

Effect of fluorescent *Pseudomonas* on tomato seed germination and seedling vigor

Efecto de *Pseudomonas* fluorescentes en la germinación de semilla y vigor de plántulas de jitomate

María Isabel Rivera-Conde¹; Sergio Aranda-Ocampo¹; Guillermo Carrillo-Castañeda^{1*}; Adriana Rosalía Gijón Hernández²; Graciela Margarita Bueno-Aguilar¹

¹Colegio de Postgraduados. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, México, C. P. 56230, MÉXICO.

²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Av. Progreso núm. 5, Col. Barrio de Santa Catarina, Delegación Coyoacán, Ciudad de México, C. P. 04010, MÉXICO.

*Corresponding author: carrillo@colpos.mx, tel. (595) 9520200 ext. 1541.

Abstract

The bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) and *Xanthomonas vesicatoria* (Xv) are of great interest in tomato production because they cause major economic losses worldwide. They are transmitted by seeds and the management strategies for these pathogens in tomato production systems are not completely effective. Therefore, the objective of this research was to identify fluorescent *Pseudomonas* strains of different ecological origin and evaluate their antagonism against Cmm and Xv and their effect as growth promoters on tomato seed germination and seedling vigor. We evaluated 356 fluorescent *Pseudomonas* strains isolated from different ecological niches: roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) rhizosphere, tomato (*Solanum lycopersicum* L.) rhizosphere and *Claviceps gigantea* sclerotium mycosphere. Antagonism against *C. michiganensis* and *Xanthomonas vesicatoria* was evaluated in *in vitro* dual confrontation tests in King's B culture medium, which generated 20 fluorescent *P.* strains antagonistic to one or both bacteria. The antagonistic strains (n = 20) were characterized metabolically by their production of 3-indole acetic acid (IAA) and siderophores (SID), and were identified genetically by the polymerase chain reaction (PCR) technique with the amplification and sequencing of the 16S rRNA gene by primers FD1 and RD1. The results of the metabolic characterization of the strains indicated that 65 % produced IAA and 100 % SID. Inoculation of these bacteria, by the Bio-priming technique, in tomato var. Rio Grande seeds showed that 95 % of them significantly ($P \leq 0.05$) increased the germination rate (T_{50}) and the dry biomass production of the seedling roots. The partial sequencing of the 16S rRNA gene identified the bacterial strains as *Pseudomonas* sp. (65 %), *P. putida* (25 %) and *P. fluorescens* (10 %).

Keywords:

Solanum lycopersicum L., bio-priming, antagonism, growth promotion, inoculation.

Resumen

Las bacterias *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) y *Xanthomonas vesicatoria* (Xv) son de gran interés en la producción de jitomate ya que ocasionan grandes pérdidas económicas a nivel mundial. Se transmiten por semillas y las estrategias de manejo para estos patógenos en sistemas de producción de jitomate no son completamente eficaces. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue identificar cepas de *Pseudomonas* fluorescentes de diferente origen ecológico, evaluar su antagonismo contra Cmm y Xv, y su efecto como promotoras de crecimiento en la germinación de semilla y vigor en plántula de jitomate. Se evaluaron 356 cepas de *Pseudomonas* fluorescentes aisladas de diferentes nichos ecológicos: rizósfera de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) y micósfera de esclerocios de *Claviceps gigantea*. El antagonismo contra *C. michiganensis* y *Xanthomonas vesicatoria* se evaluó en ensayos de confrontación dual *in vitro* en medio de cultivo B de King, el cual generó 20 cepas de *P.* fluorescentes antagonistas a una o ambas bacterias. Las cepas antagonistas (n = 20) se caracterizaron metabólicamente por su producción de ácido-3-indol acético (AIA) y sideróforos (SID), y se identificaron genéticamente por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA mediante los iniciadores FD1 y RD1. Los resultados de la caracterización metabólica de las cepas indicaron que 65 % produjeron AIA y 100 % SID. La inoculación de estas bacterias, por la técnica Bio-priming, en semillas de jitomate var. Río Grande mostró que 95 % de ellas aumentaron significativamente ($P \leq 0.05$) la velocidad de germinación (T_{50}) y la producción de biomasa seca de las raíces de las plántulas. La secuenciación parcial del gen 16S rRNA identificó las cepas bacterianas como *Pseudomonas* sp. (65 %), *P. putida* (25 %) y *P. fluorescens* (10 %).

Palabras clave:

Solanum lycopersicum L., bio-priming, antagonismo, promoción de crecimiento, inoculación.

Please cite this article as follows (APA 6): Rivera-Conde, M., I., Aranda-Ocampo, S., Carrillo-Castañeda G., Gijón-Hernández, A., R., & Bueno-Aguilar, G., M. (2018). Effect of fluorescent *Pseudomonas* on tomato seed germination and seedling vigor. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 24(2), 121-132. doi: 10.5154/r.rchsh.2017.06.023



Revista Chapingo
Serie Horticultura

Introduction

The tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is considered the most important horticultural export species, as well as being the most cultivated and with the highest consumption per capita. The main tomato-producing countries are China, India and the United States. Mexico ranks tenth with a planted area of 50,595.56 ha and a production of 3,098,329.41 t (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP], 2017).

The Gram-positive bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) causes bacterial “wilt” and “canker,” which are the most important diseases in tomato (EFSA Panel on Plant Health [PLH], 2014; Gartemann et al., 2003). On the other hand, *Xanthomonas vesicatoria* (Xv) is a Gram-negative bacterium that constitutes a complex of species associated with “bacterial spot” disease. Both pathogens are transmitted by seed and cause economic losses throughout the world (Jones, Jones, Stall, & Zitter, 1991; Jones, Lacy, Bouzar, Stall, & Schaad 2004).

Management strategies in tomato production systems for the aforementioned pathogens are not completely effective, so there is a growing demand for the development of new approaches with the least possible environmental impact. In this context, the study of microorganisms as biocontrol agents of plant diseases, biofertilizers and phytoestimulators is increasing, in an effort to reduce the use of chemical pesticides in agriculture (Raaijmakers, Paulitz, Steinberg, Alabouvette, & Moënne-Loccoz, 2009).

Bacterization is the process of inoculating seeds, roots or other organs of the plant with bacteria to promote their growth (Kloepper, Lifshitz, & Schroth, 1988). Bio-priming is a technique that consists of hydrating, incorporating or coating the seed with microorganisms; this technique favors microbial activity with an ecological approach and is an important alternative to the use of pesticides for the management of soil diseases and those transmitted by seeds (Raj, Shetty, & Shetty, 2004; Rao, Kulkarni, Lingaraju, & Nadaf, 2009).

Several species of *Pseudomonas* possess genetic characteristics that are attractive for their exploration as microbial inoculants in agriculture (Meléndez-Monroy, Aranda-Ocampo, Carrillo-Castañeda, Hernández-Morales, & Soto-Rojas, 2016). In particular, fluorescent *Pseudomonas* populations have been considered excellent candidates for use as biological control agents (Höfte & Altier, 2010; Mercado-Blanco, Alós, Rey, & Prieto, 2016) and growth promoters in various agricultural production systems (Ahmadzadeh & Sharifi, 2009; Weller, 2007). Within the genetic populations of fluorescent *Pseudomonas*, strains can be isolated to be integrated as microbial inoculants capable of inhibiting the development of

Introducción

El jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) se considera la especie hortícola de exportación más importante, además de ser la más cultivada y de mayor consumo per cápita. Los principales países productores de esta hortaliza son China, India y Estados Unidos. México ocupa el décimo lugar con una superficie sembrada de 50,595.56 ha y una producción de 3,098,329.41 t (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP], 2017).

La bacteria Gram positiva *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) causa “marchitez” y “chancro” bacteriano, siendo las enfermedades más importantes en jitomate (EFSA Panel on Plant Health [PLH], 2014; Gartemann et al., 2003). Por otro lado, *Xanthomonas vesicatoria* (Xv) es una bacteria Gram negativa que constituye un complejo de especies asociadas con la enfermedad “mancha bacteriana”. Ambos patógenos se transmiten por semilla y causan pérdidas económicas en todo el mundo (Jones, Jones, Stall, & Zitter, 1991; Jones, Lacy, Bouzar, Stall, & Schaad 2004).

Las estrategias de manejo en sistemas de producción de jitomate para los patógenos mencionados no son completamente eficaces, por lo que existe una demanda creciente en el desarrollo de nuevos enfoques con el menor impacto al ambiente. En este contexto, el estudio de microorganismos como agentes de biocontrol de enfermedades en plantas, biofertilizantes y fitoestimuladores va en aumento, esto con la finalidad de disminuir el uso de plaguicidas químicos en la agricultura (Raaijmakers, Paulitz, Steinberg, Alabouvette, & Moënne-Loccoz, 2009).

La bacterización es el proceso de inocular semilla, raíces u otro órgano de la planta con bacterias para favorecer su crecimiento (Kloepper, Lifshitz, & Schroth, 1988). El Bio-priming es una técnica que consiste en hidratar, incorporar o recubrir la semilla con microorganismos; esta técnica favorece la actividad microbiana con un enfoque ecológico y es una alternativa importante al uso de pesticidas para el manejo de enfermedades del suelo y aquellas transmitidas por semillas (Raj, Shetty, & Shetty, 2004; Rao, Kulkarni, Lingaraju, & Nadaf, 2009).

Diversas especies de *Pseudomonas* poseen características genéticas que son atractivas para su exploración como inoculantes microbianos en la agricultura (Meléndez-Monroy, Aranda-Ocampo, Carrillo-Castañeda, Hernández-Morales, & Soto-Rojas, 2016). En particular, las poblaciones de *Pseudomonas* fluorescentes se han considerado excelentes candidatos para su uso como agentes de control biológico (Höfte & Altier, 2010; Mercado-Blanco, Alós, Rey, & Prieto, 2016) y promotores de crecimiento en diversos sistemas de producción agrícola (Ahmadzadeh & Sharifi, 2009; Weller, 2007).

other microorganisms and of promoting beneficial effects, both in tomato seed germination and seedling growth. Therefore, the aim of this study was to identify *Pseudomonas fluorescens* strains of different ecological origin, as well as evaluate their antagonism against *Cmm* and *Xv* and their effect as growth promoters in tomato seed germination and seedling vigor.

Materials and methods

Isolation of fluorescent *Pseudomonas*

A collection of 356 fluorescent *P.* strains isolated from different ecological origins was used: 272 from the rhizosphere of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) var. Criolla, 74 from the rhizosphere of tomato var. Cid and 10 from the sclerotium mycosphere of the maize (*Zea mays* L.) pathogen *Claviceps gigantea*. The fluorescent *P.* from the rhizosphere were isolated from 1 g of root with rhizospheric soil in 10 mL of sterile distilled water, which was kept under stirring for 10 min; from here serial dilutions were made (from 10^{-1} to 10^{-4}) and 100 μ L of the suspension was inoculated in Petri dishes with King's B medium (King, Ward, & Raney, 1954) and incubated at 28 ± 2 °C for 72 h. For the isolation of the bacterial strains of the mycosphere, the previous procedure was used from 1 g of *C. gigantea* sclerotia. Fluorescent *P.* populations were verified by the fluorescence emission of the colonies under UV light (268 nm). The colonies in pure culture were preserved in nutrient broth and 40 % glycerol at -80 °C.

In vitro selection of antagonistic fluorescent *Pseudomonas*

The inhibitory effect of fluorescent *P.* against *Cmm* and *Xv* was determined in triplicate by *in vitro* dual confrontation tests in King's B culture medium in Petri dishes (12 x 12 cm). The dishes were divided into 25 equal quadrants and each pathogen was inoculated individually with 500 μ L of a suspension in sterile distilled water with a density of 3×10^8 colony forming units (CFU) per mL. Subsequently, each fluorescent strain was inoculated in the center of each quadrant with 3 μ L of a suspension with 3×10^8 CFU·mL⁻¹. The dishes were incubated at 28 ± 2 °C for 72 h; as a control, dishes inoculated only with the bacterial pathogens were established. The *in vitro* antagonism was determined by the formation of inhibition halos at the inoculation site and the width of the halo was measured with a scale ruler (0-30 cm, with a 1:100 scale).

Inoculation of fluorescent *Pseudomonas* in tomato seed

Twenty fluorescent strains exhibiting *in vitro* antagonism with an inhibition halo ≥ 5 mm against

Dentro de las poblaciones genéticas de *Pseudomonas* fluorescentes se pueden aislar cepas para integrarse como inoculantes microbianos capaces de inhibir el desarrollo de otros microorganismos y de promover efectos benéficos, tanto en la germinación de semilla como en el crecimiento de plántula de jitomate con potencial. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue identificar cepas de *Pseudomonas fluorescens* de diferente origen ecológico, evaluar su antagonismo contra *Cmm* y *Xv*, y su efecto como promotoras de crecimiento en la germinación de semilla y vigor en plántula de jitomate.

Materiales y métodos

Aislamiento de *Pseudomonas* fluorescentes

Se utilizó una colección de 356 cepas de *P.* fluorescentes aisladas de diferentes orígenes ecológicos: 272 de la rizósfera de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) var. Criolla, 74 de la rizósfera de jitomate var. Cid y 10 de la micósfera de esclerocios del patógeno de maíz (*Zea mays* L.) *Claviceps gigantea*. Las *P.* fluorescentes de la rizósfera se aislaron a partir de 1 g de raíz con suelo rizosférico en 10 mL de agua destilada estéril, esto se mantuvo en agitación por 10 min; de aquí se realizaron diluciones seriadas (de 10^{-1} a 10^{-4}) y se inocularon 100 μ L de la suspensión en placas Petri con medio B de King (King, Ward, & Raney, 1954) e incubaron a 28 ± 2 °C por 72 h. Para el aislamiento de las cepas bacterianas de la micósfera se utilizó el procedimiento anterior a partir de 1 g de esclerocios de *C. gigantea*. Las poblaciones de *P.* fluorescentes se verificaron por la emisión de fluorescencia de las colonias bajo luz UV (268 nm). Las colonias en cultivo puro se preservaron en caldo nutritivo y 40 % glicerol a -80 °C.

Selección *in vitro* de *Pseudomonas* fluorescentes antagonistas

El efecto inhibitorio de las *P.* fluorescentes contra *Cmm* y *Xv* se determinó por triplicado mediante pruebas de confrontación dual *in vitro* en medio de cultivo B de King en placas Petri (12 x 12 cm). Las placas se dividieron en 25 cuadrantes iguales y cada patógeno se inoculó individualmente con 500 μ L de una suspensión en agua destilada estéril con una densidad de 3×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) por mL. Posteriormente, cada cepa fluorescente se inoculó en el centro de cada cuadrante con 3 μ L de una suspensión con 3×10^8 UFC·mL⁻¹. Las placas se incubaron a 28 ± 2 °C por 72 h; como testigo se establecieron placas inoculadas solo con los patógenos bacterianos. El antagonismo *in vitro* se determinó por la formación de halos de inhibición en el sitio de inoculación y se midió el ancho del halo con un escalímetro (0-30 cm, escala 1:100).

Cmm and *Xv* were selected. Fluorescent *P.* ($n = 20$) were inoculated by the Bio-priming technique in saladette tomato var. Río Grande seeds. Before inoculation, the seeds were hydrated using the method described by Artola, Carrillo-Castañeda, and García-de los Santos (2003): lots of 33 seeds were individually placed in a closed mesh with gauze within a bottle with 1 L of distilled water in aeration for 24 h by means of a fish tank pump. Afterwards, the seeds were uniformly distributed in plastic Petri dishes (60 mm diameter) and the water was removed from the surface by aeration with two fans for 3 h under laboratory conditions.

The fluorescent *P.* were inoculated in triplicate for each strain by immersing the seed for 2 h in 0.4 mL of a bacterial suspension at a cell density of 3×10^8 CFU·mL⁻¹ (0.9 absorbance in a Coleman Junior® II 620 spectrophotometer at 660 NM). Each treatment was placed in Petri dishes with sterile filter paper, 3.5 mL of distilled water were added to each dish and then they were placed in a germination chamber at 28 ± 2 °C for 12 days (International Seed Testing Association [ISTA], 2009). The effect of the inoculating the bacteria was compared with seeds treated only with distilled water, for which daily counts of germinated seeds with radicles > 1 mm were made. The results were expressed as a germination percentage at 12 days of each inoculated fluorescent *P.* strain and the time (h) in which 50 % of the seeds germinated (T_{50}) was determined according to the equation described by Salehzade, Shishvan, Ghiyasi, Forouzin, and Siyahjani (2009).

$$T_{50} = t_i + \frac{\left(\frac{N}{2} - n_i\right)(t_j - t_i)}{n_j - n_i}$$

Where N is the final number of germination, n_j and n_i are the cumulative number of seeds germinated by adjacent counts at times when $n_i < N/2 < n_j$, t_i the number of days corresponding to n_i and t_j the number of days corresponding to n_j .

With the germination data, an analysis of variance was performed using the Statistical Analysis System package (SAS, 2002). The differences among the means of the treatments were estimated using Dunnett's test to compare each treatment with the control (Narbona-Fernández, Ortiz-Ballesteros, & Arista-Palmero, 2003).

Effect of fluorescent *Pseudomonas* on tomato seedling vigor

Twenty germinated seeds for each replication of the previous experiment were randomly selected and transplanted into plastic trays with peat moss (PRO-MOSS TBK, made of select long-fibered blond *Sphagnum*

Inoculación de *Pseudomonas* fluorescentes en semilla de jitomate

Se seleccionaron 20 cepas fluorescentes que mostraron antagonismo *in vitro* con un halo de inhibición ≥ 5 mm contra *Cmm* y *Xv*. Las *P.* fluorescentes ($n = 20$) se inocularon por la técnica de Bio-priming en semillas de jitomate de tipo Saladette var. Río Grande. Antes de la inoculación, las semillas se hidrataron por el método descrito por Artola, Carrillo-Castañeda, y García-de los Santos (2003): se colocaron individualmente lotes de 33 semillas en una malla cerrada con ligas dentro de un frasco con 1 L de agua destilada en aireación por 24 h mediante una bomba de pecera. Después, las semillas se distribuyeron uniformemente en placas Petri de plástico (60 mm diámetro) y se eliminó el agua de la superficie mediante aireación con dos ventiladores por 3 h en condiciones de laboratorio.

Las *P.* fluorescentes se inocularon por triplicado para cada cepa mediante la inmersión de la semilla por 2 h en 0.4 mL de una suspensión bacteriana a una densidad celular de 3×10^8 UFC·mL⁻¹ (absorbancia de 0.9 en un espectrofotómetro marca Coleman Junior® II 620 a 660 nm). Cada tratamiento se colocó en placas Petri con papel filtro estéril, se agregaron 3.5 mL de agua destilada a cada caja y se colocaron en una cámara de germinación a 28 ± 2 °C durante 12 días (International Seed Testing Association [ISTA], 2009). El efecto de la inoculación de las bacterias se comparó con semillas tratadas solo con agua destilada, para lo cual se realizaron recuentos diarios de semillas germinadas con radículas >1 mm. Los resultados se expresaron en porcentaje de germinación a los 12 días de cada cepa de *P.* fluorescente inoculada y se determinó el tiempo (h) en que germinó 50 % de las semillas (T_{50}) de acuerdo con la ecuación descrita por Salehzade, Shishvan, Ghiyasi, Forouzin, y Siyahjani (2009).

$$T_{50} = t_i + \frac{\left(\frac{N}{2} - n_i\right)(t_j - t_i)}{n_j - n_i}$$

Donde N es el número final de germinación, n_j y n_i son el número acumulado de semillas germinadas por conteo adyacente al momento en que $n_i < N/2 < n_j$, t_i el número de días que corresponden a n_i y t_j el número de días que corresponden a n_j .

Con los datos de germinación se realizó un análisis de varianza con ayuda del paquete *Statistical Analysis System* (SAS, 2002). Las diferencias entre las medias de los tratamientos se estimaron mediante la prueba de Dunnett para comparar cada tratamiento con el control (Narbona-Fernández, Ortiz-Ballesteros, & Arista-Palmero, 2003).

peat moss) sterilized at 121 °C for 1.5 h. The trays were kept in a greenhouse for 45 days. After this time, 10 seedlings were taken per replication (30 seedlings per treatment), and the roots were washed with running water and left at room temperature for 72 h; subsequently, they were placed in an oven at 42 °C for 1 h and then kept at 60 °C for 24 h. At the end, an ESA 120A analytical balance was used to obtain the dry biomass weight of root and stem with foliage. For the analysis of the results, the same statistical procedure applied to germination was used.

Metabolite production by antagonistic fluorescent *Pseudomonas*

The 20 antagonistic strains were characterized by their production of 3-indole acetic acid (IAA) using the modified colorimetric method described by Sarwar and Kremer (1995), for which bacterial mass was inoculated into the well of the microplate and incubated at 28 ± 2 °C for 72 h, after which Salkowski reagent was directly added. The pink color shift in the inoculated substrate determined the production of IAA (+), and a more intense color was considered to represent a greater production of IAA (++). On the other hand, the production of siderophores (SID) was determined using the universal CAS agar protocol described by Schwyn and Neilands (1987); the formation of a yellow halo at the inoculation site determined the production of SID (+) by the bacterial strain.

Amplification of the 16S rDNA gene, sequencing and identification of fluorescent *Pseudomonas*

A Bio-PCR (biological and enzymatic polymerase chain reaction) was performed for the amplification of the 16S rRNA gene with the universal primers for Eubacteria FD1 (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') and RD1 (5' AAGGAGGTGATCCAGCC 3') that amplify a fragment of approximately 1,500 to 1,600 bp (Rodrigues, Silva-Stenico, Gomes, Lopes, & Tsai, 2003). An aqueous bacterial suspension was prepared in 100 µL of water for PCR (Promega Nuclease-Free water). The reaction was performed in a final volume of 25 µL containing 1 µL of the primers, at a concentration of 10 µM, buffer for PCR (at a concentration of 1X), MgCl₂ at 1.5 mM, dNTP's at 200 µM, 2U of taq polymerase (Promega) and 2 µL of the bacterial suspension (DNA). The PCR conditions consisted of an initial denaturation cycle of 95 °C for 3 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 1 min, 55 °C for 30 s, 72 °C for 2 min and a final extension of 72 °C for 7 min. Additionally, a 1 Kb molecular marker (Promega) was used. The reactions were carried out in a Techne® Prime thermal cycler.

The PCR products were analyzed by electrophoresis in 1 % agarose gel at 95 V for 45 min in 1X TBE buffer. The gel was stained with ethidium bromide and visualized

Efecto de *Pseudomonas* fluorescentes en el vigor de plántula de jitomate

Se seleccionaron al azar 20 semillas germinadas por cada repetición del experimento anterior y se trasplantaron en charolas de plástico con peat moss (PRO-MOSS TBK turba de *Sphagnum* rubio de fibra larga selecta) esterilizado a 121 °C por 1.5 h. Las charolas se mantuvieron en invernadero durante 45 días. Pasado este tiempo, se tomaron 10 plántulas por repetición (30 plántulas por tratamiento), se lavaron las raíces con agua corriente y se dejaron a temperatura ambiente por 72 h; posteriormente, se colocaron en una estufa a 42 °C por 1 h y después se mantuvieron a 60 °C por 24 h. Al finalizar, con una balanza analítica ES 120A, se obtuvo el peso de biomasa seca de raíz y tallo junto con el follaje. Para el análisis de los resultados se utilizó el mismo procedimiento estadístico que el de germinación.

Producción de metabolitos por *Pseudomonas* fluorescentes antagonistas

Las 20 cepas antagonistas se caracterizaron por su producción de ácido-3-indol acético (AIA) mediante el método colorimétrico modificado descrito por Sarwar y Kremer (1995); para lo cual se inoculó masa bacteriana dentro del pozo de la microplaca y se incubó a 28 ± 2 °C por 72 h, posteriormente se agregó directamente el reactivo de Salkowski. El viraje a color rosa en el sustrato inoculado determinó la producción de AIA (+), y un color más intenso se consideró mayor producción de AIA (++). Por otro lado, la producción de sideróforos (SID) se determinó mediante el protocolo universal CAS agar descrito por Schwyn y Neilands (1987); la formación de un halo amarillo en el sitio de inoculación determinó la producción de SID (+) por la cepa bacteriana.

Amplificación del gen 16S rADN, secuenciación e identificación de *Pseudomonas* fluorescentes

Se realizó un Bio-PCR (reacción en cadena de la polimerasa biológica y enzimática) para la amplificación del gen 16S rRNA con los iniciadores universales para Eubacterias FD1 (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') y RD1 (5' AAGGAGGTGATCCAGCC 3') que amplifican un fragmento de aproximadamente 1,500 a 1,600 pb (Rodrigues, Silva-Stenico, Gomes, Lopes, & Tsai, 2003). Se preparó una suspensión bacteriana acuosa en 100 µL de agua para PCR (Promega Nuclease-Free water). La reacción se realizó en un volumen final de 25 µL que contenía 1 µL de los iniciadores, a una concentración de 10 µM, buffer para PCR (a una concentración de 1X), MgCl₂ a 1.5 mM, dNTP's a 200 µM, 2U de taq polimerasa (Promega) y 2 µL de la suspensión bacteriana (DNA). Las condiciones de la PCR consistieron en una desnaturalización inicial de un ciclo de 95 °C durante

in an imaging system (Infinity 5T-5). The PCR product was purified with the Wizard protocol (Tereba, 1999), and then sequenced, together with the FD1 primer, in the *Unidad de Biología Molecular* of the *Instituto de Fisiología Celular* of the *Universidad Nacional Autónoma de México* and compared with the GenBank database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

Results and discussion

In vitro antagonism of *Cmm* and *Xv* by fluorescent *Pseudomonas*

The *in vitro* antagonism results indicated that 20 of the 356 evaluated fluorescent *P.* strains produced an inhibition halo ≥ 5 mm; of these, 100 % showed antagonism against *Xv* and 45 % (nine strains) expressed antagonism towards *Cmm* (Table 1). The results also indicated that among the different fluorescent *P.* isolates there are strains that differ in the range of metabolites produced that directly affect the *in vitro* sensitivity for one or both phytopathogenic bacteria, which highlights the genetic and metabolic diversity that can be found among these bacterial populations (Gross & Loper, 2009; Loper et al., 2012). This diversity is mediated by the ability to synthesize compounds with biological activity for biocontrol, such as hydrocyanic acid with nematicidal activity (Siddiqui, Shahid, Hussain, & Khan, 2006), siderophores such as pseudobactin and ferrioxamine B (Saranraj, Sivasakthivelan, & Siva-Sakthi, 2013) and antibiotics such as phenazine-1-carboxylic acid, 2,4-diacetyl phloroglucinol, oomycin, pyrrolnitrin, kanosamine, pyoluteorin, zwittermycin-A and pantocin (Dilantha-Fernando, Nakkeeran, & Zhang, 2005). Therefore, the use of these microorganisms can be a relevant and safe alternative.

Effect of fluorescent *Pseudomonas* on tomato seed germination and seedling vigor

The results of the effect on germination of inoculating the tomato seeds with the fluorescent *P.* strains did not show a normal distribution; therefore, an angular transformation of the data was made, which consisted in obtaining the arcsine of the square root of the values obtained (McDonald, 2014), and subsequently an analysis of variance ($P \leq 0.05$) was performed. The results showed no significant ($P \leq 0.05$) statistical differences in the germination percentage of the seeds inoculated with the 20 fluorescent *P.* strains; however, 14 strains (75 %) increased the germination rate in a range of 31 to 38 h with respect to the control (Table 1), a benefit that has been demonstrated in other studies (Raj et al., 2004; Weller, 2007).

In relation to the expression of seedling vigor, 15 of the 20 evaluated strains (75 %) increased the root dry

3 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 55 °C por 30 s, 72 °C por 2 min y una extensión final de 72 °C por 7 min. Adicionalmente, se utilizó un marcador molecular 1 Kb (Promega). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador marca Techne® Prime Thermal Cycler.

Los productos de la PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % a 95 V por 45 min en buffer TBE 1X. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó en un fotodocumentador (Infinity 5T-5). El producto de la PCR se purificó con el protocolo de Wizard (Tereba, 1999), y después se secuenció, junto con el iniciador FD1, en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México y se compararon con la base de datos del GenBank del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) utilizando el *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

Resultados y discusión

Antagonismo *in vitro* de *Cmm* y *Xv* por *Pseudomonas* fluorescentes

Los resultados de antagonismo *in vitro* indicaron que de las 356 cepas de *P.* fluorescentes evaluadas 20 produjeron un halo de inhibición ≥ 5 mm; de estas, 100 % mostraron antagonismo contra *Xv* y 45 % (nueve cepas) expresaron antagonismo hacia *Cmm* (Cuadro 1). Los resultados también indicaron que entre los diferentes aislados de *P.* fluorescentes se encuentran cepas que difieren en el rango de metabolitos producidos que inciden directamente en la sensibilidad *in vitro* para una o ambas bacterias fitopatógenas, lo cual resalta la diversidad genética y metabólica que se puede encontrar entre estas poblaciones bacterianas (Gross & Loper, 2009; Loper et al., 2012). Dicha diversidad está mediada por la capacidad de sintetizar compuestos con actividad biológica para el biocontrol, como el ácido cianhídrico con actividad nematicida (Siddiqui, Shahid, Hussain, & Khan, 2006), sideróforos como la pseudobactina y la ferrioxamina B (Saranraj, Sivasakthivelan, & Siva-Sakthi, 2013) y antibióticos como la fenazina-1-carboxílico, 2,4-diacetil fluoroglucinol, oomicina, pirrolnitrina, kanosamina, pioluteorina, zwittermycina-A y la pantocina (Dilantha-Fernando, Nakkeeran, & Zhang, 2005). Por lo anterior, el uso de estos microorganismos puede ser una alternativa pertinente y segura.

Efecto de *Pseudomonas* fluorescentes en la germinación de semilla y vigor de plántula de jitomate

Los resultados del efecto en la germinación de la inoculación de las semillas de jitomate con las cepas de *P.* fluorescentes no presentaron una distribución normal; por lo que se hizo una transformación angular

Table 1. Seed germination data, T_{50} and vigor of seedlings from seeds inoculated with fluorescent *Pseudomonas* and their relationship with metabolite production.**Cuadro 1. Datos de germinación de semilla, T_{50} y vigor de plántulas a partir de semillas inoculadas con *Pseudomonas* fluorescentes y su relación con la producción de metabolitos.**

Strain/Cepa	In vitro antagonism / Antagonismo <i>in vitro</i>		Metabolite production / Producción de metabolitos		Seed / Semilla		Vigor
	<i>Cmm</i> ¹	Xv	SID	IAA/AIA	Germination (%) / Germinación (%)	T_{50} (h)	Root dry biomass (g) / Biomasa seca raíz (g)
Ccl		+	+	++	91.9	37***	0.12297
Ecl	+	+	+	++	91.9	37***	0.17073***
64JaF	+	+	+	+	91.9	38***	0.12500
66JaF		+	+	+	88.8	33***	0.13313***
71JaF		+	+	+	91.9	36***	0.15113***
79JaF	+	+	+	++	95.9	38***	0.12170
85JaF		+	+	-	88.8	36***	0.14960***
94JaF		+	+	+	87.8	39***	0.16757***
95JaF	+	+	+	+	88.8	46	0.13600***
103JaF	+	+	+	++	84.8	36***	0.14007***
104.HJaF		+	+	++	91.9	39***	0.12570
107JaF		+	+	-	80.8	35***	0.12497
114JaF		+	+	-	92.9	36***	0.13923***
122JaF		+	+	-	86.8	38***	0.13507***
123JaF	+	+	+	++	93.9	38***	0.15267***
134JaF		+	+	+	88.8	37***	0.13697***
138JaF	+	+	+	-	84.8	37***	0.15447***
165JaF	+	+	+	-	87.7	36***	0.14307***
177JaF	+	+	+	++	93.9	39***	0.13733***
14.1JiF		+	+	-	94.9	32***	0.14737***
Control					83.8	70	0.09603

¹*Cmm* = *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*; Xv = *Xanthomonas vesicatoria*; SID = siderophore production; IAA = 3-indole acetic acid production.

*** significance level $P \leq 0.05$.

¹*Cmm* = *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*; Xv = *Xanthomonas vesicatoria*; SID = producción de sideróforos; AIA = producción de ácido-3-indol acético.

*** nivel de significancia $P \leq 0.05$.

biomass in ranges from 138 to 177.7 % with respect to the control, and of these, four (26.6 %) showed a relationship with SID production and higher IAA production (++) (Table 1). In this regard, of the metabolic characterization of the 20 inoculated fluorescent *P.* strains, 100 % produced SID and 13 strains (65 %) IAA, of which 7 (35 %) had the highest production of this acid (Table 1).

Various fluorescent *P.* populations are considered among the most suitable bacteria to stimulate and promote plant growth, which is related to the production of phytohormones and SID (Saha, Saha, Donofrio, & Bestervelt, 2013). SID production is an important metabolic expression in colonization, competition for nutrients and biocontrol of pathogens (Ali-Saber, Abdelhafez, Hassan, & Ramadan, 2015). Likewise, IAA biosynthesis by fluorescent *P.* stands out

de los datos, la cual consistió en obtener el arcoseno de la raíz cuadrada de los valores obtenidos (McDonald, 2014), y posteriormente se realizó el análisis de varianza ($P \leq 0.05$). Los resultados no mostraron diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$) en el porcentaje de germinación de las semillas inoculadas con las 20 cepas de *P.* fluorescentes; sin embargo, 14 cepas (75 %) aumentaron la velocidad de germinación en un rango de 31 a 38 h con respecto al testigo (Cuadro 1), beneficio que se ha demostrado en otras investigaciones (Raj et al., 2004; Weller, 2007).

En relación con la expresión del vigor de las plántulas, de las 20 cepas evaluadas 15 (75 %) incrementaron la biomasa seca de raíz en rangos de 138 a 177.7 % respecto al testigo, y de éstas, cuatro (26.6 %) mostraron una relación con la producción de SID y mayor producción (++) de AIA (Cuadro 1). En este sentido,

as a root growth promoter by stimulating cell division and elongation, thereby increasing the capacity for nutrient acquisition; in addition, it induces the activity of ethylene and the enzyme ACC deaminase, which improves plant nutrition and its resistance to stress factors (Glick, 2014; Grobelak, Napora, & Kacprzak, 2015).

The increased dry biomass weight of the tomato seedling root shows the beneficial role of the fluorescent *P.* used, which could be constituted as a valid scheme to select potentially efficient bacteria as growth promoters. The results of this research coincide with other studies that have shown that the growth-promoting bacteria of plants base their ability on the production of IAA and SID (Ali-Saber et al., 2015; Magnucka & Pietr, 2015).

Identification of antagonists

With the amplification of the 16S rRNA gene from the 20 bacterial strains by means of primers FD1 and RD1, a fragment of approximately 1,500 bp was obtained. The sequencing and alignment of these strains in the NCBI identified 13 (65 %) as *Pseudomonas* sp., 5 (25 %) as *P. putida* and 2 (10 %) as *P. fluorescens* (Table 2).

In other studies, inoculating the tomato seed and root with fluorescent *P.* showed its efficiency in the promotion of plant growth and control of *Cmm* in the greenhouse (Amkraz, Boudyach, Boubaker, Bouizgarne, & Ben-Aoumar, 2010; Umesha, 2006), as well as other fungal pathogens in tomato (Pastor, Carlier, Andrés, Rosas, & Rovera, 2012; Srivastava, Khalid, Singh, & Sharma, 2010). In this work, 50 % of the strains identified as *P. fluorescens* and 60 % as *P. putida* inhibited the *in vitro* growth of *Cmm* and *Xv*; therefore, they can be considered as bacterial strains with high potential for biocontrol. Some researchers have highlighted the high efficiency of *P. putida* and *P. fluorescens* as growth promoters and biocontrol agents in the protection of the tomato crop. Byrne et al. (2005) and McSpadden-Gardener (2007) indicate that *P. putida* was effective under field conditions in reducing the severity of foliar infections caused by *Xv*, while Kavitha and Umesha (2007) mention that *P. fluorescens* inoculated in the tomato seed improved germination and significantly decreased the incidence of *Xv* under field conditions; in addition, Vanitah, Niranjana, Mortensen, and Umesha (2009) report its efficiency against other important bacterial pathogens in this crop.

The bacteria *P. putida* (strain 177Jaf) and *P. fluorescens* (strain Ecl), inoculated in tomato seeds, could be considered as having high potential for use as growth promoters and biocontrol agents in tomato cultivation, since both strains showed the highest significant increase in seed germination rate (T_{50}), root biomass

de la caracterización metabólica de las 20 cepas de *P. fluorescentes* inoculadas, 100 % produjeron SID y 13 cepas (65 %) AIA, de las cuales 7 (35 %) presentaron la mayor producción de este ácido (Cuadro 1).

Diversas poblaciones de *P. fluorescentes* se consideran dentro de las bacterias más aptas para estimular y promover el crecimiento de las plantas, lo cual está relacionado con la producción de fitohormonas y SID (Saha, Saha, Donofrio, & Bestervelt, 2013). La producción de SID es una expresión metabólica importante en la colonización, competencia por nutrientes y biocontrol de patógenos (Ali-Saber, Abdelhafez, Hassan, & Ramadan, 2015). Asimismo, la biosíntesis de AIA por *P. fluorescentes* destaca como promotor del crecimiento de las raíces estimulando la división y elongación celular, aumentando con ello la capacidad de adquisición de nutrientes; además, induce la actividad de etileno y de la enzima ACC desaminasa que mejora la nutrición vegetal y la resistencia de la planta a factores de estrés (Glick, 2014; Grobelak, Napora, & Kacprzak, 2015).

El incremento del peso de biomasa seca de la raíz de las plántulas de jitomate exhibe el rol benéfico de las *P. fluorescentes* utilizadas, lo que podría constituirse como un esquema válido para seleccionar bacterias potencialmente eficientes como promotoras del crecimiento. Los resultados de este estudio coinciden con otras investigaciones que han demostrado que las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas basan su habilidad en la producción de AIA y SID (Ali-Saber et al., 2015; Magnucka & Pietr, 2015).

Identificación de antagonistas

Con la amplificación del gen 16S rRNA, de las 20 cepas bacterianas, mediante los iniciadores FD1 y RD1 se obtuvo un fragmento de aproximadamente 1,500 pb. La secuenciación y alineación de estas cepas en el NCBI identificó a 13 (65 %) como *Pseudomonas* sp., 5 (25 %) como *P. putida* y 2 (10 %) como *P. fluorescens* (Cuadro 2).

En otros trabajos, la inoculación de la semilla y raíz de jitomate con *P. fluorescentes* demostró su eficiencia en la promoción del crecimiento de la planta y el control de *Cmm* en invernadero (Amkraz, Boudyach, Boubaker, Bouizgarne, & Ben-Aoumar, 2010; Umesha, 2006), así como otros patógenos fungosos en jitomate (Pastor, Carlier, Andrés, Rosas, & Rovera, 2012; Srivastava, Khalid, Singh, & Sharma, 2010). En este trabajo, el 50 % de las cepas identificadas como *P. fluorescens* y 60 % como *P. putida* inhibieron el crecimiento *in vitro* de *Cmm* y *Xv*; por lo tanto, pueden ser consideradas como cepas bacterianas con alto potencial para el biocontrol. Algunos investigadores han destacado la alta eficiencia de *P. putida* y

Table 2. Origin and identification of bacterial strains by sequencing the 16S rRNA gene.**Cuadro 2. Origen e identificación de las cepas bacterianas mediante secuenciación del gen 16S rRNA.**

Strain/ Cepa	Ecological origin/ Origen ecológico	Identification/ Identificación	NCBI access no. / Núm. acceso NCBI
Ccl	<i>C. gigantea</i> mycosphere / Micósfera <i>C. gigantea</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	KP050500.1
Ecl	<i>C. gigantea</i> mycosphere / Micósfera <i>C. gigantea</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DQ095904.1
64JaF	<i>H. sabdariffa</i> rhizosphere / Rizósfera <i>H. sabdariffa</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	GU990089.2
66JaF	<i>H. sabdariffa</i> rhizosphere / Rizósfera <i>H. sabdariffa</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	GU990089.2
71JaF	<i>H. sabdariffa</i> rhizosphere / Rizósfera <i>H. sabdariffa</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	GU990089.2
79JaF	<i>H. sabdariffa</i> rhizosphere / Rizósfera <i>H. sabdariffa</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	KF030906.1
85JaF	<i>H. sabdariffa</i> rhizosphere / Rizósfera <i>H. sabdariffa</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	GU990089.2
94JaF	<i>H. sabdariffa</i> rhizosphere / Rizósfera <i>H. sabdariffa</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	GU990089.2
95JaF	<i>H. sabdariffa</i> rhizosphere / Rizósfera <i>H. sabdariffa</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	KF030909.1
103JaF	<i>H. sabdariffa</i> rhizosphere / Rizósfera <i>H. sabdariffa</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	AM745260.1
104.HJaF	<i>H. sabdariffa</i> rhizosphere / Rizósfera <i>H. sabdariffa</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	KF030906.1
107JaF	<i>H. sabdariffa</i> rhizosphere / Rizósfera <i>H. sabdariffa</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	AB269776.1
114JaF	<i>H. sabdariffa</i> rhizosphere / Rizósfera <i>H. sabdariffa</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	KJ534476.1
122JaF	<i>H. sabdariffa</i> rhizosphere / Rizósfera <i>H. sabdariffa</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	GU990089.2
123JaF	<i>H. sabdariffa</i> rhizosphere / Rizósfera <i>H. sabdariffa</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	GU990089.2
134JaF	<i>H. sabdariffa</i> rhizosphere / Rizósfera <i>H. sabdariffa</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	GU990089.2
138JaF	<i>H. sabdariffa</i> rhizosphere / Rizósfera <i>H. sabdariffa</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	GU990089.2
165JaF	<i>H. sabdariffa</i> rhizosphere / Rizósfera <i>H. sabdariffa</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	GU990089.2
177JaF	<i>H. sabdariffa</i> rhizosphere / Rizósfera <i>H. sabdariffa</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	KF030909.1
14.1JiF	<i>S. lycopersicum</i> rhizosphere / Rizósfera <i>S. lycopersicum</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	AM745260.1

(root dry weight) and degree of *in vitro* antagonism against *Cmm* and *Xv* (Tables 1 and 2).

Conclusions

Among the studied strains of fluorescent *Pseudomonas* of different ecological origin, some showed a high degree of antagonism *in vitro* against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and *Xanthomonas vesicatoria*. It is important to emphasize that Gram-negative bacteria are more sensitive to the metabolites involved in antagonism than Gram-positive bacteria.

Inoculating tomato seeds with the selected microorganisms increases the germination rate and vigor. Additionally, the strains of *Pseudomonas putida* (177Jaf) and *Pseudomonas fluorescens* (Ecl) inhibit both bacterial pathogens and act efficiently as growth promoters in the tomato seed, so this type of microorganism can be used to increase agricultural productivity.

P. fluorescens como promotoras de crecimiento y agentes de biocontrol en la protección del cultivo de jitomate. Byrne et al. (2005) y McSpadden-Gardener (2007) indican que *P. putida* fue efectiva en condiciones de campo para reducir la severidad de infecciones foliares causados por *Xv*; mientras que Kavitha y Umesha (2007) mencionan que *P. fluorescens* inoculada en la semilla de jitomate mejoró la germinación y disminuyó significativamente la incidencia de *Xv* en condiciones de campo, además, Vanitah, Niranjana, Mortensen, y Umesha (2009) reportan su eficiencia contra otros patógenos bacterianos importantes en este cultivo.

Las bacterias *P. putida* (cepa 177Jaf) y *P. fluorescens* (cepa Ecl), inoculadas en semillas de jitomate, podrían considerarse con alto potencial para su uso como promotores de crecimiento y agentes de biocontrol en el cultivo de jitomate, ya que ambas cepas mostraron el incremento significativo más alto en la velocidad de germinación de la semilla (T_{50}), biomasa de la raíz (peso

Acknowledgments

The author thanks the National Science and Technology Council (CONACyT) for the support given to the master's degree scholarship.

End of English version

References / Referencias

- Ahmadzadeh, M., & Therani, A. S. (2009). Evaluation of fluorescent pseudomonads for plant growth promotion, antifungal activity against *Rhizoctonia solani* on common bean, and biocontrol potential. *Biological Control*, 48(2), 101-107. doi: 10.1016/j.biocontrol.2008.10.012
- Ali-Saber, F. M., Abdelhafez, A. A., Hassan, E. A., & Ramadan, E. M. (2015). Characterization of fluorescent pseudomonads isolates and their efficiency on the growth promotion of tomato plant. *Annals of Agricultural Sciences*, 60(1), 131-140. doi: 10.1016/j.aoas.2015.04.007
- Amkraz, N., Boudyach, E. H., Boubaker, H., Bouizgarne, B., & Ben-Aoumar, A. A. (2010). Screening for fluorescent pseudomonas, isolated from the rhizosphere of tomato, for antagonistic activity toward *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 26(6), 1059-1065. doi: 10.1007/s11274-009-0270-5
- Artola, A., Carrillo-Castañeda, G., & García-de los Santos, G. (2003). Hydropriming: A strategy to increase *Lotus corniculatus* L. seed vigor. *Seed Science and Technology*, 31(2), 455-463. doi: 10.15258/sst.2003.31.2.22
- Byrne, J. M., Dianese, A. C., Ji, P., Campbell, H. L., Cuppels, D. A., Louws, F. J., Miller, S. A., Jones, J. B., & Wilson, M. (2005). Biological control of bacterial spot of tomato under field conditions at several locations in North America. *Biological Control*, 32(3), 408-418. doi: 10.1016/j.biocontrol.2004.12.001
- Dilantha-Fernando, W. G., Nakkeeran, S., & Zhang, Y. (2005). Biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relation in biocontrol of plant diseases. In: Siddiqui, Z. A. (Ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization* (pp. 67-109). Dordrecht: Springer. doi: 10.1007/1-4020-4152-7_3
- EFSA Panel on Plant Health (PLH). (2014). Scientific opinion on the pest categorization of *Clavibacter michiganensis* susp. *michiganensis* (Smith) Davis et al. *EFSA Journal*, 12(6), 1-30. doi: 10.2903/j.efsa.2014.3910
- Gartemann, K. H., Kirchner, O., Engemann, J., Gräfen, I., Eichenlaub, R., & Burger, A. (2003). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: First steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology*, 106(2), 179-191. doi: 10.1016/j.jbiotec.2003.07.011

seco de la raíz) y grado de antagonismo *in vitro* contra *Cmm* y *Xv* (Cuadros 1 y 2).

Conclusiones

Dentro de las cepas estudiadas de *Pseudomonas* fluorescentes de diferente origen ecológico, algunas mostraron alto grado de antagonismo *in vitro* contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y *Xanthomonas vesicatoria*. Es importante recalcar que las bacterias Gram negativas son más sensibles a los metabolitos involucrados en el antagonismo que las Gram positivas.

La inoculación de semillas de jitomate con los microorganismos seleccionados incrementa la velocidad de germinación y el vigor. Adicionalmente, las cepas de *Pseudomonas putida* (177Jaf) y *Pseudomonas fluorescens* (Ecl) inhiben a ambos patógenos bacterianos y actúan eficientemente como promotores de crecimiento en la semilla de jitomate, por lo que este tipo de microorganismos son utilizados para incrementar la productividad agrícola.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado correspondiente a la beca de maestría.

Fin de la versión en español

- Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169(1), 30-9. doi: 10.1016/j.micres.2013.09.009
- Grobelak, A., Napora, A., & Kacprzak, M. (2015). Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. *Ecological Engineering*, 84, 22-28. doi: 10.1016/j.ecoleng.2015.07.019
- Gross, H., & Loper, E. J. (2009). Genomic of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Natural Product Reports*, 26(11), 1408-1446. doi: 10.1039/b817075b
- Höfte, M., & Altier, N. (2010). Fluorescent pseudomonads as biocontrol agents for sustainable agricultural systems. *Research in Microbiology*, 161(6), 464-471. doi: 10.1016/j.resmic.2010.04.007
- International Seed Testing Association (ISTA). (2009). *Seed health testing methods*. Pretoria: Author. Retrieved from https://www.seedtest.org/en/testing-methods_content---1-1132.html
- Jones, J. B., Jones, J. P., Stall, R. E., & Zitter, T. A. (1991). *Compendium of tomato diseases*. St Paul: APS Press.

- Jones, J. B., Lacy, G. H., Bouzar, H., Stall, R. E., & Schaad, N. W. (2004). Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(6), 755-762. doi: 10.1078/0723202042369884
- Kavitha, R., & Umesha, S. (2007). Prevalence of bacterial spot of tomato fields of Karnataka and effect of biological seed treatment on disease incidence. *Crop Protection*, 26(7), 991-997. doi: 10.1016/j.cropro.2006.09.007
- King, E. O., Ward, M. K., & Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44(2), 301-307.
- Kloepper, J. W., Lifshitz, R., & Schroth, M. N. (1988). *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. *ISI Atlas of Science, Animal and Plant Science* (pp. 60-64). Philadelphia: Institute for Scientific Information.
- Loper, J. E., Hassan, K. A., Mavrodi, D. V., Davis, E. W., Lim, C. K., Shaffer, B. T., ..., Paulsen, I. T. (2012). Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: Insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. *PLoS Genetics*, 8(7), 1-27. doi: 10.1371/journal.pgen.1002784
- Magnucka, E. G., & Pietr, J. S. (2015). Various effects of fluorescent bacteria of the genus *Pseudomonas* containing ACC deaminase on wheat seedling growth. *Microbiological Research*, 181, 112-119. doi: 10.1016/j.micres.2015.04.005
- McDonald, J. H. (2014). *Handbook of biological statistics*. Baltimore, Maryland: Sparky House Publishing.
- McSpadden-Gardener, B. B. (2007). Diversity and ecology of biocontrol *Pseudomonas* spp. in agricultural systems. *Phytopathology*, 97(2), 221-226. doi: 10.1094 / PHYTO-97-2-0221
- Meléndez-Monroy, M., Aranda-Ocampo, S., Carrillo-Castañeda, G., Hernández-Morales, J., & Soto-Rojas, L. (2016). Rizobacterias nativas en jamaica antagonistas a *Phytophthora parasitica* Dastur: aislamiento y caracterización. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 39(2), 151-158.
- Mercado-Blanco, J., Alós, E., Rey, M. D., & Prieto, P. (2016). *Pseudomonas fluorescens* PICF7 displays an endophytic lifestyle in cultivated cereals and enhances yield in barley. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(8), 1-13. doi: 10.1093/femsec/fiw092
- Narbona-Fernández, F. E., Ortiz-Ballesteros, P. L., & Arista-Palmero, M. (2003). Germinación de las semillas del madroño (*Arbutus unedo* L., Ericaceae). *Acta Botánica Malacitana*, 28, 73-78. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/28318150>
- Pastor, N., Carlier, E., Andrés, J., Rosas, S. B., & Rovera, M. (2012). Characterization of rhizosphere bacteria for control of phytopathogenic fungi of tomato. *Journal of Environmental Management*, 95, 332-337. doi: 10.1016/j.jenvman.2011.03.037
- Raaijmakers, J. M., Paulitz, T. C., Steinberg, C., Alabouvette, C., & Moëne-Loccoz, Y. (2009). The rhizosphere: A playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil*, 321(1-2), 341-361. doi: 10.1007/s11104-008-9568-6
- Raj, N. S., Shetty, N. P., & Shetty, H. S. (2004). Seed bio-priming with *Pseudomonas fluorescens* isolates enhances growth of pearl millet plants and induces resistance against downy mildew. *International Journal of Pest Management*, 50(1), 41-48. doi: 10.1080/09670870310001626365
- Rao, M. S. L., Kulkarni, S., Lingaraju, S., & Nadaf, H. L. (2009). Bio-priming of seeds: A potential tool in the integrated management of alternaria blight of sunflower. *Helia*, 32(50), 107-114. doi: 10.2298/hel0950107r
- Rodrigues, J. L. M., Silva-Stenico, M. E., Gomes, J. E., Lopes, J. R. S., & Tsai, S. M. (2003). Detection and diversity assessment of *Xylella fastidiosa* in field-collected plant and insect samples by using 16S rRNA and *gyrB* sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 4249-4255. doi: 10.1128/AEM.69.7.4249-4255.2003
- Saha, R., Saha, N., Donofrio, R. S., & Bestervelt, L. L. (2013). Microbial siderophores: A mini review. *Journal of Basic Microbiology*, 53(4), 303-317. doi: 10.1002/jobm.201100552
- Salehzade, H., Shishvan, M. I., Ghiyasi, M., Forouzin, F., & Siyahjani, A. A. (2009). Effect of seed priming on germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Research Journal of Biological Sciences*, 4(5), 629-631. Retrieved from <http://docsdrive.com/pdfs/medwelljournals/rjbsci/2009/629-631.pdf>
- Saranraj, P., Sivasakthivelan, P., & Siva-Sakthi, S. (2013). Prevalence and production of plant growth promoting substance by *Pseudomonas fluorescens* isolates from paddy rhizosphere soil of Cuddalore District, Tamil Nadu, India. *African Journal of Basic & Applied Sciences*, 5(2), 95-101. doi: 10.5829/idosi.ajbas.2013.5.2.2934
- Sarwar, M., & Kremer, R. J. (1995). Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. *Letters in Applied Microbiology*, 20(5), 282-285. doi: 10.1111/j.1472-765X.1995.tb00446.x
- Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1), 47-56. doi: 10.1016/0003-2697(87)90612-9
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2017). *Avance de siembras y cosechas. Resumen nacional por cultivo: jitomate*. Retrieved from http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do
- Siddiqui, I. A., Shahid, S. S., Hussain, S. I., & Khan, A. (2006). Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the suppression of root-knot nematode, *Meloidogume javanica* in tomato. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22(6), 641-650. doi: 10.1007/s11274-005-9084-2
- Srivastava, R., Khalid, S., Singh, U. S., & Sharma, A. K. (2010). Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungus, fluorescent *Pseudomonas* and *Trichoderma harzianum*

- formulation against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* for the management of tomato wilt. *Biological Control*, 53(1), 24-31. doi: 10.1016/j.biocontrol.2009.11.012
- Statistical Analysis System Institute (SAS). (2002). *SAS/STAT User's Guide, software version 9.0*. Cary, N.C.: SAS Institute Inc.
- Tereba, A. (1999). Tools for analysis of population statistics. *Profile in DNA*, 3, 14-16.
- Umesha, S. (2006). Occurrence of bacterial canker in tomato fields of Karnataka and effect of biological seed treatment on disease incidence. *Crop Protection*, 25(4), 375-381. doi: 10.1016/j.cropro.2005.06.005
- Vanitah, S. C., Niranjana, S. R., Mortensen, C. N., & Umesha, S. (2009). Bacterial wilt of tomato in Karnataka and its management by *Pseudomonas fluorescens*. *BioControl*, 54(5), 685-695. doi: 10.1007/s10526-009-9217-x
- Weller, D. M. (2007). *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: Looking back over 30 years. *Phytopathology*, 97(2), 250-256. doi: 10.1094/PHYTO-97-2-0250