sharpeblue y US329 (Figura 1) (Spiers y Stringer, 2002).

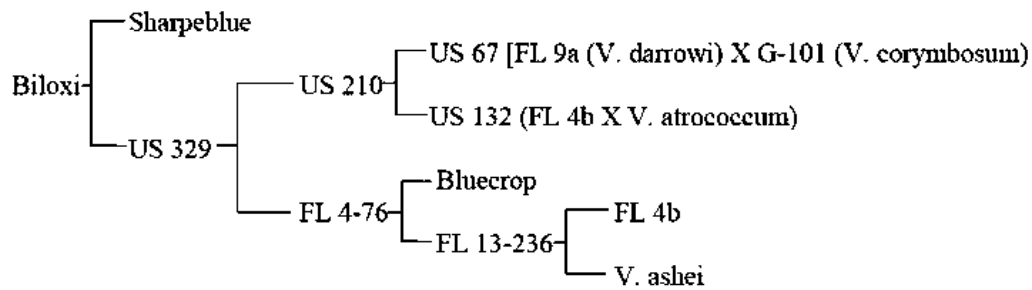


Figura 1. Pedigrí de cv. Biloxi.

En general, las raíces del arándano tienen un aspecto fibroso y se distribuyen superficialmente, entre las raíces y la parte aérea se encuentra la corona que tiene la capacidad de emitir brotes. La altura de la plantas llega hasta los 2.5 metros. Las yemas vegetativas de las cuales se originan las hojas y las flores se distribuyen a lo largo de la rama en forma separada; las hojas son simples, de forma ovada a lanceolada y caducas; las flores son blancas ubicadas en racimos y colgadas (Galleta y Ballington, 1996). Los tallos son rectos, vigorosos y productivos. La fruta madura temprano, con tamaño mediano, buen color, firmeza y sabor. Este cultivar de bajo requerimiento de frío fue lanzado en 1998 para la producción en las llanuras costeras del sureste de los Estados Unidos y para facilitar su polinización requiere de otros arándanos del mismo tipo, como cultivares Climax y Misty. Los frutos de cv. Biloxi tienen un peso medio de 1.47 g, con un contenido de sólidos solubles de 13.4%, pH 3.2, acidez titulable de 0.97%, la relación de sólidos solubles/acidez titulable es igual a 13.97 (Spiers y Stringer, 2002).

2.2. Principales enfermedades del cultivo

El arándano puede ser atacado por hongos, bacterias y virus. La mayoría de las enfermedades pueden variar en severidad de una región de cultivo a otra (Galleta y Ballington, 1996). Entre los hongos que mayormente lo afectan se encuentran el tizón de puntas provocada por los hongos *Phomosis* sp. y el cáncer de tallo

(*Botryosphaeria dothidea*): a nivel de raíz la planta es atacada por una serie de hongos que provocan pudriciones como *Phytophthora cinammomi* y *Fusarium* sp., los cuales ocasionan síntomas en las plantas como amarillamiento, falta de crecimiento en nuevos brotes, reducción de crecimiento, coloración rojiza y defoliación; también se presenta *Armillaria mellea*, el cual provoca pobre crecimiento, hojas pequeñas y cloróticas, ramas marchitas y rizomorfos (Luby *et al.*, 1991; Rebollar-Alviter, 2013).

Se han identificado 12 hongos asociados a la parte aérea del arándano en la región de Los Reyes, Mich. En los frutos se observaron dos tipos de síntomas: pudrición seca (*Alternaria* sp.) y pudrición suave (*Colletotrichum* sp.). En hojas se observaron cinco tipos de síndromes: mancha plateada (*Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Neofusicoccum* sp. y *Stemphyllium* sp.), mancha cobriza (*Colletotrichum* sp., *Phyllosticta* sp.), tizón foliar (*Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp.). En los tallos se detectaron tres enfermedades: entre ellas tizón del tallo (*Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp.), costra del tallo (*Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp.) y cancro (*Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Neofusicoccum* sp., *Phoma* sp., *Phomopsis* sp.). En las yemas se observaron dos tipos de síntomas: tizón de yemas (*Bipolaris* sp., *Chaetomium* sp., *Phoma* sp.) y cancro de yemas (*Colletotrichum* sp.) (Mondragón-Flores *et al.*, 2012).

Phomopsis vaccinii fue reportado en los Estados Unidos de América por primera vez en 1924, demostrando su patogenicidad en arándano (Wilcox, 1939 y 1940). Es un hongo distribuido en todas las zonas de arándano del país, y la sintomatología puede variar entre localidades, dependiendo de las variedades y condiciones ambientales (Milholland y Meyer, 1984). La sintomatología informada corresponde a un atizonamiento y muerte regresiva de ramillas de 1 y 2 años, canchros y muerte regresiva, pudriciones de frutos a la cosecha. En su fase anamórfica, el hongo presenta dos tipos de conidias, denominadas alfa y beta, las cuales pueden presentarse solas o simultáneamente en el picnidio. El teleomorfo de *P. vaccinii* corresponde a *Diaporthe vaccinii* Shear (Wilcox, 1940). Se ha determinado que el hongo *Phomopsis vaccinii*, está presente en las variedades de

arándano alto, Atlantic, Berkely, Elliot, Early Blue, Blueetta, Bluejay, Blueray, Collins, Concord, Coville, Rancocas, Stanle, Bluecrop, Herbert, Jersey, Northland y Patriot, todas las plantas afectadas mostraban como síntoma prevalente atizonamiento y muerte regresiva de ramillas. El estado perfecto de *P. vaccinii*, que corresponde a *Diaporthe vaccinii*, fue ocasionalmente detectado en ramillas de dos años, de algunas variedades de arándano alto (Guerrero y Godoy, 1989).

Los síntomas causados por *Phytophthora* spp. en arándano se observan como amarillamiento de hojas, defoliación temprana, necrosis de raíces y decoloración vascular y de los tallos (Raniere, 1961). Actualmente, sólo *Phytophthora cinnamomi* se ha descrito como un patógeno importante que causa la pudrición de raíces de arándano; los síntomas incluyen amarillamiento o enrojecimiento de hojas, el cese del crecimiento, defoliación, necrosis marginal y la muerte de hojas terminales y cañas (Brannen *et al.*, 2007). Cuando es afectado por patógenos, el sistema radicular se observa pequeño, oscuro y con necrosis (Bryla y Linderman, 2007). *Phytophthora cinnamomi* y *P. citrophthora* causan pudrición del cuello y raíces de arándano, referente a las inoculaciones con *Phytophthora cinnamomi* en arándano cv. Biloxi y Elliot mostraron disminución en la altura de la planta en comparación con las plantas no inoculadas, Biloxi también presentó menor diámetro del tallo principal, sin embargo, los cultivares Bluecrop, Briggita y Duke presentaron disminución en el peso fresco de la raíz. El cv. Toro fue resistente a *P. cinnamomi*, mientras que los cultivares Elliot y Toro mostraron resistencia a *P. citrophthora*, siendo el cv. Biloxi el más afectado por *P. citrophthora* (Larach *et al.*, 2009). *Phomopsis vaccinii* Shear provoca en arándano el atizonamiento de brotes, necrosis, marchitez foliar y floral (Barriga, 1991).

Para el control de enfermedades se utilizan una serie de productos, como Ridomil, Telone y Bromuro de metilo; entre otros, que afectan de manera significativa la microbiología del suelo. Al respecto, en arándano se han aislado cepas de *Botrytis cinérea* que muestran resistencia a la aplicación de benomilo. Al utilizar distintas concentraciones de este compuesto (0; 0.5; 1; 5 y 10 µg i.a./mL de medio), se mostró que 9 de 14 cepas de *B. cinerea* crecieron con las concentraciones más

altas, y las restantes cepas fueron inhibidas en su crecimiento a partir de 0.5 µg de i.a. del producto. Mediante técnicas moleculares, 8 de las 14 cepas analizadas presentaron mutación al sustitución una adenina por una citosina, originando cepas altamente resistentes a benomilo, mientras que las 6 cepas restantes no la presentan (Pérez D., 2004).

En los últimos años se han buscado alternativas más biológicas como es el uso de *Trichoderma harzianum* (Papavizas *et al.*, 1982). Más recientemente se ha reportado el uso de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPB) como una alternativa para el control de hongos fitopatógenos, al colonizar rápidamente las raíces de las plantas y producir antibióticos que atacan a los hongos fitopatógenos (Saharan y Nehra, 2011).

2.3. Bacterias promotoras de crecimiento vegetal

Las bacterias del suelo son importantes en los ciclos biogeoquímicos y tienen un uso importante en la producción agrícola. Se ha descrito que la rizósfera es un ambiente altamente competitivo para los microorganismos, por lo tanto aquellos organismos benéficos o fitopatógenos, que sean altamente competitivos para colonizar y obtener nutrientes van a proliferar en dicho microambiente, y por lo tanto ejercerán un efecto en el desarrollo y salud de la planta (Haas and Keel, 2003). El término rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal, fue propuesto para describir las bacterias que habitan la rizosfera de las plantas y que pueden tener un efecto positivo sobre los cultivos (Kloepper y Schroth, 1978). Entre las especies PGPB que se han identificado se encuentran *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Entobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Serratia*, las cuales promueven el crecimiento de las plantas, mejoran la adquisición de los nutrientes y suprimen organismos patógenos que provocan enfermedades (Glick, 1995; Joseph, 2007).

2.3.1. Principales mecanismos de acción

Las rizobacterias ofrecen una alternativa ecológica para controlar el ataque de patógenos y/o mejorar el rendimiento de los cultivos (Vesser, 2003). Los efectos directos se pueden observar en ausencia de otros microorganismos, mientras que los efectos indirectos se pueden observar en la interacción del microorganismo de interés con un fitopatógeno, mediante la cual se reducen los efectos dañinos en el vegetal (Díaz-Vargas *et al.*, 2001). Los efectos directos de las PGPB son: la síntesis de fitohormonas, producción de sideróforos, solubilización de minerales (Torres-Rubio *et al.*, 2000) y la fijación de nitrógeno atmosférico (Malik *et al.*, 1997).

2.3.1.1. Fitohormonas

El mecanismo de acción directo de las PGPB por excelencia es la producción de fitohormonas. Las especies del género *Pseudomonas*, *Azotobacter* y *Bacillus* liberan ácido indol acético (AIA), giberelinas o citocininas en la rizósfera de las plantas que ejercen un efecto estimulador del crecimiento vegetal (Lugtenberg y Kamilova, 2009). La hormona promotora del crecimiento de la raíz auxina está presente en los exudados de la raíz y por lo general es sintetizada a partir del aminoácido triptófano. La inoculación de semillas con la auxina producida por *P. fluorescens* WCS365 no dio lugar a un aumento en el peso de las raíces o volumen radical del pepino, pimiento o el tomate, pero dio lugar a un significativo aumento en el peso de la raíz del rábano (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

2.3.1.2. Controladoras de estrés

Algunas enzimas de las PGPB facilitan el crecimiento y desarrollo de la planta mediante la disminución de los niveles de etileno. Tales bacterias ocupan el precursor de etileno ACC y lo convierten en 2-oxobutanoato y NH₃. Varias formas de estrés son aliviadas por el ACC productores de deaminasa, tales como los

efectos de las bacterias fitopatógenas y la resistencia a la tensión de hidrocarburos poliaromáticos, metales pesados como el Ca^{+2} y Ni^{+2} , sales y sequías (Glick *et al.*, 2007).

2.3.1.3. Competencia por el hierro y producción de sideróforos

Teóricamente todos los microorganismos, excepto *Lactobacillus* sp., requiere de hierro para satisfacer todas sus necesidades vitales, pues éste participa en procesos biológicos importantes como transporte de oxígeno, síntesis de ADN, fijación de nitrógeno, fotosíntesis y respiración. En estos procesos, el hierro participa como cofactor de muchas enzimas del metabolismo y proteínas reguladoras, al existir en dos estados de oxidación, ferroso (Fe^{2+}) y férrico (Fe^{3+}) (Venturi *et al.*, 1995), sin embargo este elemento no siempre ésta disponible para ser aprovechado por la bacteria. Los sideróforos (del griego “portador de hierro”) son pigmentos extracelulares, fluorescentes o no, de bajo peso molecular (500-1000 Da) y solubles en soluciones acuosas a pH neutros (Dybas *et al.*, 1995). Son sustancias con una naturaleza química variada y que pueden contener un pequeño péptido. Casi todos los sideróforos que han sido identificados contienen como grupos enlazadores de hierro: ácido hidroxáminico, catecol y/o ácido hidroxicaboxílico: de acuerdo al tipo de grupo enlazador que contengan se clasifican en dos grupos funcionales: hidroxamatos y catecoles. Las especies del género *Pseudomonas* producen sideróforos del tipo hidroxamato entre las que se encuentran el ferribactín y el pseudobactín, particularmente *P. fluorescens* Migula produce formas denominadas pioverdín del tipo catecol. Cuando el sideróforo se acopla con el hierro, éste último se hace inaccesible para los microorganismos patógenos que no posean los receptores proteicos específicos para reconocer al complejo y que además no tengan mecanismos propios tan efectivos de adquisición de hierro. Las plantas colonizadas por estas bacterias no son afectadas por la formación de estos complejos, de hecho se ha planteado que las mismas pueden incorporar a su nutrición el hierro solubilizado por sideróforos (Chen *et al.*, 1995). Una mutante de la cepa ZUM80 de *Pseudomonas fluorescens*,

carente de la síntesis de sideróforos, no logró restringir el crecimiento de *Colletotrichum lindemuthianum*, *C. gloesporioides* y *Phytophthora cinnamomi*. Adicionalmente, se utilizó un concentrado de sideróforos de la misma cepa y se adiciono en cultivos de los patógenos mencionados, disminuyendo su crecimiento respecto al control (Santoyo *et al.*, 2010).

2.3.1.4. Antibiosis

Se caracteriza por la inhibición o destrucción de microorganismos por acción de antibióticos, enzimas líticas y enzimas detoxificadoras. Las cepas de *Pseudomonas* spp. suprimen el desarrollo de patógenos en la rizósfera por la acción de los metabolitos de naturaleza antibiótica, tales como pyoluteorina, pyrrolnitrina, fenacina-1-ácido carbóxico y 2,4 diacetyl-phloroglucinol (Picard *et al.*, 2000). *Pseudomonas fluorescens* cepa CHAO produce varios antibióticos, entre los cuales se encuentra la pyoluteorina y el 2,4 diacetylphloroglucinol, además de ácido cianhídrico y ácido salicílico (Maurhofer *et al.*, 1994).

El 2,4 diacetyl-phloroglucinol unido al ácido cianhídrico desempeñan un papel importante en el control de enfermedades en trigo (Bonsall *et al.*, 1997). *Burkholderia cepacia* produce pyrrolnitrina y protege a las manzanas (*Malus sylvestris* L. var. domestica) y peras (*Pyrus communis* L.) contra el moho azul y gris causado por *Botrytis cinérea* Pers y *Penicillium expansum* Link, respectivamente (Tan, 1991).

2.3.1.5. Inducción de resistencia en plantas

La resistencia inducida es definida como un perfeccionamiento de la capacidad defensiva de las plantas contra un amplio grupo de patógenos y plagas adquiridas después de un estímulo apropiado. La inducción de resistencia por rizobacterias es referida como resistencia sistémica inducida (ISR) (induced systemic resistance), mientras que por otras entidades es denominada resistencia sistémica

adquirida (SAR) (systemic acquired resistance). La respuesta SAR es expresada a un máximo nivel cuando el organismo que la induce produce necrosis, mientras que la ISR provocada por rizobacterias típicas no causa ningún síntoma de necrosis en la planta hospedera (Van Loon *et al.*, 1998).

Se ha demostrado que las rizobacterias inducen resistencia en las plantas contra enfermedades fúngicas, bacterianas, virales y también, contra insectos y nematodos (Maurhofer *et al.*, 1998; Sikora, 1998). De Meyer *et al.* (1999) encontraron que la aplicación de *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula KMPCH al suelo y a la semilla de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) permitió inducir resistencia contra *Botrytis cinérea* y *Colletotrichum lindemuthianum*, reduciéndose la afectación que causaron estos hongos al cultivo. En cultivos de clavel *dianthus caryophyllus* L.), la aplicación de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* WCS417r protegió a las plantas contra la marchitez provocada por *Fusarium oxysporum* (Van Peer *et al.*, 1991).

Existen varios determinantes en la inducción de resistencia sistémica por PGPB, encontrándose entre los más importantes los lipopolisacáridos (LPS) presentes en las membranas celulares, los sideróforos y el ácido salicílico (Van Loon *et al.*, 1998). Leeman *et al.* (1996) señalaron que los LPS de *P. fluorescens* cepas WCS 374 y WCS 417 son los mayores determinantes de ISR en condiciones de abundancia de hierro en el medio, mientras que en condiciones limitantes de este elemento, aquéllos no están involucrados en la respuesta del rábano a *Fusarium* spp. Diversos autores han demostrado que ciertas bacterias rizosféricas tienen la capacidad de producir ácido salicílico, siendo este metabolito responsable de la ISR en plantas. Se considera que la producción de ácido salicílico por *P. aeruginosa* 7NSK2 es esencial para la inducción de resistencia a *B. cinérea* (De Meyer y Hofte, 1997). Se ha demostrado que *P. fluorescens* (cepa CHAO) produce ácido salicílico de forma natural bajo condiciones de hierro limitante y también induce ISR contra virus del mosaico del tabaco (Maurhofer *et al.*, 1998).

4.3.1.6. Producción de enzimas líticas

Una variedad de microorganismo exhiben actividad hiperparasítica, atacando patógenos por excreción de hidrolasas de la pared celular (Chernin y Chet, 2002). Quitinasa producida por *S. plymuthica* C48 inhibe la germinación de esporas de *Botrytis cinérea* (Frankowski *et al.*, 2001). También se ha demostrado que la quitinasa extracelular y laminarinasa sintetizado por *Pseudomonas stutzeri* digiere y lisa micelio de *F. solani* (Lim *et al.*, 1991).

2.4. *Pseudomonas fluorescens* Migula

El género *Pseudomonas* está clasificado dentro del dominio Bacteria, phylum Proteobacteria, clase Gammaproteobacteria, orden Pseudomonales y familia Pseudomonaceae (Brenner *et al.*, 2005). Son bastones típicamente rectos o ligeramente curvados con un flagelo polar, presentan un mecanismo aeróbico, pero ninguna especie es fermentativa (Palleroni, 2008). Son bacterias Gram negativas, no esporulada. Produce pigmento fluorescente en medios de cultivo apropiados y enzimas pectolíticos, pertenecen al grupo V LOPAT. Se han descrito cinco biovars en esta especie, se transmite mediante acción del viento y de la lluvia y se distribuye mundialmente, en Europa y América. La encontramos relacionada en la rizósfera de plantas hortícolas (Peñalver *et al.*, 1994).

La inoculación con *P. fluorescens* en combinación con fertilizantes, en los suelos juegan un papel en la estimulación del crecimiento del garbanzo (Rokhzadi *et al.*, 2008), un incremento considerable de peso fresco y seco de caña (Mehnaz *et al.*, 2009), mayor rendimiento de legumbres (Johri, 2001). Rápidamente colonizan las raíces de plantas como la papa, caña de azúcar, betabel y rábano, observándose hasta un incremento en el rendimiento del 144 % en pruebas de campo (Kloepper *et al.*, 1980; Burr *et al.*, 1978).

Se ha observado que *Pseudomonas* sp. puede suprimir una gran cantidad de bacterias, hongos y nematodos, usándose para el control de organismos

patógenos y biofertilización (Siddiqui, 2006). Pruebas de laboratorio han determinado que algunas cepas de *P. fluorescens* poseen algunas características que las hacen idóneas para su uso en el biocontrol y agentes promotores del crecimiento vegetal (Weller, 2007), debido a su habilidad de crecer rápidamente en condiciones *in vitro*, coloniza y se multiplica rápidamente en la rizósfera y en el interior de la planta, producen una amplia gama de metabolitos activos, como antibióticos, sideróforos, compuestos volátiles y sustancias promotoras de crecimiento vegetal, además de competir agresivamente con otros microorganismos y adaptarse al estrés del medio ambiente (Weller *et al.*, 2002).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Confrontaciones *in vitro*

Las pruebas de inhibición *in vitro* se realizaron utilizando dos técnicas la primera consiste en realizar un rayado con la bacteria en forma de cruz dividiendo la caja Petri en cuatro cuadrantes (reto 1:4), el medio de cultivo que se utilizó es PDA (BD Bioxon® 39 g·L⁻¹ de agua destilada estéril) y la segunda técnica que consiste en dividir la caja en dos, de un lado se realiza un rayado con la bacteria y en la otra mitad se colocará el fitopatógeno (reto 1:1). Una vez realizado el rayado con la bacteria, el hongo es colocado en el centro de cada uno de los cuadrantes, los segmentos del hongo son de 0.5 cm de diámetro. Cada cepa es probada con los tres fitopatógenos, dependiendo del tratamiento. Las cajas Petri son incubadas en una cámara de crecimiento a 28°C, en oscuridad.

3.1.1. Material biológico

- *Pseudomonas fluorescens*

Se emplearon cuatro cepas de *Pseudomonas fluorescens* aisladas de plantas de *Medicago* sp. de la región de Morelia, Mich., identificadas como cepas UM16, UM240, UM256 y UM270.

- **Hongos fitopatógenos**

Los hongos fitopatógenos que se utilizaron fueron *Phytophthora cinnamomi* y *Fusarium* sp., que causan pudriciones de raíz, además de *Phomopsis vaccinii* que provoca el tizón de ramas, dichos hongos fueron previamente aislados, por el Dr. Salvador Ochoa Ascencio profesor investigador de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” de la UMSNH, de plantas de arándano cv. Biloxi de la región de Los Reyes, Michoacán.

3.1.2. Tiempos de exposición

Se realizaron dos sistemas diferentes de exposición, en el primero se coloca la cepa de *Pseudomonas fluorescens* a las 0 hrs. y al mismo momento se coloca el hongo fitopatógeno a las 0 hrs. Durante el segundo sistema se colocó la cepa de *P. fluorescens* a las 0 hrs y pasadas las 24 hrs. se colocó el hongos fitopatógeno, dependiendo cada tratamiento.

3.1.3. Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones, en donde cada repetición corresponde a una cepa bacteriana con un hongo fitopatógeno (Cuadro 1). Se midió el crecimiento radial del fitopatógeno cada 24 horas por espacio de 6 días en milímetros (mm). Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Duncan, $P \leq 0.05$) utilizando el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System) versión 9.2.

Cuadro 1. Tratamientos de inhibición *in vitro* con *P. fluorescens*.

Trat.	Cepa (<i>P. fluorescens</i>)	Fitopatógeno*	Rep.
0	-----	<i>P. cinnamomi</i>	3
1	UM 16	<i>P. cinnamomi</i>	3
2	UM 240	<i>P. cinnamomi</i>	3
3	UM 256	<i>P. cinnamomi</i>	3
4	UM 270	<i>P. cinnamomi</i>	3

*El fitopatógeno será sustituido en otro diseño experimental por *Fusarium* sp. y *Phomopsis vaccinii*.

3.2. Tolerancia de arándano a hongos fitopatógenos

3.2.1. Ubicación del experimento

El presente trabajo se desarrolló en la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en el laboratorio de Fisiología Vegetal y el Invernadero de frutillas (19°23’38.8’’ LN y 101°05’54.6’’).

3.2.2. Material Biológico

Plantas de arándano. Se utilizaron plantas de arándano cv. Biloxi y selección UM811 provenientes de cultivo *in vitro*, a las cuales denominaremos en lo sucesivo como genotipo (G). Las plántulas de arándano de 45 días de cultivo, y un promedio de 4 cm de longitud, son adaptadas a condiciones *in vivo* colocándolas en sustrato peat moss dentro de charolas de plástico totalmente cerradas, con la finalidad de mantener una humedad del 100% y posteriormente disminuirla gradualmente. Posteriormente se abre la charola en el invernadero durante 15 días para poder trasplantar las plántulas en contenedores individuales con capacidad de 1 L que contienen una mezcla de peat moss y perlita (4:1).

Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (PGPB-Plant Growth Promoting Bacteria). Las PGPB que se utilizaron fueron proporcionadas por el Dr. Gustavo Santoyo Pizano (Profesor Investigador del Centro de Investigaciones

biológica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo), dichas PGPB son las cepas UM16, UM240, UM256 y UM270, pertenecientes a *Pseudomonas fluorescens*, aisladas de la rizósfera de *Medicago* spp. en un campo agrícola de Morelia, Michoacán, México (19° 46´ 6´´ LN y 101° 11´ 22´´ LO) (Hernández-León *et al.*, 2015).

Hongos fitopatógenos de arándano. Los hongos fitopatógenos que se utilizan son *Phytophthora cinnamomi* y *Fusarium* sp., que causan pudriciones de raíz, además de *Phomopsis vaccinii* que provoca el tizón de ramas, aislados en el Municipio de Los Reyes, Michoacán, México.

3.2.3. Cinética de crecimiento bacteriano

Se realizó una cinética de crecimiento bacteriana para saber el momento adecuado de realizar la inoculación en las plantas de arándano, buscando un mínimo de 1×10^6 UFC·mL⁻¹. Para esto se coloca 1 ml de cada aislado seleccionado, activados en un matraz de 250 ml con 150 ml de medio PD (200 g de papa + 20 g de dextrosa en 1.5 l de agua destilada a pH 7, se hierve durante 20 min, a continuación se coloca 1 L del caldo de papa en un matraz, y se esteriliza a 120 kPa de presión durante 15 min). Se incuban en un agitador (Llumistell IRO-70) a 120 rpm a 30 °C. Se registra la absorbancia del caldo bacteriano de cada aislado a una longitud de onda de 540 nm cada 4 horas, tomando 1 mL de caldo y colocándolo en una celda de luz visible, las lecturas se toman en un espectrofotómetro (JENWAY 6305). Posteriormente se generó una curva de crecimiento con los datos obtenidos para cada aislado y se determinó la fase exponencial y estacionaria en cada curva.

3.2.4. Cuantificación de unidades formadoras de colonias por mililitro

Con base en la cinética de crecimiento obtenida se determina el número de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC·mL⁻¹) de cada aislado

tomando una muestra cada 4 h.

En un matraz con 250 mL de medio PD previamente esterilizado, en campana de flujo laminar se coloca 1 mL de caldo bacteriano (aislados activados en medio PD) y se pusieron a incubar en un agitador (Llumistell IRO-70) a 120 rpm a 30 °C, el tiempo requerido por cada aislado hasta cumplir el periodo de tiempo para iniciar la cuantificación. El número de unidades formadoras de colonia se determinó por el método del número más probable (NPM) de acuerdo a Alexander (1982) y con base en las tablas de McCrady (1915). Para ello se realizaron diluciones seriadas con agua destilada estéril en factor de 10, desde 10^{-1} hasta 10^{-6} (Figura 2), al alcanzar los tiempos de incubación bajo las condiciones axénicas, se tomaron 100 μ L de los matraces inoculados en los tiempos establecidos 8 h antes de la fase estacionaria y terminando 8 h después (5 muestras, una cada 4 horas), se depositó en un tubo Eppendorf con 900 μ L de agua destilada estéril (10^{-1}), se mezcló vigorosamente en vortex y se continuaron las diluciones seriales en forma similar hasta obtener una dilución de 10^{-6} , se tomaron 100 μ L de cada dilución y se depositaron en una placa Petri con medio PDA (papa-dextrosa-agar) por triplicado, el líquido se distribuyó en la placa con ayuda de un asa de cristal, se incubaron a 30 °C durante 24 horas. Pasado el tiempo de inoculación se realizó el conteo de colonias y se determinó el promedio de cada dilución para sacar las UFC (Figura 2).

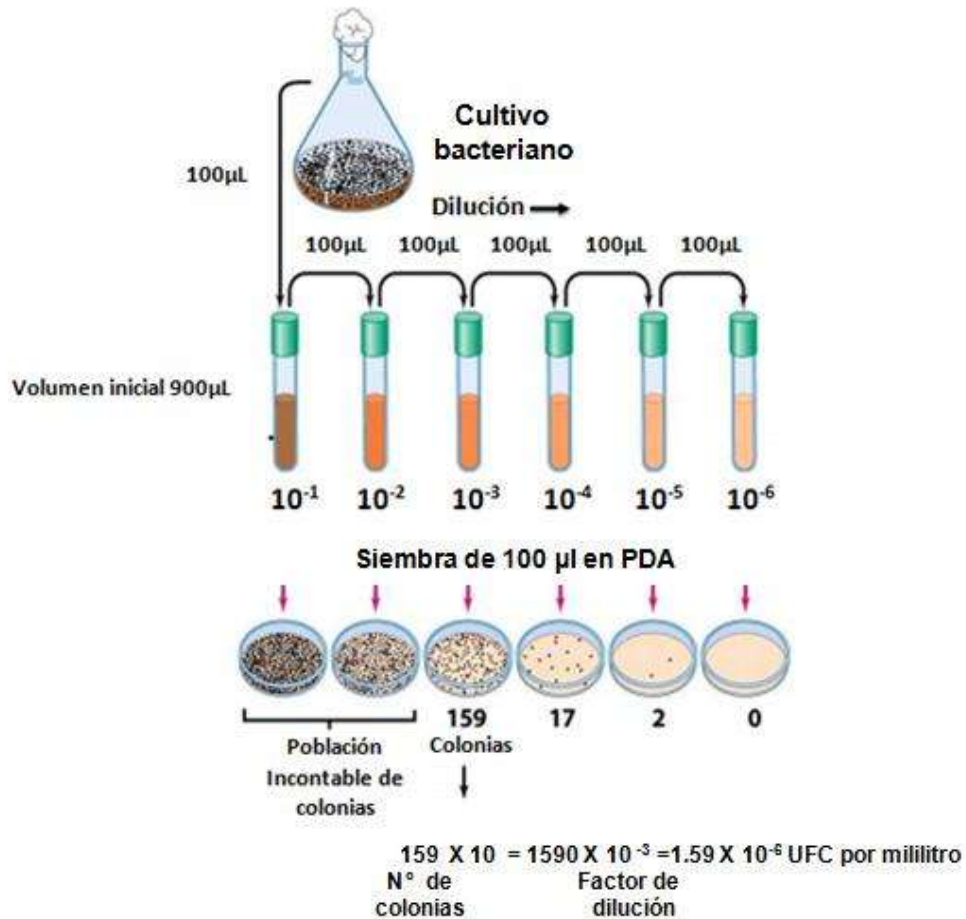


Figura 2. Protocolo para la cuantificación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) (Alexander, 1982).

3.2.5. Inoculación de las plantas de arándano con *P. fluorescens* y hongos fitopatógenos

De las bacterias en placas se tomó una azada y se colocó en un tubo con 25 mL medio PD (Papa-Dextrosa) incubado en agitación (120 rpm) a 28°C por 24 hrs para activar la bacteria. Las bacterias se colocaron en un matraz de 1 L con 500 mL de medio PD, 1 mL del medio con bacterias activadas de cada cepa hasta alcanzar una D.O. (560-600 nm) entre 0.8 y 1, dicho tiempo se calculó mediante una cinética de crecimiento bacteriano. Una vez crecidas las bacterias durante 24 hrs, se inoculan 5 mL de la suspensión bacteriana conteniendo 1×10^8 UFC·mL⁻¹ de la PGPB por planta de arándano, la cual tenía 3 meses de edad, mediante el

riego de la suspensión en la base de la planta, cubriendo todo el sistema radical, se realiza una segunda inoculación a los 15 días.

Transcurridos 15 días de la última inoculación con las PGPB en las plantas con las cepas de *Pseudomonas fluorescens*, las plantas fueron inoculadas con los hongos fitopatógenos *Phytophthora cinnamomi* y *Fusarium* sp. según el tratamiento, mediante el riego de una suspensión de conidios. Para inocular *Phomopsis vaccinii*, se utilizó la técnica aplicada por Guerrero y Godoy (1989), la cual consiste en desinfectar las ramillas con alcohol al 95%, luego se efectúan heridas en la porción terminal de 1 ramilla de cada planta con un bisturí esterilizado para posteriormente colocar el inoculo consistente en micelio y ambos tipos de conidias, el sitio de inoculación se cubrió con algodón humedecido y clean-pack para mantener una alta humedad.

El riego consistió en mantener el sustrato a capacidad de campo. Transcurridos 150 días después de las inoculaciones con los fitopatógenos se toman muestras de raíz para aislar microorganismos y determinar si hubo o no infección.

3.2.6. Diseño experimental

Se utilizó un diseño en bloques al azar, con un total de 6 bloques, donde cada unidad experimental consistió en una planta inoculada, a la que se le denominó como genotipo (G), con una cepa bacteriana (C) y un hongo fitopatógeno (F), con sus respectivos testigos que corresponden a plantas sin inocular (Cuadro 2).

Cuadro 2. Tratamientos de las interacciones entre genotipo, hongo fitopatógeno y cepas de *P. fluorescens*.

GENOTIPO	FITOPATOGENOS	<i>P. fluorescens</i>	GENOTIPO	FITOPATOGENOS	<i>P. fluorescens</i>
CV. BILOXI	F0	C0	S. UM811	F0	C0
		UM16			UM16
		UM240			UM240
		UM256			UM256
		UM270			UM270
	PC	C0		PC	C0
		UM16			UM16
		UM240			UM240
		UM256			UM256
		UM270			UM270
	FS	C0		FS	C0
		UM16			UM16
		UM240			UM240
		UM256			UM256
		UM270			UM270
	PV	C0		PV	C0
		UM16			UM16
		UM240			UM240
		UM256			UM256
		UM270			UM270

F0 = Testigo (sin hongo fitopatógeno), PC = *Phytophthora cinnamomi*, FS = *Fusarium* sp. PV = *Phomopsis vaccinii*. C0 = Testigo (sin aplicar *P. fluorescens*).

3.2.7 Parámetros a evaluar

Los parámetros evaluados se determinaron para el caso del cv. Biloxi durante 5 meses después de realizarse las inoculaciones con los microorganismos, y para la selección UM811 únicamente se evaluaron durante tres meses. Así, los parámetros evaluados fueron los siguientes:

a) Concentración de clorofila. Se utilizó el aparato llamado Spad-502, el cual mide unidades spad, para tomar por planta tres datos y de éstos sacar el promedio. Se midieron las hojas de la parte media de la planta, las cuales estaban maduras. Se realizó una regla de medición tomando 7 muestras de hojas con

diferentes tonalidades, con tres repeticiones de cada material (cv. Biloxi y selección 811), en las cuales se midieron las unidades Spad y se realizó la extracción de clorofila con el método de Levy (1982), el cual consiste en determinar la clorofila a, b y clorofila total, para ello se colocan 5 discos de tejido vegetal de 5 mm de diámetro en 5 mL de NN-dimetilformamida (citado por Torrecillas *et al.*, 1984); en seguida, dentro de frascos ambar durante 48 horas a 4°C, se toma el peso fresco y seco de cada muestra, posteriormente se toman 2 mL de la muestra y se colocan en una celda para medir la absorbancia con un espectrofotómetro JENWAY 6305, se utilizaron fórmulas para determinar la concentración de clorofila (Cuadro 3).

Cuadro 3. Fórmulas para determinar la concentración de clorofila.

Clorofila a (mg·L ⁻¹)	$12.7 (A_{664}) - 2.79 (A_{647})$
Clorofila b (mg·L ⁻¹)	$20.70 (A_{647}) - 4.62 (A_{664})$
Clorofila total (mg·L ⁻¹)	$17.9 (A_{647}) + 8.08 (A_{664})$

b) Peso seco de raíz y área foliar. Se colectó la muestra del tejido foliar dentro de una bolsa de papel, para el caso de la raíz, ésta se lavó con abundante agua para eliminar todo el sustrato. Las muestras se colocaron en una estufa con flujo de aire a 60°C por 48 Hrs. hasta que hubieron perdido todo el contenido de agua.

c) Altura de la planta. Se utilizó una cinta métrica para medir la altura de la planta, desde la base del tallo hasta el ápice de la planta.

d) Diámetro del tallo. Con el Vernier se midió el diámetro de tallo principal de cada planta.

e) Número de brotes. Se contó la cantidad de brotes por planta, los cuales surgieron de la base de la misma.

f) Determinación de inoculación eficiente por microorganismos. Se tomaron muestras de las plantas pasados los 3 meses de la inoculación, se removieron cuidadosamente los tejidos de raíz y de la parte foliar, se lavaron con

agua destilada y a partir de estos se seleccionaron pequeñas porciones de tejido sano y con presencia de pequeñas manchas necróticas en hojas y tallo: considerando la parte superior donde había infección por *Phomopsis vaccinii*, y de raíces, cortando pequeñas secciones de 0.3 cm³ las cuales se desinfectaron con una solución de Hipoclorito de sodio al 1% por 1 min. Finalmente se enjuagaron con agua destilada estéril.

Las porciones de tejido seleccionados para el aislamiento de hongos se secaron el papel estéril y se colocaron en cajas Petri con medio PDA (papa-dextrosa-agar). Para el aislamiento de bacterias y realizar diluciones se realizó el mismo procedimiento de asepsia anterior y se tomó 1 gramo de tejido de raíz en tubos Eppendorf con 1mL de 0.1 M de MgSO₄, se realizan diluciones y plaqueo en medio de cultivo PDA. Para corroborar que las colonias recuperadas pertenecían a las cepas pre-inoculadas, se llevo a cabo la extracción de ADN genómico en cinco muestras, de acuerdo al método de Mahuka, 2004 (modificado 2012). Una vez obtenido el ADN se procedio a amplificar el gen 16S utilizando los oligos OPAO2 y P22, y por restricción enzimática con EcoR1 y HindIII se identificó la similitud entre las cuatro cepas de *P. fluorescens* (UM16, UM240, UM256 y UM270) y las cinco muestras obtenidas.

3.2.8. Análisis de datos

Los datos obtenidos de las inhibiciones *in vitro* fueron sometidos a un análisis de varianza; aquellas variables que presentaron diferencia estadística fueron analizadas mediante la prueba de Duncan (P<0.05). Para los datos obtenidos de las pruebas de tolerancia de arándano a hongos fitopatógenos influenciada por *P. fluorescens* se realizó un análisis de factores múltiples, con la prueba de Tukey (P<0.05). Se utilizó el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System) versión 9.2.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Confrontaciones *in vitro* a las 0 hrs

4.1.1. Reto 1:4. Las cuatro cepas evaluadas de *Pseudomonas fluorescens* tuvieron efectos diferentes sobre los hongos fitopatógenos. *Phytophthora cinnamomi* fue inhibida en un 75% por la cepa UM270, alcanzando 4.3 mm de crecimiento radial, contra 17.3 mm del tratamiento testigo, siendo significativa la diferencia (Figura 2). De manera visual, se aprecia una inhibición de *P. cinnamomi* por efecto de la cepa UM270, reduciendo el crecimiento del micelio y restringiendo su espacio (Figura 2). Estos resultados concuerdan con los de Santoyo y Col. (2010), quienes reportan una inhibición *in vitro* de *P. cinnamomi* en un 70% por acción de la cepa ZUM80 de *P. fluorescens*, misma que también tiene efectos antagónicos contra *Colletotrichum gloesporoides* y *C. lindemithianum* en un 72 y 76% de inhibición, respectivamente.

Fusarium sp. se vio inhibido por la cepa UM270, seguido de UM16, con un porcentaje de inhibición del 18%, alcanzando 15 mm de crecimiento radial y 16%, con 15.3 mm, respectivamente, comparadas con el tratamiento testigo que creció 18.3 mm (Figura 2). Aunque estas inhibiciones son en bajos porcentajes, también se han identificado a cepas de *P. fluorescens* que tienen un mayor porcentaje de inhibición contra *Fusarium*. Santoyo y Col. (2010) reportan un 97% de inhibición en *Fusarium oxysporum* por la cepa MPf3 de *P. fluorescens*. La producción de sideróforos pueden ser la razón de inhibición en *Fusarium* sp. tal y como lo reporta Kloepper (1980) por acción de la cepa B10 de *P. fluorescens*.

Las cepas de *Pseudomonas fluorescens* evaluadas *in vitro* no mostraron ningún efecto antagónico *in vitro* sobre *Phomopsis vaccinii* y estadísticamente no hubo diferencia (Figura 3), por lo que estas cepas no son eficientes para el control *in vitro* del patógeno (Figura 4).

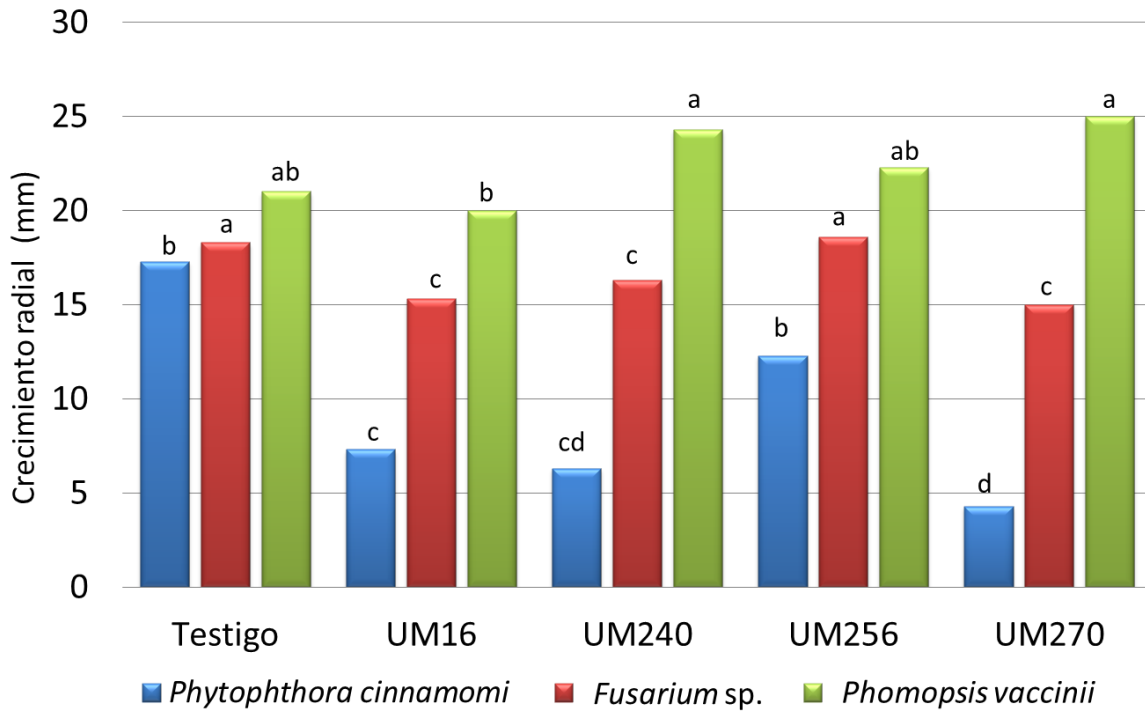


Figura 3. Inhibición *in vitro* de hongos fitopatógenos por cepas de *Pseudomonas fluorescens*, reto 1:4.

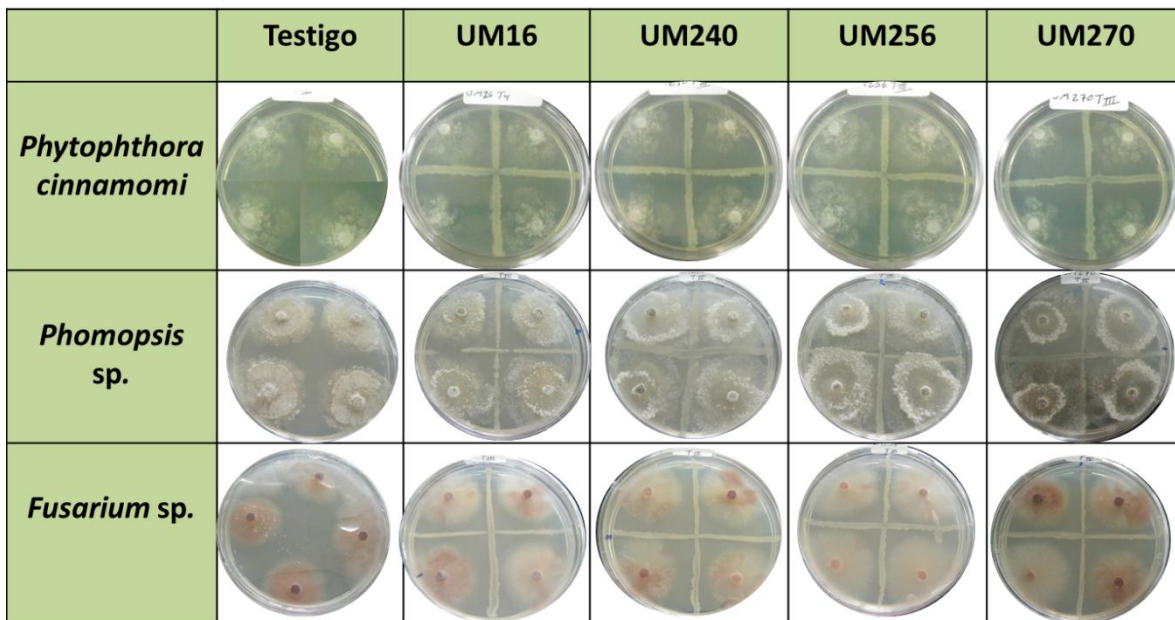


Figura 4. Crecimiento micelial de hongos fitopatógenos ante *P. fluorescens*. Reto 1:4.

4.1.2. Reto 1:1. Mediante el análisis de varianza y con la prueba de Duncan, se muestra una diferencia significativa en la inhibición de *Phytophthora cinnamomi* por parte de las cepas de *Pseudomonas fluorescens* evaluadas, por lo que al menos una de las cepas se comportó de manera distinta. Mediante el agrupamiento de medias, se observa que el testigo creció 5 mm más comparado con los tratamientos, por lo que las cepas UM270, UM16 y UM256 fueron las que inhibieron en mayor medida a *P. cinnamomi* con 14, 15.5 y 16 mm de crecimiento radial del hongo, reduciendo hasta un 34% su crecimiento comparado con el testigo (Figura 6).

En la confrontación con *Fusarium* sp. el testigo fue diferente a las cuatro cepas (Figura 5), la inhibición fue de hasta un 30% en su crecimiento, con 17.3 mm de radio, compara con 21.6 mm del testigo. Las cepas de *P. fluorescens* no lograron inhibir el crecimiento *in vitro* de *P. vaccinii* (Figura 5), por lo que las cepas no fueron eficientes en el control de *P. vaccinii* e incluso promovieron el crecimiento del hongo (Figura 6). Estos datos concuerdan con los reportados con Guerra *et al.* (2011) y De Meyer and Hofte (1997) quienes reportan la inhibición de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium* spp. por parte de las cepas de *P. fluorescens* PPC y WCS 374 y WCS 417, mismas que por acción de los antibióticos, así como de enzimas líticas y lipopolisacaridos, pueden inhibir el hongo fitopatológico.

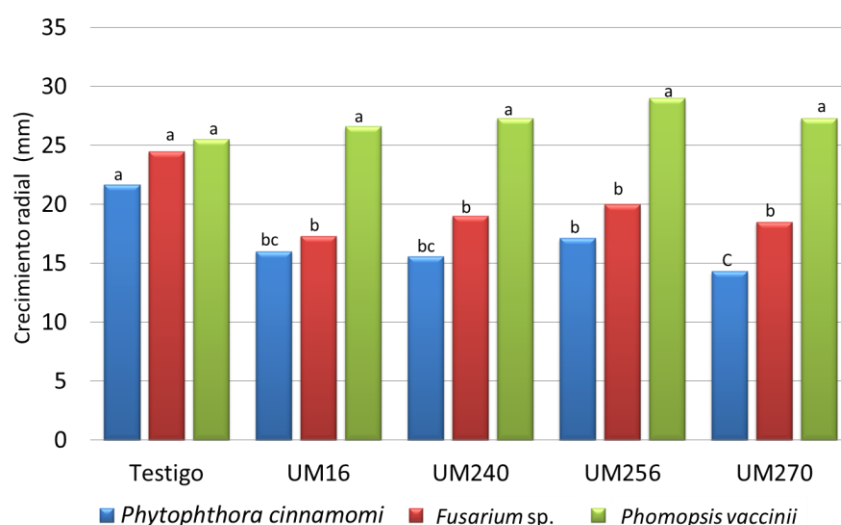


Figura 5. Confrontación *in vitro* de fitopatógenos de arándano a causa de *Pseudomonas fluorescens* reto 1:1.

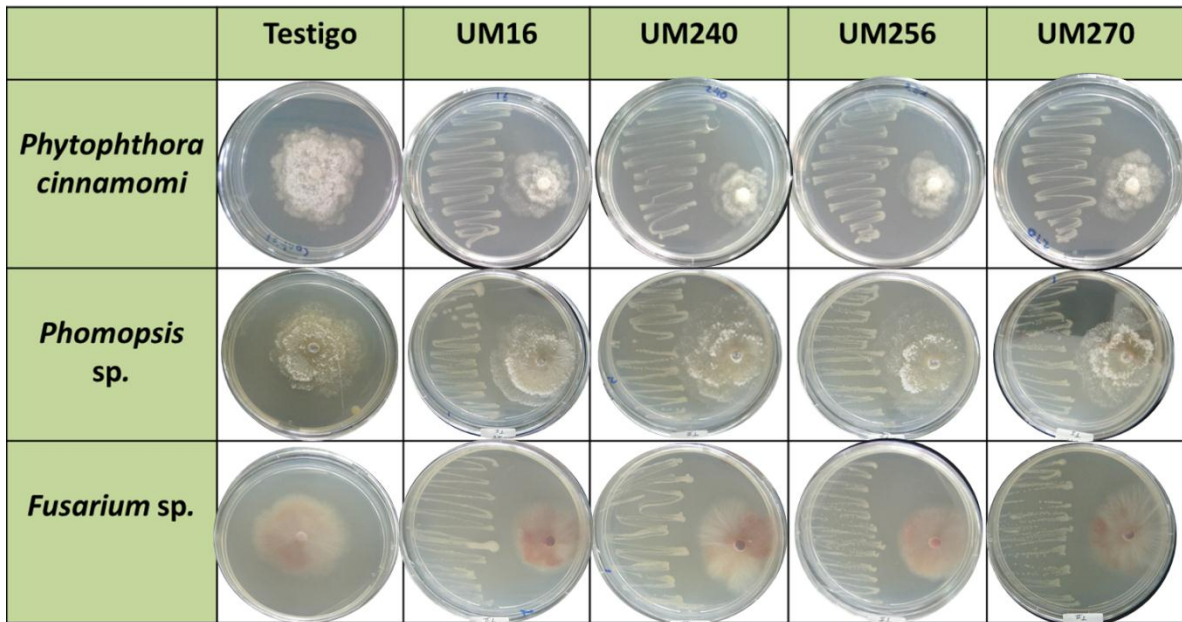


Figura 6. Crecimiento micelial de hongos fitopatógenos ante *Pseudomonas fluorescens*. Reto 1:1.

Los efectos inhibitorios por parte de las cepas UM16 y UM270 se deben en su mayoría a la producción de compuestos difusibles, como son los DAPG, sideróforos, proteasas y compuestos volátiles (HCN, compuestos azufrados) que actúan directamente sobre los hongos fitopatógenos, restringiendo su crecimiento. Las cepas UM16, UM240, UM256, UM270 inhiben el crecimiento *in vitro* de *Botrytis cinerea* hasta en un 86%, patógeno causal de la pudrición de frutos (Hernández-León *et al.*, 2015).

4.2. Confrontaciones *in vitro* a 24 hrs

Las pruebas de inhibición donde se colocó *P. fluorescens* a las 0 hrs. y el hongo fitopatógenos 24 hrs después, no mostraron diferencias con respecto a los resultados observados en las confrontaciones de 0 horas. En la Figura 7 de las confrontaciones 1:4 el menor crecimiento micelial del hongo se da con las cepas de *P. fluorescens* en ambos tiempos, a excepción de la pruebas con *Phomopsis vaccinii* donde se nota claramente que a ambos tiempos al confrontar las cepas de

P. fluorescens con el hongo, éste logra crecer más que el testigo, lo cual se puede deber a un estímulo provocado por las cepas. Los menores crecimientos miceliales durante los primeros seis días ocurrieron a las 0 hrs para el caso de *P. cinnamomi*, para *Fusarium* sp. y *P. vaccinii* los menores crecimientos se dieron a las 24 hrs de 5 hasta 10 mm menos, pero hubo mayor diferencia con el testigo.

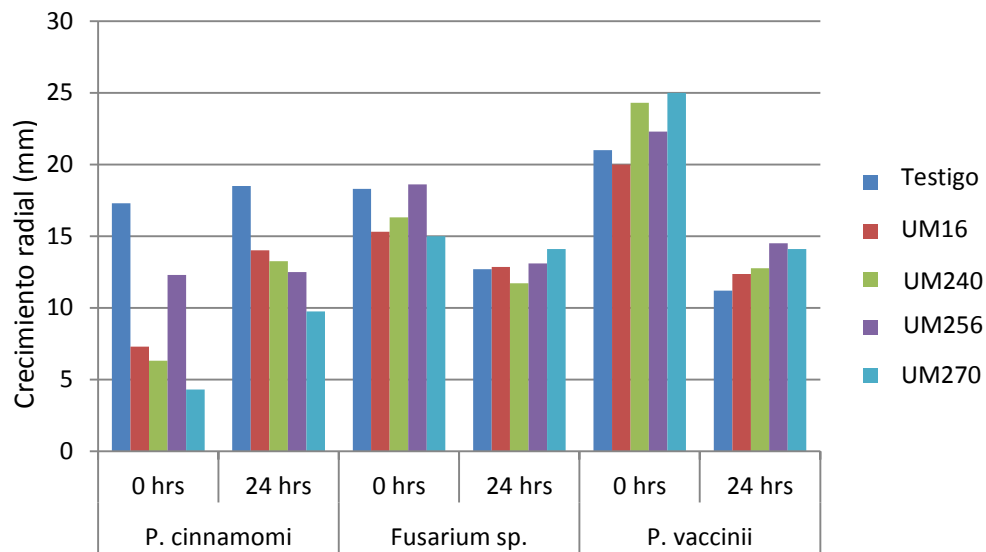


Figura 7. Confrontaciones realizadas a diferentes tiempos con las cepas de *P. fluorescens* y los hongos fitopatógenos, reto 1:4.

En el reto 1:1 se observó el mismo caso que el anterior, por lo que no se muestra diferencia entre establecer a las 0 hrs o a las 24 hrs el hongo fitopatógeno. Unicamente hubo una ligera disminución en el crecimiento micelial, pero con el mismo patrón de inhibición que establecer a las 0 hrs (Figura 8). Estos resultados difieren con los reportados por Santoyo y Col. (2010), quienes obtuvieron los mayores porcentajes de inhibición al inocular la cepa ZUM80 de *P. fluorescens* 24 horas antes que el hongo fitopatógeno, elevando el porcentaje de inhibición del 30% al 76% en *C. lindemuthianum* y para el caso de *P. cinnamomi* la inhibición fue hasta del 70% inoculando el hongo 24 horas después a la cepa.

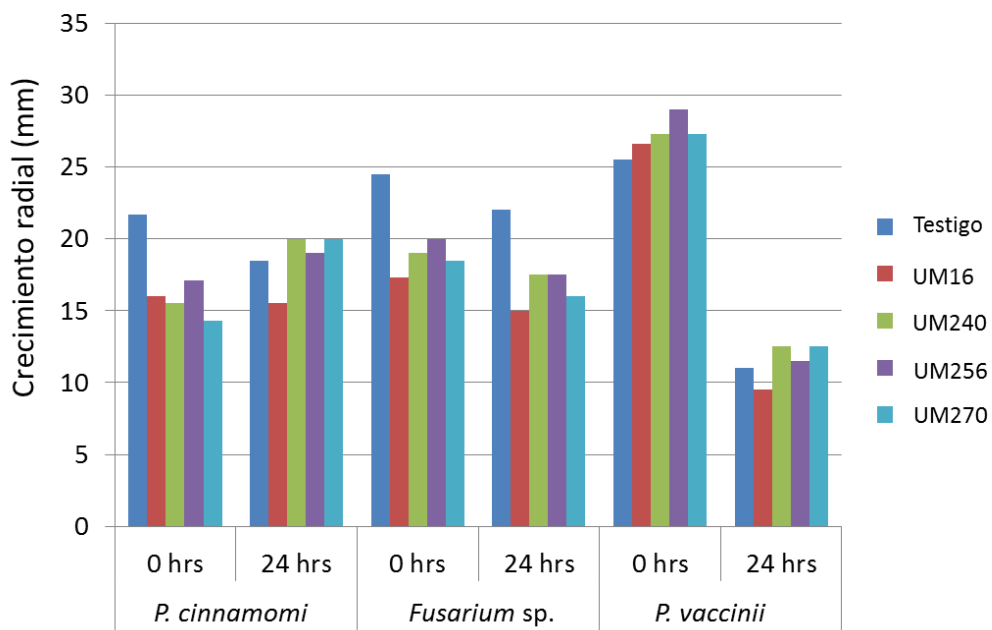


Figura 8. Confrontaciones *in vitro* a diferentes tiempos entre hongos fitopatógenos y *P. fluorescens*, reto 1:1.

4.3. Respuesta de arándano a la interacción de *Pseudomonas fluorescens* y hongos fitopatógenos

4.3.1. Cinética de crecimiento bacteriano

El Cuadro 4 muestra el tiempo de incubación de las 4 cepas de *P. fluorescens* para llegar a la fase exponencial y estacionaria, los datos fueron obtenidos en la cinética de crecimiento bacteriano de cada aislado.

Cuadro 4. Periodo de incubación para lograr la fase exponencial y estacionaria de las cepas de *P. fluorescens*.

Cepa	Periodo de incubación en horas para llegar a la fase exponencial	Periodo de incubación en horas para llegar a la fase estacionaria
UM16	8	24
UM240	8	24
UM256	8	24
UM270	8	24

4.3.2. Unidades formadoras de colonias por mililitro

En el cuadro 5 se registra el conteo de las unidades formadoras de colonia por mL (UFC·mL⁻¹) de las cepas evaluadas, en un periodo de 24 h que comprende la fase exponencial y estacionaria de cada uno de ellos. Las cepas que tienen un mayor crecimiento bacteriano son la UM240 y UM16, que logran aumentar su población en un menor tiempo, sin embargo, las cuatro cepas llegaron a obtener en las primeras 24 h 10⁻⁸ UFC·ml⁻¹. Siendo una cantidad considerable y eficiente para realizar las inoculaciones.

Cuadro 5. Unidades formadoras de colonias por mililitro de las cepas de *P. fluorescens*.

Cepa	UFC·ml⁻¹ (periodo 24 h)
UM16	2.1 x 10 ⁻⁸
UM240	4.1 x 10 ⁻⁸
UM256	1.2 x 10 ⁻⁸
UM270	1.8 x 10 ⁻⁸

4.3.3. Efecto de las interacciones entre las variables

La concentración de clorofila total (CC), la altura de la planta (AP) y el peso seco de la raíz (PSR) mostraron cambios altamente significativos ($P \leq 0.01$) por efecto del genotipo (G), la cepa de *P. fluorescens* (C), la interacción entre el genotipo y la cepa (G*C), la interacción entre el genotipo y el hongo fitopatógeno (G*F). El PSR fue la única variable altamente significativa ($P \leq 0.01$) en respuesta a la interacción entre el genotipo, el hongo fitopatógeno y la cepa (G*F*C). El peso seco del área foliar (PSF) mostró cambios altamente significativos por efecto del genotipo (G), la cepa (C) y el genotipo con la cepa (G*C). Para el caso de la interacción G*F*C, ésta no fue significativa para CC, AP, número de brotes (NB) y PSF (Cuadro 6).

Cuadro 6. Análisis de varianza de la concentración de clorofila (CC), Altura de la planta (AP), diámetro del tallo (DT), número de brotes (NB), peso seco de raíz (PSR) y peso seco del área foliar (PSF) en función del genotipo, hongo fitopatógeno y cepa de *P. fluorescens*.

FACTORES PRINCIPALES	CC	AP	DT	NB	PSR	PSF
G	**	**	**	**	**	**
F	**	**	NS	NS	*	NS
C	**	**	NS	**	**	**
G*C	**	**	NS	NS	**	**
G*F	**	**	NS	NS	**	NS
F*C	**	*	NS	NS	*	NS
G*F*C	NS	NS	*	NS	**	NS

*** = $P \leq 0.05$ y 0.01 , respectivamente. NS = no significativo. G = genotipo, F = Hongo fitopatógeno, C = cepa de *P. fluorescens*.

El genotipo (G) no influyó en la CC, ni en el PSR y PSF. Pero sí en la AP, DT y NB, por lo que el cv. Biloxi fue superior en estos parámetros a la selección UM811, en un 97.7, 34 y 10.4 %, respectivamente. El hongo fitopatógeno (F) influyó en la CC, pues las plantas inoculadas con *Phytophthora cinnamomi* (PC) y *Fusarium* sp. (FS) presentaron la menor concentración de clorofila total. La AP fue menor en presencia de FS. La presencia del hongo fitopatógeno no influyó en el DT, NB y PSF, por lo que las plantas que poseían dichos patógenos se comportaron estadísticamente iguales. Las cepas de *P. fluorescens* (C) tuvieron efectos importantes en la CC, donde las plantas inoculadas con las cuatro cepas fueron estadísticamente diferentes al testigo (C0), elevando así los niveles de clorofila en el follaje. La AP se vio incrementada por la cepa UM270 en un 14.6 % más que el testigo (C0). El DT no se vio influenciado por las cepas, sin embargo, para el NB la cepa UM16 incrementó en un 18.7 % más al igual que para el PSR, junto con la cepa UM256 (Cuadro 7).

Cuadro 7. Análisis de la concentración de clorofila (CC), altura de la planta (AP), diámetro del tallo (DT), número de brotes (NB), peso seco de raíz (PSR) y peso seco del área foliar (PSF), en respuesta a los factores de manera independiente.

FACTORES	NIVELES	CC (mg·g ⁻¹ ms)	AP (cm)	DT (mm)	NB	PSR (g)	PSF (g)
G	CV. BILOXI	9.4 a	78.3 a	5.9 a	5.3 a	31.7 a	23.3 a
	S. UM811	10.6 a	39.6 b	4.4 b	4.8 b	27.4 a	12.7 a
F	F0	10.1 ab	57.7 ab	5.1 a	5.1 a	30.7 a	17.9 a
	PC	9.7 b	60.7 a	5.2 a	4.8 a	30.3 ab	17.4 a
	FS	9.8 b	55.6 b	5.1 a	5.1 a	30.1 ab	18 a
	PV	10.4 a	61.7 a	5.3 a	5.2 a	27.1 b	18.6 a
C	C0	9.2 b	54.7 b	5.2 a	4.8 b	26.4 b	17.6 abc
	UM16	10.5 a	59.0 ab	5.3 a	5.7 a	31.3 a	20.1 a
	UM240	10.1 a	58.4 ab	5.0 a	5.1 ab	29.0 ab	15.5 c
	UM256	10.0 a	59.8 ab	5.1 a	4.6 b	31 a	17.2 bc
	UM270	10.1 a	62.7 a	5.3 a	4.9 ab	30.0 ab	19.5 ab
Media gral.		10.1	58.9	5.2	5.1	29.5	18
DSH ^{0.05} Tukey	G	1.9	9.6	0.8	2.2	47.7	23.6
	F	0.52	4.6	0.47	0.73	3.2	2.2
	C	0.62	5.4	0.56	0.87	3.9	2.7
C.V.		11.1	16.4	19.3	30.8	23.4	26.6

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas (Tukey 0.05). G = genotipo, F = Hongo fitopatógeno, C = cepa de *P. fluorescens*. F0 = Testigo absoluto, PC = *Phytophthora cinnamomi*, FS = *Fusarium* sp. PV = *Phomopsis vaccinii*. C0 = Testigo absoluto. DSH = diferencia significativa honesta.

4.3.4. Interacción entre arándano, hongos fitopatógenos y las cepas de *P. fluorescens*

Las plantas que contenían la bacteria más el hongo fitopatógeno en interacción que presentó una mayor concentración de clorofila total (CC) fue S. UM811-PV-UM240 con 11.7 mg·g⁻¹ de masa seca, seguido por la S. UM811-PC-UM240 con 11.6 mg·g⁻¹ de masa seca. En cambio, la interacción que produjo una menor CC

fue CV-Biloxi-F0-C0 con $7.9 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de masa seca, la cual no estaba inoculada con microorganismos (Figura 9). La selección UM811 presentó un color verde más intenso que las plantas del cv. Biloxi, siendo así su genotipo. Es por esta razón que los niveles de UM811 están por encima del cv. Biloxi, aunque estadísticamente ambos fueron iguales. En la Figura 9 también se observa que las plantas de arándano, al no estar interactuando con *Pseudomonas fluorescens* y sí estar inoculada con hongos fitopatógenos, presentaron niveles bajos de CC, tal y como lo muestran las interacciones CV-BILOXI-F0-C0, CV-BILOXI-PC-C0, CV-BILOXI-FS-C0, S-UM811-F0-C0, S-UM811-PC-C0 y S-UM811-FS-C0. Por el contrario, las plantas inoculadas con *P. fluorescens* y los hongos fitopatógenos presentan niveles adecuados de CC, además de presentar una mayor tolerancia a la presencia de patógenos, logrando un mejor crecimiento y desarrollo de las mismas.

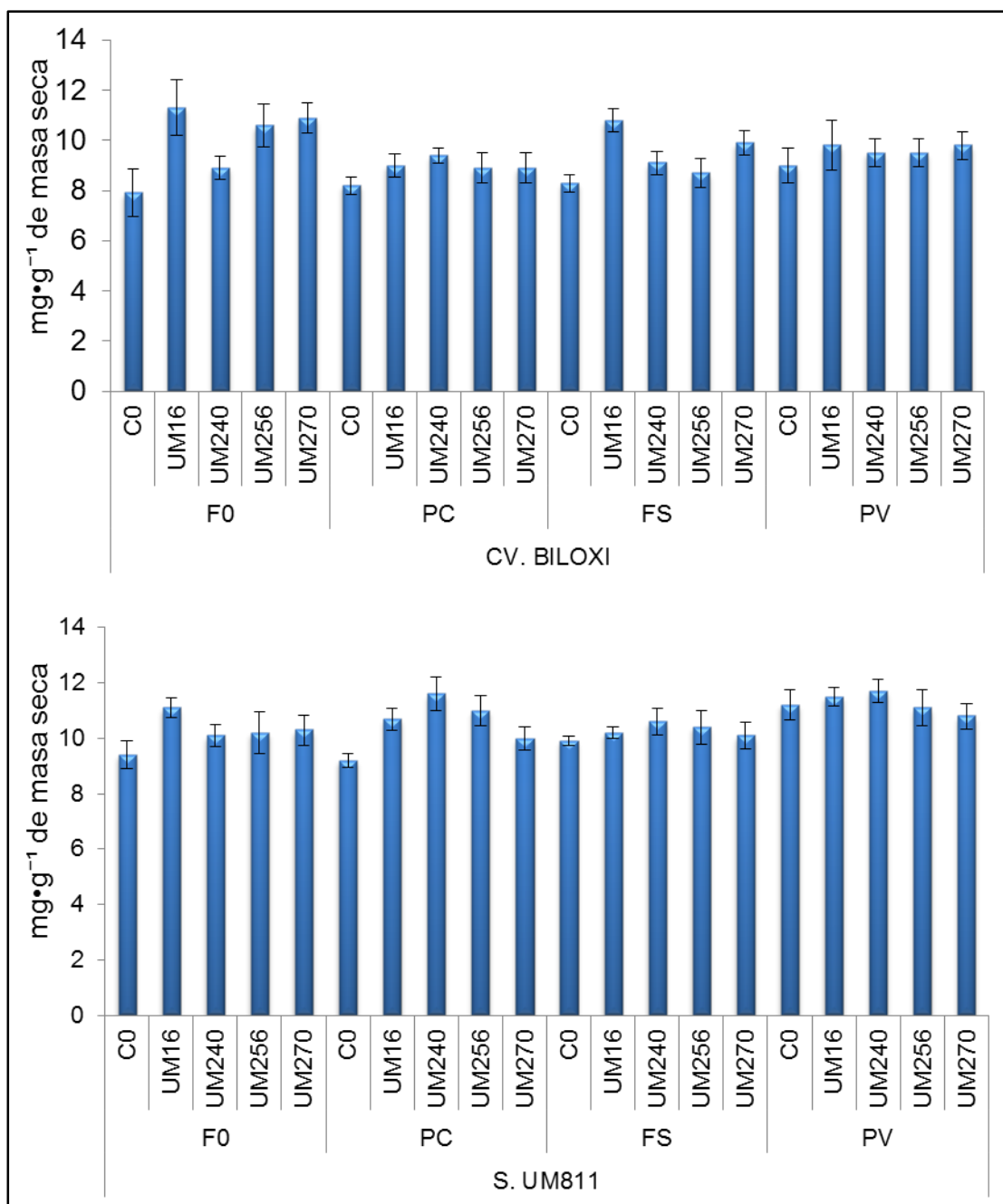


Figura 9. Concentración de clorofila total (CC) en dos genotipos de arándano, cv. Biloxi y la selección UM811 (Tukey 0.05). C0 = Testigo (sin aplicación de *P. fluorescens*). F0 = Testigo (sin aplicación de hongo fitopatógeno), PC = *Phytophthora cinnamomi*, FS = *Fusarium* sp., PV = *Phomopsis vaccinii*.

La altura de las plantas de arándano se vio influenciada por la inoculación de las cepas de *P. fluorescens* así como por la presencia de los hongos fitopatógenos. El cv. Biloxi logró incrementar su altura comparado con la selección UM811. La interacción que logró la mayor altura fue CV-BILOXI-F0-UM270 con 91.6 cm, seguido de CV-BILOXI-PC-UM16 Y CV. BILOXI-PV-UM16, estos valores representan un 47.7 % más que CV-BILOXI-F0-C0. La selección UM811 se vio influenciada mayormente por la interacción S-UM811-F0-270, S-UM811-FS-240 y S-UM811-PV-270, demostrando que en presencia de *P. fluorescens* las plantas de arándano pueden tolerar a otros microorganismos que puedan afectar el cultivo (Cuadro 8).

El diámetro del tallo es otra de las características que indican el buen estado fisiológico de las plantas y en lo cual las bacterias promotoras del crecimiento vegetal tienen un efecto indirecto. En el cuadro 8, se puede observar que ésta variable fue influenciada por la interacción CV-BILOXI-F0-270 con 7.1 mm de diámetro comparado con S-UM811-FS-16, la cual solo tuvo 3.6 mm, siendo estadísticamente diferentes. El número de brotes por planta fue estadísticamente igual en los tratamientos, por lo que estas interacciones no tienen mayores efectos en el número de brotes por planta, lo cual depende en su mayoría del genotipo.

Cuadro 8. Altura de la planta, diámetro del tallo y número de brotes de plantas de arándano, en función del genotipo interactuando con hongos fitopatógenos y cepas de *P. fluorescens*.

GENOTIPO	FITOPATOGENOS	<i>P. fluorescens</i>	Altura (cm)		Diámetro de tallo (mm)		Número de brotes	
CV. BILOXI	FO	CO	62	bc	5.6	abcdef	5.5	a
		UM16	80.3	ab	6.0	abcde	6.1	a
		UM240	73.8	abc	5.5	abcdef	5.1	a
		UM256	80.3	abc	5.5	abcdef	4.5	a
		UM270	91.6	a	7.1	a	4.5	a
	PC	CO	74.5	abc	5.2	abcdef	4.5	a
		UM16	90.1	a	6.3	abcd	5.1	a
		UM240	79.6	abc	6.2	abcd	5.3	a
		UM256	83.1	ab	6.5	ab	4.8	a
		UM270	80.1	abc	5.8	abcdef	5.8	a
	FS	CO	61.8	bcd	5.6	abcdef	5.5	a
		UM16	59.0	cde	6.3	abcd	5.6	a
		UM240	71.5	abc	5.5	abcdef	4.6	a
		UM256	80.3	abc	5.3	abcdef	6.5	a
		UM270	80.3	abc	6.5	ab	5.0	a
	PV	CO	79.6	abc	6.4	abcd	4.6	a
		UM16	90.8	a	6.5	abc	5.8	a
		UM240	76.6	abc	5.5	abcdef	5.1	a
		UM256	85.5	a	6.5	abc	5.5	a
		UM270	84.1	a	5.3	abcdef	6.3	a
S. UM811	FO	CO	37.1	f	4.3	bcdef	4.6	a
		UM16	36.8	f	4.6	bcdef	5.8	a
		UM240	38.6	ef	4.1	def	6.3	a
		UM256	36.3	f	4.2	cdef	4.0	a
		UM270	40.0	ef	4.5	bcdef	4.3	a
	PC	CO	43.3	def	5.1	abcdef	4.1	a
		UM16	39.5	ef	4.5	bcdef	5.0	a
		UM240	40.6	def	4.5	bcdef	5.6	a
		UM256	36.6	f	3.8	def	3.3	a
		UM270	39.6	ef	4.3	bcdef	4.1	a
	FS	CO	42.3	def	5.0	abcdef	4.0	a
		UM16	35.5	f	3.6	f	5.6	a
		UM240	45.3	def	4.3	bcdef	4.6	a
		UM256	38.8	ef	4.5	bcdef	4.1	a
		UM270	41.6	def	4.1	def	4.8	a
	PV	CO	37.5	ef	4.8	bdcef	5.5	a
		UM16	40.0	ef	4.5	bcdef	6.6	a
		UM240	41.1	def	4.5	bcdef	4.0	a
		UM256	38.0	ef	4.3	bcdef	4.6	a
		UM270	44.3	def	4.6	bcdef	4.5	a

Letras distintas en la misma columna indican diferencias, Tukey 0.05. CO = Testigo (sin aplicación de cepa). FO = Testigo (sin aplicación de hongo fitopatógeno), PC = *Phytophthora cinnamomi*, FS = *Fusarium* sp., PV = *Phomopsis vaccinii*

El peso seco de raíz (PSR) se vio incrementado en las plantas que fueron inoculadas tanto con las bacterias como con los hongos fitopatógenos, así la interacción S-UM811-F0-UM240 presenta un peso de 41.7 g y CV-BILOXI-PV-UM256 41.2 g, siendo estadísticamente diferentes a S-UM811-PV-UM270 y S-UM811-PV-UM240, con 18.7 y 18.9, respectivamente (Figura 10). Los microorganismos fitopatógenos causaron mayores daños en el desarrollo de la raíz, ya que las interacciones del cualquiera de los genotipos utilizados con F0-C0 (sin aplicación de micrororganismos) tuvieron mayor peso de raíz que en otras interacciones donde participan los microorganismos fitopatógenos. Esto se debe principalmente a la producción de fitohormonas, como es el Ácido Indolacético (AIA), en las concentraciones siguientes: 0.13 de la cepa UM240 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 0.68 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ en UM256, 10.6 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ en la cepa UM270 y 22 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ producidos en mayor concentración por la cepa UM16 (Hernández-León *et al.*, 2015).

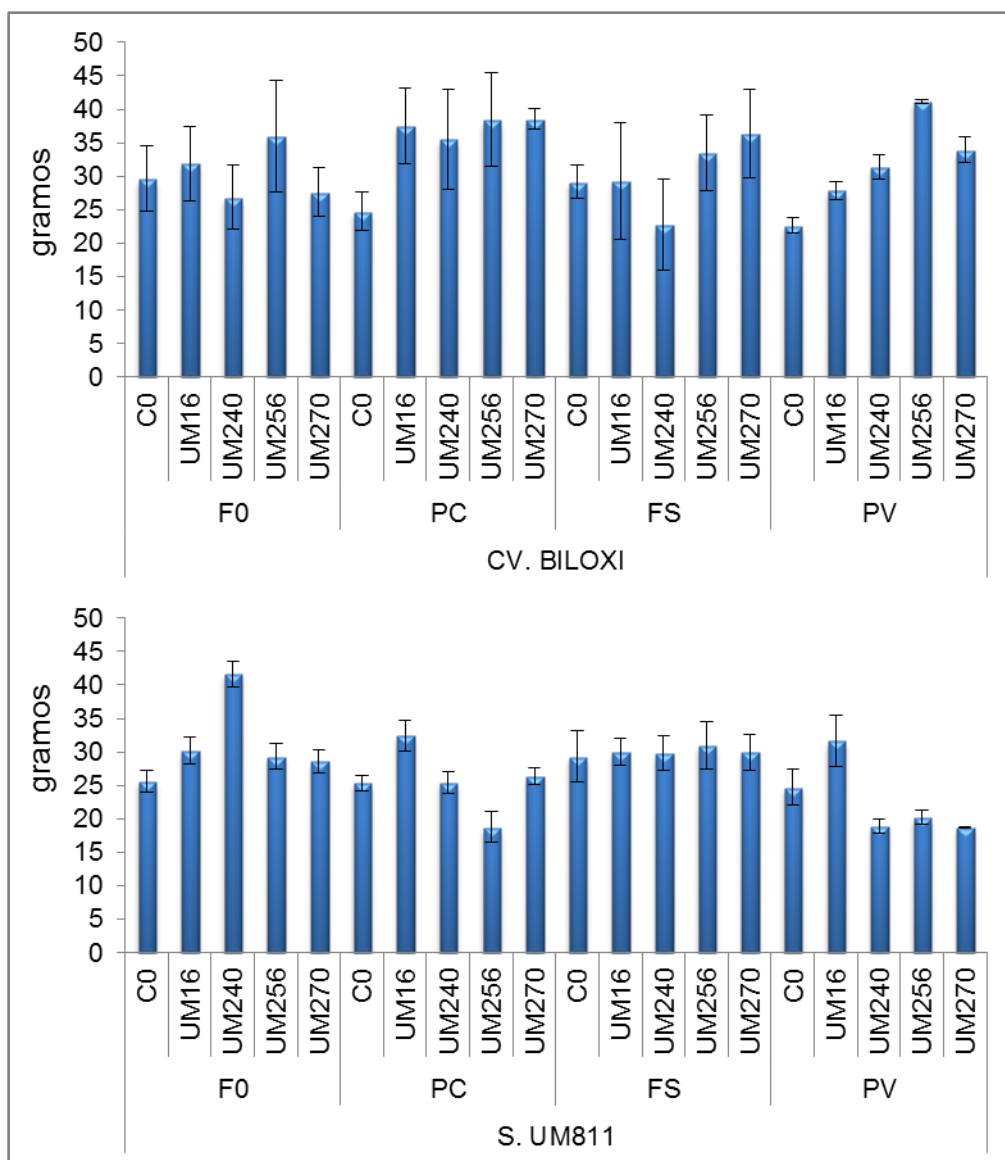


Figura 10. Peso seco de raíz (PSR) en los dos genotipos de arándano, cv. Biloxi y selección UM811 (Tukey 0.05). C0 = Testigo (sin aplicación de *P. fluorescens*). F0 = Testigo (sin aplicación de hongo fitopatógeno), PC = *Phytophthora cinnamomi*, FS = *Fusarium* sp., PV = *Phomopsis vaccinii*.

El peso seco del área foliar fue mayor en el cv. Biloxi comparado con la selección UM811, y el mayor efecto se pudo observar con la interacción del CV-BILOXI-PV-UM16 y CV-BILOXI-F0-UM16 con 30.2 y 29.3 g, respectivamente. Las plantas que presentaron un menor desarrollo del área foliar fueron las de las interacción S-

UM811-FS-UM256 y S-UM811-PC-UM256 (Figura 11). Esto esta determinado por el efecto de las interacciones y en su mayoría por el genotipo de la especie vegetal. Nuestros resultados concuerdan con los reportados por de Silva y Col. (2000), quienes demostraron que *Pseudomonas fluorescens* Pf 5 incrementa el área foliar en un 60%, asi como el diámetro del tallo, el peso seco de raíz y de brotes en plantas de arándano cv. Bluecrop. Además, los microorganismos promotores del crecimiento vegetal incrementan la concentración de nutrientes en las plantas.

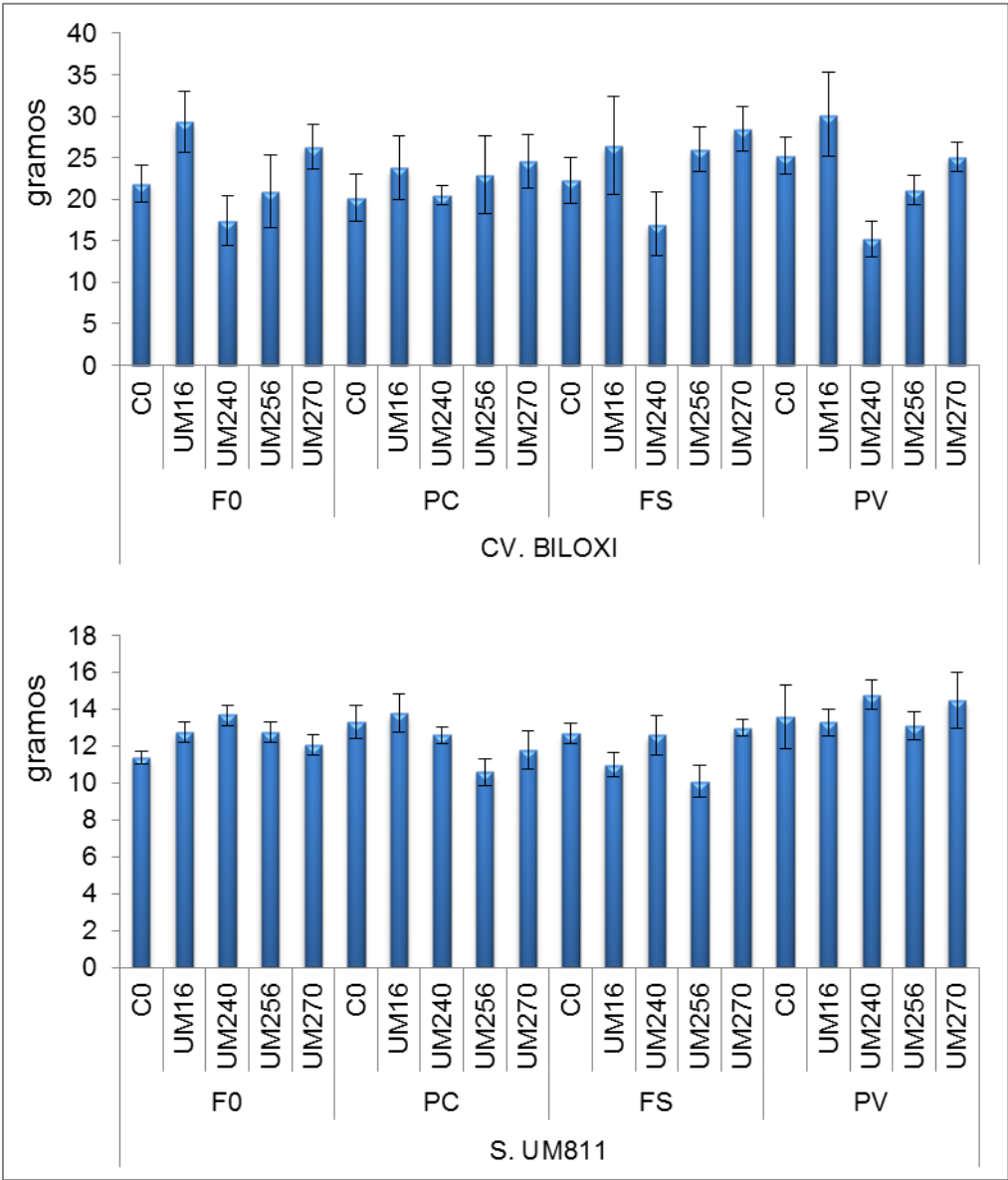


Figura 11. Peso seco del área foliar (PSF) en los dos genotipos de

arándano, cv. Biloxi y selección UM811 (Tukey 0.05). C0 = Testigo (sin aplicación de *P. fluorescens*). F0 = Testigo (sin aplicación de hongo fitopatógeno), PC = *Phytophthora cinnamomi*, FS = *Fusarium* sp., PV = *Phomopsis vaccinii*.

Las plantas de arándano, tanto el cv. Biloxi como la selección UM811 pueden toleraron la presencia de micrororganismos fitopatógenos, ya sea *Phytophthora cinnamomi*, *Fusarium* sp. y *Phomopsis vaccinii*, una vez inoculadas con las cepas de *Pseudomonas fluorescens*. Mediante el uso de estas cepas, los hongos fitopatógenos se vieron restringidos, ya sea por mecanismos directos o indirectos.

Phytophthora cinnamomi es un fitopatógeno que está presente en todas las regiones productoras de arándano, ha sido reportada en Estados Unidos y Chile, los principales países productores. Las plantas de arándano cv. Biloxi infectadas con *P. cinnamomi* que se evaluaron en el presente trabajo mostraron una disminución en la altura de las plantas, así como una reducción en la concentración de clorofila y un menor peso seco del área foliar y de la raíz, demostrando que están expuestas a la infección por este fitopatógeno y que *Pseudomonas fluorescens* es una alternativa para su control. En un trabajo realizado en Oregon donde se muestrearon 55 cultivares de arándano, y de acuerdo a Bryla y Linderman (2008) *Phytophthora* fue detectado en el 24% y *Pythium* en el 85%. La especie que identificaron fue *Phytophthora cinnamomi* y la encontraron con mayor frecuencia en los cvs. Duke y Bluecrop, ambos cultivares representan el 46% en los campos en Oregon, también estuvo presente en los cultivare Rubel y Briggitta Blue que representan el 24% de los campos y *P. cinnamomi* no se detectó en los campos plantados con los cultivares Berkeley, Bluejay, Bluetta, Darrow, Earliblue, Elliot y Powderblue, los cuales representan del 2 al 7% de los campos evaluados. Esto nos indica por qué este fitopatógeno está presente en el cv. Biloxi y puede causar daños serios en la producción, en primer lugar por ser un microorganismo endémico del bosque, y estos suelos han sido utilizados para cultivar, y el segundo motivo es que se comienza a establecerse un monocultivo, ocupando el cv. Biloxi el 80% de la superficie establecida de

arándano en Michoacán. Larach y Col. (2009) demostraron que independientemente del cultivar, las plantas de arándano son susceptibles a *P. cinnamomi* y *P. citrophthora* presentando decoloración vascular, podredumbre cortical de las raíces, hojas cloróticas y enrojecimiento foliar, mismos síntomas que se observaron en las plantas inoculadas con *P. cinnamomi* en el presente trabajo (Figura 11), y que los arandanos más susceptibles fueron los cvs. Biloxi y Duke presentando un mayor daño.

En los cultivos de arándano de Michoacán, que relativamente son jóvenes (menos de 10 años), se han identificaron 12 hongos asociados a la parte aérea de esta frutilla, entre ellos *Alternaria* sp. y *Colletotrichum* sp., prevaleciendo éstos tanto en frutos como en hojas (Mondragón-Flores *et al.*, 2012). Estos autores detectaron que *Phomopsis* sp. provoca el tizón y cancro en el tallo formando un complejo con *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Neofusicoccum* y *Phoma*, con lo que se demuestra que *Phomopsis* está causando daños en las plantas de esta frutilla. Anteriormente Guerrero y Godoy (1989) lograron infectar plantas de arándano alto con *Phomopsis vaccinii*, donde en un 50% de los casos el hongo entró y progresó hacia la base, variando el largo de la lesión entre 50 y 80 mm en tan solo dos meses. En ese mismo trabajo, en un 20% de los casos se formaron pequeñas lesiones, mientras que en un 30% no hubo síntomas; las plantas afectadas mostraban como síntoma prevaleciente, atizonamiento y muerte regresiva de ramillas. El éxito de que haya existido infección se pudo deber a que utilizaron plantas de 3 años de edad establecidas en campo y no plantas de vivero, ya que es más común encontrar los síntomas de atizonamiento y muerte regresiva en ramillas de 1 y 2 años (Weingartner y Klos, 1975).

Como se observó anteriormente, los daños por los fitopatógenos se ven reducidos en las plantas inoculadas con las cepas de *Pseudomonas fluorescens* e incluso permiten que la planta tolere la presencia de microorganismos fitopatógenos. Este beneficio duradero a la planta se debe a la presencia y colonización de las cepas de *P. fluorescens*, misma interacción conocida como “quimiotaxis”, que permite a las bacterias adherirse a la superficie radical, formar microcolonias o “biofilms”

entre las células de la epidermis (Bais *et al.*, 2006). *Pseudomonas fluorescens* ha sido reportada desde 1995 como una PGPR capaz de colonizar diferentes especies vegetales, así como de tener capacidad antagónica con hongos fitopatógenos que se encuentran en los suelos, tales como *Fusarium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Pythium* y *Sclerotium* (Durkhead *et al.*, 1995).

4.3.5. Síntomas visuales en el cv. Biloxi

Los síntomas que se observaron por presencia de *Phytophthora cinnamomi* en las plantas fue una reducción en la concentración de clorofila total, menor número de brotes y una reducción en la altura de la planta. El diámetro del tallo y peso seco del área foliar se comportaron estadísticamente igual, por lo que no hubo diferencia entre los tratamientos (Figura 12). Esto sugiere que las plantas de arándano cv. Biloxi tienen un desarrollo fisiológico normal inoculadas con las cepas de *Pseudomonas fluorescens* y en presencia de *Phytophthora cinnamomi*. En las plantas inoculadas con *Fusarium* sp. se presentó una disminución en la altura, además de presentar coloraciones marrones en las hojas y clorosis, así como una disminución en la altura, en el peso seco del área foliar y de la raíz (Figura 12). Estos resultados indican que *Phomopsis vaccinii* es un microorganismo que ataca las partes terminales de las plantas de arándano. Durante los cinco meses de evaluación no se presentaron síntomas característicos del daño por *P. vaccinii* únicamente se mostró una necrosis en la zona donde se inoculó el fitopatógeno, siendo un daño menor. Las plantas tenían una apariencia vigorosa, de color verde intenso, y sólo presentaron clorosis en algunas hojas maduras de la parte baja (Figura 12).



Figura 12. Respuesta morfológica de la interacción entre arándano cv. Biloxi y los microorganismos. a = F0-C0; b = F0-UM16; c = F0-UM240; d = F0-UM256; e = F0-UM270; f = PC-C0; g = PC-UM16; h = PC-UM240; i = PC-UM256; j = PC-UM270; k = FS-C0; l = FS-UM16; m = FS-UM240; n = FS-UM256; o = FS-UM270; p = PV-C0; q = PV-UM16; r = PV-UM240; s = PV-UM256; t = PV-UM270.

4.3.6. Determinación de inoculación eficiente de microorganismos en cv. Biloxi

Las plantas del cv. Biloxi tuvieron un comportamiento diferente al que presentó la selección 811; este comportamiento estuvo muy relacionado al tipo de microorganismo inoculado. Algunas plantas que fueron inoculadas con el hongo fitopatógeno presentaron clorosis y manchas marrones en hojas, mientras que otras no mostraron síntomas visuales. Aun así, se lograron aislar los microorganismos inoculados, tanto las bacterias promotoras de crecimiento vegetal como los fitopatógenos (Cuadro 9). Lo que demuestra que aunque las plantas no presenten los síntomas característicos causados por los fitopatógenos, estos están presente y probablemente se encuentran suprimidos por *Pseudomonas fluorescens*, o bien, en algunos casos se requiere mayor tiempo para que se desarrolle la enfermedad.

Cuadro 9. Microorganismos aislados en muestras de plantas de arándano cv. Biloxi.

Tratamientos	Microorganismos aislados		
	<i>P. cinnamomi</i>	<i>Fusarium sp.</i>	<i>P. vaccinii</i>
Testigo absoluto			
Fitopatógeno (Fitop.)			
UM16			
UM240			
UM256			
UM270			
UM16 + Fitop.			
UM240 + Fitop.			
UM256 + Fitop.			
UM270 + Fitop.			

Nota: ■ Presencia del microorganismo; ■ Ausencia del microorganismo.

4.3.7. Síntomas visuales en la selección UM811

Se observó variación en la altura de las plantas, además de clorosis y manchas marrones; algunas plantas ya comenzaban a presentar defoliación de hojas maduras. Las plantas inoculadas con *P. cinnamomi* presentaron clorosis y manchas marrones en hojas maduras, lo cual fue más marcado en las plantas testigo (Figura 13). Las plantas tratadas con *Fusarium* sp. también mostraron manchas marrones, que en su mayoría fueron las plantas testigo y las inoculadas con las cepas UM240, UM256 o la UM270 en interacción con el hongo fitopatógeno (Figura 13). Las plantas inoculadas con *Phomopsis vaccinii* no lograron desarrollar síntomas visibles, como necrosis de brotes y tizones foliares, únicamente formaron una pequeña mancha necrótica en la zona de inoculación. Además de manchas marrones principalmente en la planta testigo y en las que fueron inoculadas con la cepa UM256 (Figura 13).

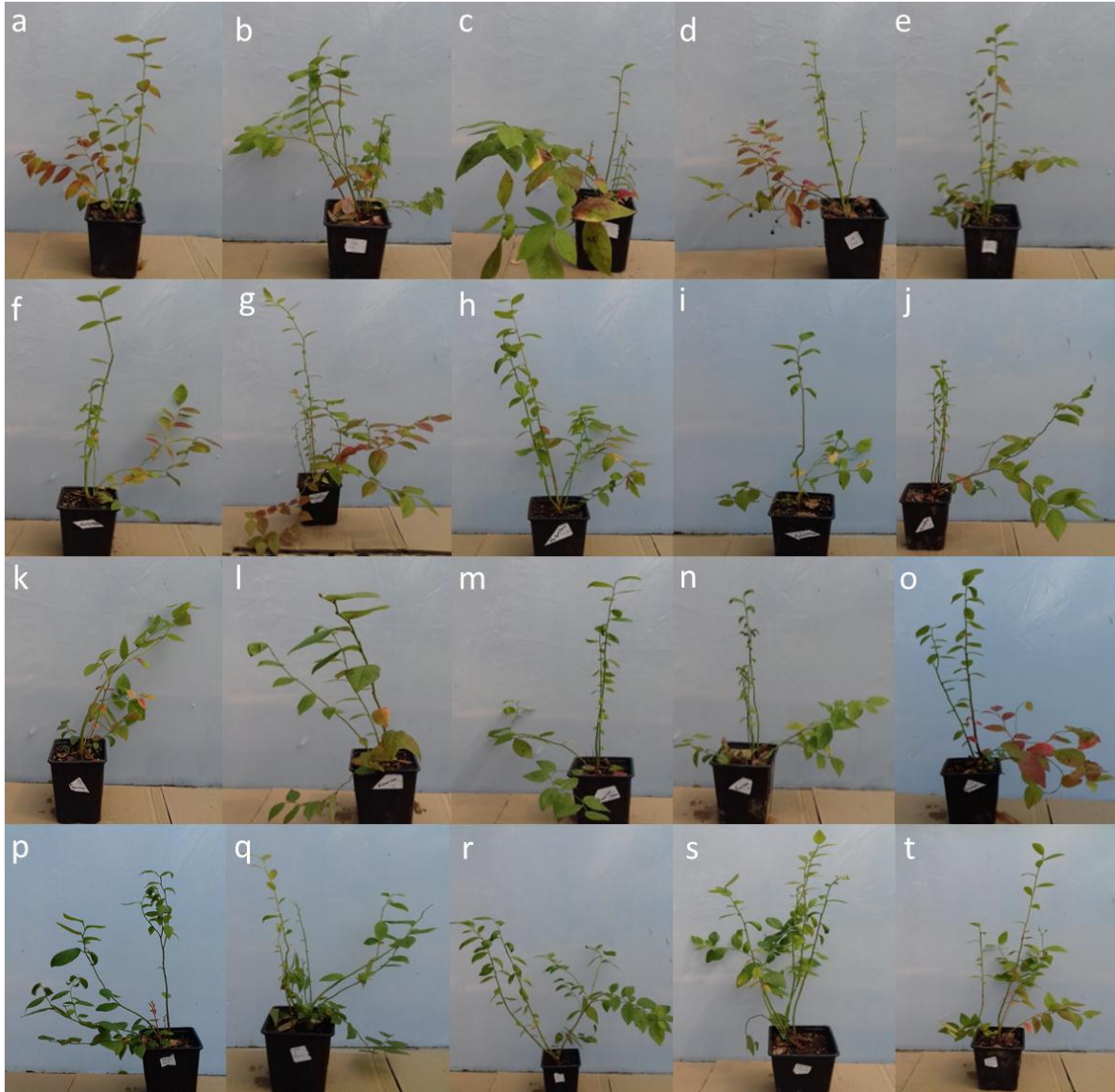


Figura 13. Respuesta morfológica de la interacción entre arándano selección UM811 y los microorganismos. a = F0-C0; b = F0-UM16; c = F0-UM240; d = F0-UM256; e = F0-UM270; f = PC-C0; g = PC-UM16; h = PC-UM240; i = PC-UM256; j = PC-UM270; k = FS-C0; l = FS-UM16; m = FS-UM240; n = FS-UM256; o = FS-UM270; p = PV-C0; q = PV-UM16; r = PV-UM240; s = PV-UM256; t = PV-UM270.

4.3.8. Determinación de inoculación eficiente de microorganismos en la selección UM811

Se lograron aislar los microorganismos fitopatógenos inoculados, en su mayoría estaba presente en el tratamiento que tenía únicamente al fitopatógeno (Cuadro 10). En el caso de *P. vaccinii* éste estuvo presente en todos los tratamientos, incluyendo las plantas del testigo absoluto (aquellas que no fueron inoculadas). Esto pudo ser debido a que todas las plantas fueron colocadas en una misma área y estuvieron cercas unas con otras, lo que facilitó que *Phomosis* se dispersará al resto de ellas, aunque las plantas no presentaron los síntomas característicos del fitopatógeno.

Cuadro 10. Microorganismos aislados en muestras de las plantas de arándano selección UM811.

Tratamientos	Microorganismos aislados		
	<i>P. cinnamomi</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>P. vaccinii</i>
Testigo absoluto			
Fitopatógeno (Fitop.)			
UM16			
UM240			
UM256			
UM270			
UM16 + Fitop.			
UM240 + Fitop.			
UM256 + Fitop.			
UM270 + Fitop.			

Nota: ■ Presencia del microorganismo; ■ Ausencia del microorganismo.

4.3.8.1. Identificación de bacterias por restricción enzimática

Para determinar que el efecto de resistencia que presentaron las plantas de arándano a la inoculación de los hongos fitopatógenos fue en gran medida por la presencia de *P. fluorescens*, se realizaron pruebas de reisolamiento y purificación de ADN, así como un análisis de restricción enzimática de cada una de las cepas utilizadas. Las muestras analizadas presentaron similitud con las cepas de *P. fluorescens* empleadas originalmente (Figura 14), mostrando dos bandas con similitud entre las muestras analizadas y las bacterias originales a 4,000 y 2,000 bp. Con esto, se puede concluir que se trató de las mismas cepas empleadas, y que éstas son eficientes en la colonización y supervivencia de la rizosfera del arándano.

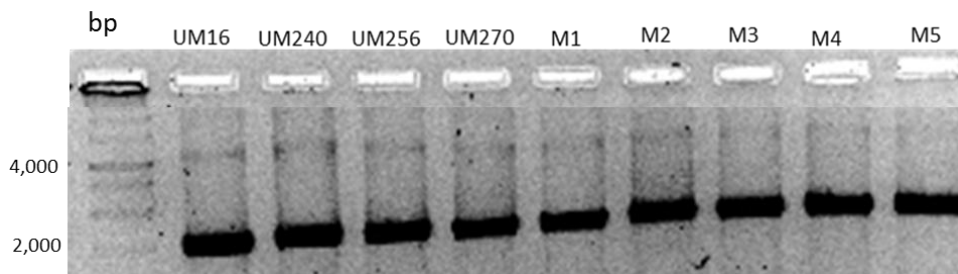


Figura 14. Restricción enzimática con EcoR1 & HindIII. M1 = F0+UM16; M2 = PC+UM240; M3 = FS+UM270; M4 = PV+UM16; M5 = PV+UM256.

Las cepas de *P. fluorescens* tienen la capacidad de colonizar la rizósfera, no sólo de arándano, sino de hortalizas y otras especies vegetales, con lo que se puede lograr estimular el crecimiento de las plantas, producir una diversidad de compuestos e inhibir a hongos fitopatógenos. Estas características hacen a *P. fluorescens* idónea para su uso en la agricultura, reduciendo la contaminación ambiental y la degradación de los suelos, lo que a su vez puede incrementar la rentabilidad de los cultivos.

V. CONCLUSIONES

Las cepas de *Pseudomonas fluorescens* evaluadas tienen efectos inhibitorios *in vitro* contra hongos fitopatógenos del arándano, destacando la cepa UM270, la cual inhibe el crecimiento de *Phytophthora cinnamomi* en un 75%, así como el de *Fusarium* sp. en un 18%. Sin embargo, estas cepas no tienen ningún efecto inhibitorio sobre *Phomopsis vaccinii*, patógeno que causa tizones de brotes y hojas, resultando así las cepas de *P. fluorescens* viables para el control biológico de hongos fitopatógenos.

En las interacciones con plantas y hongos fitopatógenos, *P. fluorescens* resultó ser eficiente en la reducción de síntomas y estimulan el desarrollo normal de las plantas de arándano. Las cepas UM16, UM240 y UM270, promueven el crecimiento, el número de brotes por planta, peso seco del área foliar y raíz, además de incrementar la concentración de clorofila del arándano. Las cepas de *P. fluorescens* son viables para su uso en la agricultura sustentable, lo que puede reducir el uso de agroquímicos e incrementar los rendimientos de los cultivos, siendo indispensable realizar pruebas previas para identificar la cepa que se adapte a las condiciones de cada especie vegetal y que exista así una mayor interacción entre el genotipo y la cepa bacteriana promotora del crecimiento vegetal. Para el caso de arándano, el cv. Biloxi presentó mejor crecimiento con las cepas UM16 y UM270 solas o en interacción con otros microorganismos, mientras que para la selección UM811, la cepa UM240 favorece más su desarrollo.

VI. LITERATURA CITADA

- Alexander, M. 1982. Most Probable Number Method for Microbial Populations. In: Methods of Soil Analysis. Part 2 Chemical and Microbiological Properties. Second Edition. Page, A.L. Editor. American Society of Agronomy, Inc., Soil Science Society of America, Inc. Publisher Madison Wisconsin USA. pp. 815-820.
- Alkharouf, N. W., A. L. Dhanaraj., D. Naik., C. Overall., B. F. Matthews. and L. J. Rowland. 2007. BBGD: an online database for blueberry genome data. BMC Plant Biology. 7:1-7.
- Bais, H., T. Weir, L. Perry, S. Gilroy, and J. Vivanco. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. The Annual Review of Plant Biology. 57:233-266.
- Barriga, C. 1991. Arándano: situación actual y perspectiva. El Campesino (Chile). 122(7): 29-46.
- Bashan, Y. 1998. Significance of timing and level of inoculation with rhizosphere bacteria that plant growth. Applied and Environmental Microbiology 51:1089-1098.
- Bashan, Y. and G. Holguin. 1998. Proposal for the division of plant growth-promoting Rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria) and PGPB. Soil Biology and Biochemistry 30:1225-1228.
- Bashan, Y. J. P. Hernández, L. A. Levya and M. Bacilio. 2002. Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. Bioly and Fertility of Soils 35:359-368.
- Bonsall, R. F., D. M. Weller, and L. S. Tomashow. 1997. Quantification of 2,4-diacetylphoroglucinol by fluorescent *Pseudomonas* spp. *in vitro* and in the rhizosphere of wheat. Applied and Environmental Microbiology 63:951-955.

- Brannen, P. M., S. Nesmith, and P. Harmon. 2007. Use of phosphonates for control of *Phytophthora* root rot of blueberry. *Phytopathology* 97:S13.
- Brenner, D. J., N. R. Krieg, and J. T. Staley. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2: The Proteobacteria Part A Introductory Assays*, Springer, New York, NY, USA. 304 p.
- Bryla, D. and R. Linderman. 2007. Implications of irrigation method and amount of water application on *Phytophthora* and *Pythium* infection and severity of root in highbush blueberry. *HortScience* 42:1463-1467.
- Bryla, D.R. and R. G. Linderman. 2008. Incidence of *Phytophthora* and *Pythium* infection and the relation to cultural conditions in Commercial Blueberry fields. *HortScience* 43(1):260-263.
- Burr, T. J., M. N. Schroth, and T. Suslow. 1978. Increased potato yields by treatment of seed pieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. *Journal of phytopathology*. 68:1377-1383.
- Caruso, F. L. and D. C. Ramsdell. 1995. *Compendium of blueberry and cranberry diseases*. APS Press: St. Paul, MN, USA. 87 p.
- Chen, C., E. M. Bauske., G. Musson., R. Rodriguez-Kabana, and J. W. Kloepper. 1995. Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. *Biological Control* 5:83-91.
- Chernin, L. and I. Chet. 2002. Microbial enzymes in biocontrol of plant pathogens and pests. Pp. 171-225. *In*: R. G. Burns and R. P. Dick (ed.). *Enzymes in the environment: activity, ecology and applications*. Marcel Dekker, New York, N.Y. 640 p.
- Colin, D. K. and J. H. Bruce. 2002. The effect of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption on post prandial serum antioxidant status in human subjects. *British Journal of Nutrition* 88:389-397.

- De Meyer, G. and M. Hofte. 1997. Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. *Phytopathology* 87:588-593.
- De Meyer, G., K. Audenaert, and M. Hofte. 1999. *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2-induced systemic resistance in tobacco depends on in planta salicylic acid accumulation but is not associated with PR1 expression. *European Journal of Plant Pathology* 105:513-517.
- De Silva, A., K. Patterson, C. Rothrock, and J. Moore. 2000. Growth promotion of highbush blueberry by fungal and bacterial inoculants. *Hortscience* 35(7): 1228-1230.
- De Weger, L. A., A. J. Van der Bij., L. C. Dekkers., M. Simons., C. A. Wijffelman, and B. J. J. Lugtenberg. 1995. Colonization of the rhizosphere of crop plants by plant-beneficial pseudomonads. *FEMS Microbiology Ecology* 17:221-228.
- Diaz-Vargas, P., R. Cerrato-Ferrera, J. J. Almaraz-Suárez, y G. Alcántar-González. 2001. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *Terra* 19:327-335.
- Durkhead, P., A. David, and P. Slininger. 1995. Bioautography shows antibiotic production by soil *Biology and Biochemistry*. 27:129. 1611-1616.
- Dybas, M. J., G. M. Tarara, and C. S. Criddle. 1995. Localization of carbon tetrachloride transformation activity of *Pseudomonas* sp. strain KC. *Applied and Environmental Microbiology* 61:758-762.
- Frankowski, J., M. Lorito., F. Scala., R. Schmidt., G. Berg, and H. Bahl. 2001. Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthia* HRO-C48. *Archives of Microbiology* 176:421-426.
- Galleta, G.J. and J. R. Ballington. 1996. Blueberries, cranberries and lingonberries. Pp. 1-107. *In: J. Janick and J. N. Moore (Eds.). Fruit breeding. Vol. II. Vine and small fruits, Wiley, New York. 478 p.*

- Gerhardson, B. 2002. Biological substitutes for pesticides. *Trends in Biotechnology* 20:338-343.
- Glick, B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 41 (Suppl 2): 109-114.
- Glick, B. R., Z. Cheng., J. Czarny, and J. Duan. 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *European Journal of Plant Pathology* 199:329-339.
- Guerra, G. A., C. A. Betancourth, y C. E. Salazar. 2011. Antagonsismo de *Pseudomonas fluorescens* Migula frente a *Fusarium oxysporum* fsp. Pisi Schtdl en arveja *Pisum sativum* L. *Revista U.D.C.A. Actualidad y Divulgación Científica* 14(2):33-42.
- Guerrero, J. y A. I. Godoy. 1989. Determinación de *Phomopsis vaccinii* (Shaer. Stevens y Bein) en arándano alto (*Vaccinium corymbosum* L.). *Agricultura Técnica (Chile)* 49: 220-233.
- Hancock, J. F., P. Lyrene., C. E. Finn., N. Y. Vorsa, and G. A. Lobos. 2008. Blueberries and cranberries. Pp. 115-149. *In*: J. F. Hancock (ed.). *Temperate Fruit Crop Breeding: Germplasm to Genomics*. Springer Science Business Media B. V. 440 p.
- Hass, D. and C. Keel. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annual Review of Phytopathology* 41:117-153.
- Hernández-León, R., D. Rojas-Solís, M. Contreras-Pérez, Ma del C. Orozco-Mosqueda, L.I. Macías-Rodríguez, H. Reyes-de la Cruz, E. Valencia-Cantero, y G. Santoyo. 2015. Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biological Control* 81:83-92.

- Jimenez-Delgadillo, M. R. 2004. Péptidos secretados por *Bacillus subtilis* que modifican la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. Cinvestav-Irapuato, Guanajuato, México.
- Johri, B. N. 2001. Technology development and demonstration of a new bacterial rhizosphere competent. *Environmental microbiology*. 1:9-13.
- Joseph, B. R., R. Patra, and R. Lawrence. 2007. Characterization of plant growth promoting Rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Plant Production*. 1 (Suppl2):141-152.
- Jung, J. H., S. W. Kim, Y. S. Kim, K. Lamsal and Y. S. Lee. 2013. Inhibition effects against plant pathogenic fungi and plant growth promotion by beneficial microorganisms. *The Korean Journal of Mycology*. 41:118-126.
- Kloepper, J. W. and M. N. Schroth. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. Pp. 879-882. *In: Proceedings of the 4th. International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*. Ed. Station de Pathologie Vegetal et Phytobacteriologie. Vol. 2. Angers, France. 879 p.
- Kloepper, J. W., M. N. Schroth, and T. D. Miller. 1980. Effect of rhizosphere colonization by plant growth promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Journal of Phytopathology*. 70:1078-1082.
- Kloepper, J. W., R. Lifshitz, and R. M. Zablotowicz. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology*. 7 (suppl 2):39-43.
- Kumar, P., N. Kaushal, and R. C. Dubey. 2015. Isolation and identification of plant growth promoting rhizobacteria (*Pseudomonas* spp.) and their effect on growth promotion of *Lycopersicon esculentum* L. *Annals of Microbiology* 62(2): 44-51.

- Larach, A., X. Besoain, and E. Salgado. 2009. Crown and root rot of highbush blueberry caused by *Phytophthora cinnamomi* and *P. citrophthora* and cultivar susceptibility. *Ciencia e Investigación Agraria (SciELO)* 36:433-442.
- Lata, K., A. K. Saxena, and K. V. B. R. Tilak. 2002. Biofertilizers to augment soil fertility and crop production. Pp. 279-291. *In: R. R. Krishna (ed.). Soil Fertility and Crop Production Science. Publishers, USA. 752 p.*
- Leeman, M., J. A. Van Pelt., F. M. Den Ouden., M. Heinsbroek., P.A. Bakker, and B. Schippers. 1996. Iron availability affects induction of systemic resistance to *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* 86:149-155.
- Levy, Y. 1982. Método de determinación de clorofila con N, N-dimetilformamida. Comunicación personal.
- Lim, H. S., Y. S. Kim, and S. D. Kim. 1991. *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. *Applied and Environmental Microbiology* 57:510-516.
- Lim, T. K. 2012. *Vaccinium corymbosum* in: edible medicinal and non-medicinal plants. *Fruits* 2:452-464.
- Luby, J. J., J. R. Ballington., A. D. Draper., K. Pliszka, and M. E. Austin. 1991. Blueberries and cranberries (*Vaccinium*). *Acta Horticulturae* 90: 391-456.
- Lugtenberg, B. and F. Kamilova. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*. 63:541-556.
- Malik, K. A., B. Rakhshanda., S. Mehnaz., G. Rasul, and M. S. Mirza. 1997. Association of nitrogen-fixing plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with kallar grass and rice. *Plant and Soil* 194:37-44.
- Maurhofer, M., C. Hase., P. Meuwly., J. Métraux, and G. Défago. 1994. Induction of systematic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by root

- colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO: Influence of the *gac A* gene and of pyoverdinin production. *Phytopathology* 84:562-570.
- Maurhofer, M., C. Reimann., P. Schmidli-Sacherer., S. Heeb., D. Haas, and G. Défago. 1998. Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopathology* 88:678-684.
- Mehnaz, S., D. H. Baig, F. Jamil, B. Weselowski, and G. Lazarovits. 2009. Characterization of a phenazine and hexanoyl homoserine lactone producing *Pseudomonas aurantiaca* strain PB-St2, isolated from sugarcane stem. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19:1688-1694.
- Milholland, D. R. and R. J. Meyer. 1984. Diseases and arthropod pests of blueberries. Bulletin 468. North Carolina Agricultural Research Service. 33 p.
- Mondragón-Flores, A., J. López-Medina., S. Ochoa-Ascencio, y M. Gutiérrez-Contreras. 2012. Hongos asociados a la parte aérea del arándano en Los Reyes, Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:02. 141-144.
- No-Medina, J., C. Yam-Chimal, L. Borges-Gómez, J. J. Zúñiga-Aguilar, y G. Godoy-Hernández. 2014. Aislados bacterianos con potencial biofertilizante para plántulas de tomate. *Terra Latinoamericana* 32. 273-281.
- Palleroni, N. J. 2008. The Road to the Taxonomy of *Pseudomonas*. p. 1-18. In: P. Cornelis (Ed.) *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*, Caister Academic Press, Norfolk, USA. 244 p.
- Papavizas, G. C., J. A. Lewis., and T. H. Abd-Elmoity. 1982. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to Benomyl and enhanced biocontrol capabilities. *Phytopathology* 72: 1266-1282.
- Park J.K. and H. N. Chang. 2000. Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnology Advances* 18:303-319.

- Peñalver, R., N. Durán-Vila, and M. M. López. 1994. Characterisation and pathogenicity of bacteria from shoot tips of the globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Annals of Applied Biology* 125: 501-513.
- Pérez, D., J. L. 2004. Detección molecular del alelo de resistencia a benomilo en cepas de *Botrytis cinérea* Pers. ex Fr., aisladas de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.). Tesis de Licenciatura. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia, Chile. 37 p.
- Picard, C., F. Di Cello., M. Ventura., R. Fani, and A. Guckert. 2000. Frequency and biodiversity of 2,4 diacetylphloroglucinol-producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of Plant Growth. *Applied and Environmental Microbiology* 66:948-955.
- Postma, J., M. Montanari., P. H. J. F. Van den Boogert. 2003. Microbial enrichment to enhance the disease suppressive activity of compost. *European Journal of Soil Biology* 39:157-163.
- Ramirez, Mendoza, Ma. del R. 2014. Identificación filogenética de hongos y bacterias aisladas de material propagativo usado como semilla en arándano (*Vaccinium corymbosum* L.). Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. de México.
- Raniere, L. C. 1961. Observations on new or unusual diseases of highbush blueberry. *Plant Disease Report* 45:844.
- Ratnaparkhe, M. B. 2007. Blueberry. In: fruit and nuts, genome mapping and molecular breeding in plants. *Genome mapping and molecular breeding in plant*. CABI 4:217-227.
- Retamales, J.B. and J. F. Hancock. 2012. The blueberry industry. Pp. 1-17. *In: Blueberries*. CABI. 336 p.
- Rojas-Solis, D., E. Hernández-Pacheco, y G. Santoyo. 2016. Evaluation of *Bacillus* and *Pseudomonas* to colonize the rhizosphere and their effect on growth

- promotion in tomato (*Physalis ixocarpa* Brot. Ex Horm.). Revista Chapingo Serie Horticultura. 22. 45-57.
- Rokhzadi, A., A. Asgharzadeh, F. Darvish, G. Nour-Mohammadi, and E. Majidi. 2008. Influence of plant growth promoting rhizobacteria on dry matter accumulation of chickpea (*Cicer arietinum*) under field condition. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science 3:253-257.
- Rzedowski, J. y G. Calderon de Rzedowski. 2001. Flora fanerogámica del valle de México. 2da edición. Instituto de ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Patzcuaro, Mich. Pp. 526-535.
- Saharan, B. S. and V. Nehra. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. Life Sciences and Medicine Research. Vol. 2011:LSMR-21 pp: 1-30.
- Santoyo, G., E. Valencia-Cantero., Ma. Del C. Orozco-Mosqueda., J. J. Peña-Cabriales y R. Farías-Rodríguez. 2010. Papel de los sideróforos en la actividad antagónica de *Pseudomonas fluorescens* zum80 hacia hongos fitopatógenos. Terra Latinoam 28:53-60.
- Schoebitz, M., H. Simonin, and D. Poncelet. 2012. Starch filler and osmoprotectants improve the survival of rhizobacteria in dried alginate beads. Journal of Microencapsulation 29: 532-538.
- SIAP, (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2016. www.siap.gob.mx/cierre-de-la-producción-agrícola-por-cultivo/. Accesada el 28 de Mayo del 2017.
- Siddiqui, Z. A. 2006. PGPR: Prospective Biocontrol Agents of Plant Pathogens. PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Pp 211-220.
- Sikora, R. A. 1998. Interrelationship between plant health promoting rhizobacteria, plant parasitic nematodes and soil microorganisms. Medical Faculty Landbouw Rijksuniversiteit Ghent 53:867-878.

- Song, G.Q. and J. F. Hancock. 2011. *Vaccinium* sp. Pp. 197-221. In: C. Kole (ed.) *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*. Springer Berlin Heidelberg. 517 p.
- Spiers, J. M. and S. J. Stringer. 2002. Biloxi Southern Highbush Blueberry. *Acta Horticulturae* 574: 153-155.
- Tan, Y. 1991. Movement through soil of a biological control agent *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biological and Biochemistry* 23:821-825.
- Torrecillas, A., A. León, F. Del Amor, y M. C. Martínez-Mompeán. 1984. Determinación rápida de clorofila en discos foliares de limonero. *Fruits*. *Fruits* 39:617-622.
- Torres-Rubio, M. G., S. A. Valencia-Plata., J. Bernal-Castillo, and P. Martínez-Nieto. 2000. Isolation of Enterobacteria, *Azotobacter* sp. and *Pseudomonas* sp. producers of indole-3-acetic acid and siderophores from colombian rice rhizosphere. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 42:171-176.
- Van Loon, L. C., P. A. Bakker, and C. M. Pieterse. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36:453-483.
- Van Peer, R., G. J. Niemann, and B. Schippers. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of Carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology* 81:728-734.
- Vassilev, N., M. Vassileva, R. Azcon, and A. Medina. 2001. Application of free and Ca-alginate entrapped *Glomus deserticola* and *Yarrowia lipolytica* in soil-plant system. *J Biotechnol* 91:237-242.
- Venturi, V., P. Weiskeek, and M. Koster. 1995. Gene regulation of siderophore mediated iron acquisition in *Pseudomonas*: not only the fur repressor. *Molecular Microbiology* 17:603-610.

- Weingartner, P.D. and J. E. Klos. 1975. Etiology and symptomatology of canker and dieback diseases on highbush blueberries caused by *Godronia* (Fusicocumm) *Cassandrae* and *Diaporthe* (*Phomopsis*) *vaccinii*. *Phytopathology* 65:105-110.
- Welbaum, G., A. V. Sturz, Z. Dong, and J. Nowak. 2004. Fertilizing soil microorganisms to improve productivity of agroecosystems. *Critical Reviews in Plant Sciences* 23:175-193.
- Weller, D. M. 2007. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology* 97:250:253.
- Weller, D. M., J. M. Raaijmakers., B. B. McSpadden-Gardener, and L. S. Thomashow. 2002. Microbial population responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 40:309-348.
- Wilcox, M. 1939. *Phomopsis* twig blight of blueberry. *Phytopathology* 29: 136-142.
- Wilcox, M. 1940. *Diaporthe vaccinii* the ascigerous stage of *Phomopsis*, causing a twig blight of blueberry. *Phytopatology* 30: 441-443.
- Zohar-Perez, C., E. Ritte, L. Chernin, I. Chet and A. Nussinovitch. 2002. Preservation of chitinolytic *Pantoea agglomerans* in a viable form by cellular dried alginate-based carriers. *Biotechnology Progress* 18:1113-1140.