

UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA

**EVALUACIÓN *In vitro* DE BACTERIAS FORMADORAS DE ENDOSPORA COMO
POTENCIALES CONTROLADORES BIOLÓGICOS DE *Ralstonia solanacearum* EN
INTERACCION CON PLANTAS DE TOMATE**

POR:

JUAN JOSÉ ORTIZ GRANILLO

TESIS



CATACAMAS

OLANCHO

ABRIL, 2024

EVALUACIÓN *In vitro* DE BACTERIAS FORMADORAS DE ENDOSPORA COMO
POTENCIALES CONTROLADORES BIOLÓGICOS DE *Ralstonia solanacearum* EN
INTERACCION CON PLANTAS DE TOMATE

POR:

JUAN JOSÉ ORTIZ GRANILLO

ROY DONALD MENJIVAR BARAHONA, *Ph. D.*

Asesor Principal

INÉS EUGENIA GARCÍA DE SALAMONE, *Ph, D.*

Asesor Externo Universidad de Buenos Aires

TESIS

PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA COMO
REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO

CATACAMAS

OLANCHO

ABRIL, 2024

UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA
Catacamas, Olancho

ACTA DE SUSTENTACIÓN

Los suscritos miembros del Comité Evaluador del Informe Final de la Práctica Profesional supervisada certificamos que:

El estudiante **JUAN JOSE ORTIZ GRANILLO** del IV Año de Ingeniería Agronómica presentó su informe intitulado:

**“EVALUACIÓN *In vitro* DE BACTERIAS FORMADORAS DE ENDOSPORA
COMO POTENCIALES CONTROLADORES BIOLÓGICOS DE
Ralstonia solanacearum EN INTERACCION CON PLANTAS DE TOMATE”**

El cual, a criterio de los evaluadores, el presente trabajo de investigación como requisito previo para optar al título de Ingeniero Agrónomo.

Dado en la ciudad de Catacamas, Departamento de Olancho, a los diez días del mes de noviembre del año

Ph. D. ROY DONALD MENJIVAR

Asesor Principal

M.Sc. PORFIRIO HERNANDEZ

Asesor Auxiliar

M.Sc. FAVIAN ANTONIO SALGADO

Asesor Auxiliar

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres **JOSÉ SANTOS ORTIZ CASTILLO** y **ELSA GRACIELA GRANILLO CRUZ**, quienes, con su amor y dedicación, me han enseñado el valor de la educación y la importancia de los principios. Gracias a su apoyo incondicional sin importar nuestras diferencias de opiniones. A ustedes les dedico este logro.

A mis hermanas **LAURA JAQUELINNE** y **DIANA MONSERRAHT** que son el espejo donde me veo y la inspiración que me impulsa a ser mejor cada día. Su fortaleza y determinación son un constante recordatorio de lo que podemos lograr cuando perseguimos nuestros sueños.

A **CINTHIA CÁRDENAS**, que es demasiado paciente, amable y maravillosa para expresarlo en palabras. Pero lo intento de todas formas. Cuyo amor por las ciencias biológicas ha encendido en mí una llama similar. Su apoyo y compañía han sido un regalo invaluable en esta travesía tan compleja que es la vida.

Y a los familiares que desde hace mucho me toco despedirme de ellos, en especial de **ROSA VALLADARES**, mi abuelita a quien nunca le pude regalar la vaquita que de niño le prometí.

Esta tesis es el resultado de un viaje lleno de desafíos y aprendizajes, pero también de amor y apoyo. A todos ustedes, que han sido parte de este camino, les dedico este logro. Gracias por creer en mí cuando yo nunca lo hice.

AGRADECIMIENTO

Primero que nada, quiero expresar mi más profundo agradecimiento al **Ph, D. ROY MENJIVAR**, mi asesor principal. Su confianza en mi capacidad para llevar a cabo esta investigación ha sido un pilar fundamental en mi camino. Su orientación y apoyo constante han sido invaluable.

A la **Ph, D. INÉS GARCÍA**, le debo una deuda de gratitud por su amabilidad y apoyo durante mi tiempo en Argentina. Su calidez y generosidad han hecho que mi experiencia sea inolvidable y enriquecedora.

No puedo dejar de mencionar al **M.SC. ADÁN RAMÍREZ**, quien no solo se convirtió en mi mentor en el ámbito científico, sino también en un amigo. Su dirección y consejos han sido cruciales en cada etapa de este trabajo. Su pasión por la ciencia y su dedicación a la excelencia son una inspiración para mejorar como persona y como profesional.

A mis amigos **JOSE PERALTA, JOSE PADILLA, JOSE MONCADA, PABLO ORELLANA, BALLARDO RODRIGUEZ, NATAN GONZALES, MARIO REYES, DIANA URQUIA ISAAC MOYA**, compañeros de mil batallas, cómplices de risas o lágrimas, noches de desvelo estudiando, jugando o platicando. Gracias por escuchar cuando hablaba imparable sobre algunos temas. Cada vivencia compartida ha dejado una huella imborrable en mí. Este triunfo también es suyo.

Gracias a todos ustedes por ser parte de este viaje.

CONTENIDO

	pág.
ACTA DE SUSTENTACIÓN.....	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
CONTENIDO.....	iv
LISTA DE TABLAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE ANEXOS	viii
RESUMEN	ix
I. INTRODUCCIÓN	10
II. OBJETIVOS	11
2.1 General:.....	11
2.2 Específicos:	11
III. REVISIÓN DE LITERATURA	12
3.1 <i>R. solanacearum</i>	12
3.2 Importancia económica.....	12
3.3 Taxonomía y clasificación	12
3.4 Sintomatología	14
3.5 Protocolo de identificación del patógeno.....	14
3.6 Manejo	18
3.7 Control Biológico.....	19
3.8 Bacterias en la rizosfera	19
3.8.1 Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (PGPR, por sus siglas en ingles)	20
3.8.2 Antecedentes de biocontrol a partir de PGPR	20
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
4.1 Sitio de la investigación	21

4.2	Materiales y equipo.....	21
4.3	Selección de aislados	21
4.4	Producción de colonias y cultivos de los aislados y del patógeno.....	22
4.5	Establecimiento de ensayos de interacción aislado-planta-patógeno	22
4.6	Tratamientos	23
4.7	Variables de respuesta.....	23
4.8	Diseño experimental y análisis estadístico	24
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
5.1	Incidencia.....	25
5.2	Días a emisión del primer par de hojas verdaderas (DEPPHV)	26
5.3	Número de raíces laterales	27
VI.	CONCLUSIONES	28
VII.	RECOMENDACIONES	29
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	30
	ANEXOS.....	35

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Estado taxonómico de <i>R. solanacearum</i>	14
Tabla 2. Características bioquímicas diferenciales de <i>R. solanacearum</i> y otras bacterias pertenecientes a <i>Aciovorax</i> , <i>Burkholderia</i> y <i>Pseudomonas</i>	15
Tabla 3. Pruebas de determinación de biovar en <i>R. solanacearum</i>	16
Tabla 4. Pruebas para diferenciación de sub-fenotipos de biovar 2 de <i>R. solanacearum</i> ...	16
Tabla 5. Determinación de razas en <i>R. solanacearum</i>	16

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Línea de tiempo de los cambios que ha tenido la clasificación de <i>R. solanacearum</i> hasta la actualidad.	13
Figura 2. Procedimientos para la detección e identificación de <i>R. solanacearum</i>	18
Figura 3. Esquema experimental de la cantidad de tubos totales (99 totales).	23
Figura 4. Incidencia de la enfermedad debido a la inoculación con los distintos aislamientos obtenidos de plantas de tomate..	25
Figura 5. Días a emisión del primer par de hojas verdaderas (DEPPHV) debido a la inoculación con de los distintos aislamientos obtenidos de plantas de tomate.	27
Figura 6. Numero de raíces secundarias en cada uno de los tratamientos.	28

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo 1. Composición de materiales utilizados:	35
Anexo 2. Análisis estadístico para Incidencia.....	35
Anexo 3. Análisis estadístico para días de emisión primer par de hojas verdaderas	36
Anexo 4. Análisis estadístico de numero de raíces laterales.	36
Anexo 5. Siembra de bacterias en placas Petri.....	37
Anexo 6. Necrosis en puntos de crecimiento en la raíz de la planta.	37
Anexo 7. Muestra de raíz sana y conteo de raíces laterales.	38
Anexo 8. Elongación del primer par de hojas verdaderas.....	38
Anexo 9. Comparación de una raíz con signos de <i>R. solanacearum</i> y una raíz sana.	39

RESUMEN

El cultivo de tomate es una de las hortalizas de mayor importancia, cubrir la demanda del mismo se ve limitado por diferentes problemas fitosanitarios y entre ellos esta el marchitamiento bacteriano por *Ralstonia solanacearum*. Con el objetivo de encontrar un manejo eficaz y amigable con el ambiente se evaluaron 15 aislamientos bacterianos formadores de endospora, en condiciones *in vitro*. Estableciendo las interacciones en tubos de ensayo de 30x300 mm, con 50 mL de solución nutritiva agarizada. Después de la esterilización se le agrego un mL de la dilución 10^{-3} de cada aislamiento, una vez solidificado se realizó la siembra de una semilla por cada tubo, ya emergidas las plantas se realizó la inoculación de un mL e igual dilución del patógeno. Los tratamientos fueron: aislado-planta-patógeno (15), testigo caldo de cultivo-planta (1), testigo planta-patógeno (1) y testigo absoluto (1). El análisis de datos se hizo con el software Infostat y R estudio. Los resultados mostraron que cuatro aislamientos (Ar-RJG_I, Ar-RJG_{VIII}, Ar-RJG_X y Ar-RJG_{XV}) tuvieron la mayor eficacia en la inhibición del patógeno con un 0% para la variable incidencia. En la variable número de raíces laterales los aislamientos Ar-RJG_I, Ar-RJG_{VIII} y Ar-RJG_X, se destacaron con 12, 11 y 10 raíces laterales, respectivamente, y para días a emisión del primer par de hojas se destacaron Ar-RJG_{XV}, Ar-RJG_{XII} y Ar-RJG_{VIII}, con 28, 30 y 31 días después de la inoculación, respectivamente, diferenciándose estadísticamente de los testigos. Además, cabe mencionar que estos aislados también mostraron característica de biocontrol y crecimiento en presencia del patógeno.

Palabras clave: Control biológico, PGPR, aislamiento bacteriano, inoculación.

I. INTRODUCCIÓN

R. solanacearum es una bacteria fitopatógena que es un conjunto de razas o cepas, las cuales comparten características genéticas, morfológicas y bioquímicas como para considerarse de la misma especie, tenemos la raza 1, raza 2 y raza 3 ampliamente diseminada encontrándose desde las tierras altas del trópico, regiones sub-tropicales y en climas fríos-templados de Europa afectando principalmente a la papa y tomate (Hayward 1991).

Este patógeno de gran impacto en diversas especies vegetales, se ha propagado rápidamente, causando importantes pérdidas económicas en la agricultura. Estas pérdidas varían según factores como la planta hospedante, variedad, clima, suelo, rotaciones de cultivos y cepa del patógeno (Yuliar *et al* 2015). Elphinstone (2005) indica que las pérdidas pueden ser insignificante o catastróficas, llegando hasta del 91% en tomate. Wang *et al.* (2023) reportan pérdidas superiores al 50% y hasta 80% en tomate y papa.

En la actualidad es complejo el manejo de este patógeno, no hay productos químicos que frenen o eviten su desarrollo, teniendo productos que matan a la bacteria en suelo, sin embargo, son altamente tóxicos para las plantas, dejando como manejo distintas estrategias que deben emplearse en conjunto unas con otras ya que por sí solas no representarían una forma viable para brindar un control eficaz y sustentable de la enfermedad (Melgar 2012).

Ante la problemática del uso de agroquímicos contra este microorganismo, se propone el manejo biológico como una herramienta valiosa para proteger cultivos y el medio ambiente. Usando aislados bacterianos se han obtenido resultados de antagonismo contra este patógeno (Abo 2021), esta una alternativa eficaz y de menor costo para cultivos expuestos a patógenos como *R. solanacearum*. Esta investigación se centra en evaluar la eficacia de aislados bacterianos *in vitro*, con el objetivo de seleccionar aquellos que inhiban la incidencia de esta fitobacteria mediante la interacción aislado-planta-patógeno.

II. OBJETIVOS

2.1 General:

Evaluar la capacidad de 15 aislados bacterianos formadores de endospora para inhibir la incidencia de *R. pseudosolanacearum* en condiciones *in vitro*.

2.2 Específicos:

- Determinar el porcentaje de incidencia de *R. pseudosolanacearum* para los aislamientos bacterianos.
- Establecer el porcentaje de incidencia de *R. pseudosolanacearum* con y sin inoculación de los aislados.
- Seleccionar los aislados con el menor porcentaje de incidencia de la enfermedad.
- Analizar la capacidad de los aislados de inducir promoción de crecimiento vegetal.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 *R. solanacearum*

Es una bacteria fitopatógena, Gramnegativa, siendo el agente causal del marchitamiento bacteriano (Hayward 1964), ampliamente distribuida desde ambientes tropicales hasta templados, teniendo un amplio abanico de hospedantes incluyendo varios cientos de especies que representan 44 familias; la familia *Solanaceae* siendo afectada en cultivos de alta importancia como la papa, tomate, berenjena y tabaco (Hayward 1991).

3.2 Importancia económica

Las pérdidas varían en función del hospedante, cultivar, clima, suelo y prácticas de manejo sanitario, según el IPDN (2014) en India se han presentado un estudio de las pérdidas por esta fitobacteria en el cultivo de tomate observándose pérdidas equivalentes al 91% de las plantas y en Uganda una encuesta dio a conocer que el 88% de las granjas estaban siendo afectadas por la marchitez bacteriana. Se estima que alrededor de tres millones de familias estarían siendo afectadas lo que representa aproximadamente 1.5 millones de Ha⁻¹ en unos 80 países, contabilizando unos daños totales anuales de unos \$950 millones.

3.3 Taxonomía y clasificación

La taxonomía y nomenclatura del "patógeno de la marchitez bacteriana" ha cambiado frecuentemente con la evolución de las nuevas tecnologías. Denominado en un principio *Bacillus solanacearum* por Smith (1896), el patógeno fue reclasificado en múltiples ocasiones antes de ser transferido al género actual, *Ralstonia* (Yabuuchi *et al.* 1995). El descubrimiento de nuevas cepas procedentes de distintos hábitats geográficos ha impulsado

una nueva reclasificación basada en análisis genómicos. Los principales acontecimientos en la historia taxonómica de este organismo en los últimos 124 años se muestran en la línea de tiempo (Figura 1) La organización del genoma, los efectores relacionados con la patogenicidad, las vías de virulencia y las relaciones filogenéticas basadas en el genoma han aumentado nuestra comprensión de este patógeno heterogéneo. (Sujan *et al.* 2020)

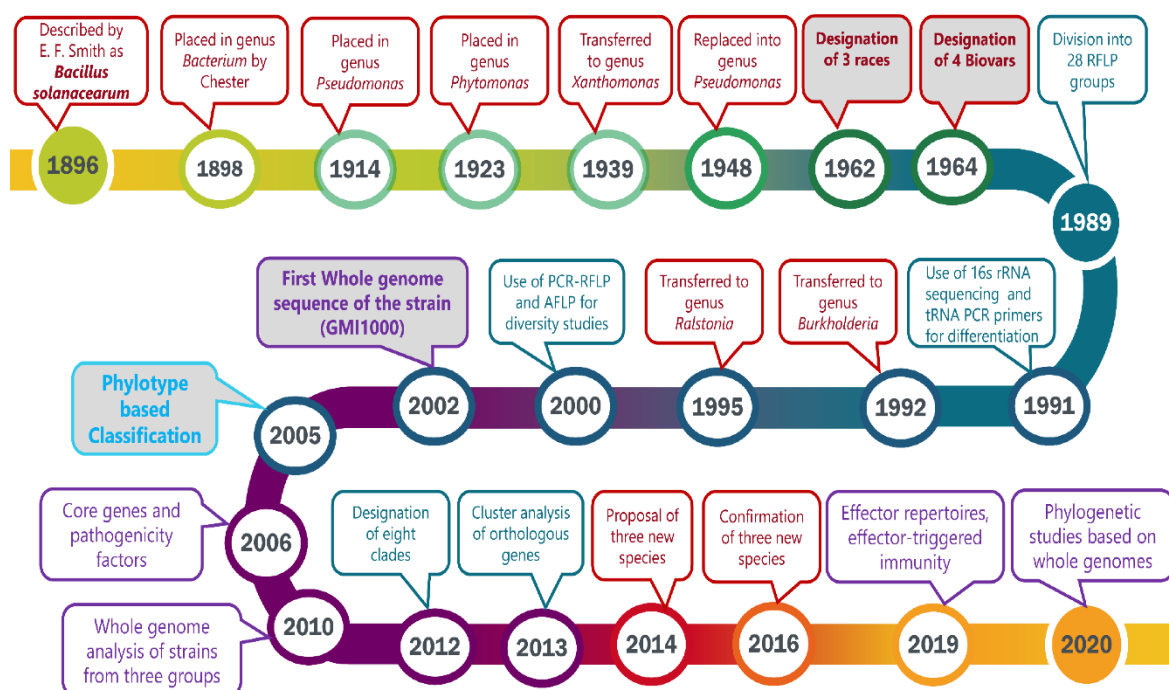


Figura 1. Línea de tiempo de los cambios que ha tenido la clasificación de *R. solanacearum* hasta la actualidad. Fuente: Sujan *et al.* (2020)

A partir de ciertos análisis las cepas del filotipo II se agruparon en la especie *R. solanacearum*, los filotipos I y III *R. pseudosolanacearum* y las cepas del filotipo IV *R. syzygii*. (Sujan *et al.* 2020)

El estado taxonómico actual de *R. solanacearum* se muestra en la Tabla 1, basada en la herramienta Taxonomy Browser de la página web del Centro Nacional de Información Biotecnológica.

Tabla 1. Estado taxonómico de *R. solanacearum*.

Rango	Nombre
Dominio	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	β -Proteobacteria
Orden	Burkholderiales
Familia	Burkholderiaceae
Genero	<i>Ralstonia</i>
Especies	<i>R. deutusiculanense</i> , <i>R. isidiosa</i> , <i>R. manitolilytica</i> , <i>R. pickettii</i> , <i>R. pseudosolanacearum</i> , <i>R. solanacearum</i> , <i>R. syzygii</i> .

Fuente: National Library of Medicine (NCBI) (2020).

3.4 Sintomatología

En plantas jóvenes: comienza en la parte superior y progresan hacia abajo; puede causar falta de flores, retraso en el crecimiento y baja productividad, o puede hacer que el tallo principal se marchite y colapse por completo, causando la muerte antes o poco después del trasplante. En plantas maduras: se observa marchitamiento en las hojas más jóvenes cerca de la parte superior, hay aparición de canchales marrones a lo largo del tallo y un deceso en el crecimiento normal de la planta, poco después, toda la planta se marchita repentinamente y muere. (Rich 2023)

3.5 Protocolo de identificación del patógeno

Para la identificación de que el patógeno que estamos aislando sea correcto debe pasar por un protocolo el cual está dividido por distintas fases y pruebas, las cuales nos ayudan a discernir del patógeno en cuestión. La Organización Europea y Mediterránea de Protección Fitosanitaria (EPPO por sus siglas en inglés), deja a disposición los procedimientos necesarios para llevarlo a cabo y de igual forma los parámetros que se ponen a comparación y que sirven de referencia para guiarse e interpretar los datos obtenidos por cada una de las

pruebas hechas para la identificación del patógeno. Los datos comparativos y esperados del patógeno de interés (*R. solanacearum*) en perspectiva con otras bacterias se muestra en la Tabla 2, la Tabla 3 y 4 para biovares y la Tabla 5 para razas.

Tabla 2. Características bioquímicas diferenciales de *R. solanacearum* y otras bacterias pertenecientes a *Aciovorax*, *Burkholderia* y *Pseudomonas*.

Prueba	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Burkholderia Cepacia</i>	<i>Burkholderia gladioli</i>	<i>Burkholderia caryophylli</i>	<i>Pseudomonas corrugata</i>	<i>Acidovorax avenae</i>
Pigmento difuso	+	+	+	+	-	-
Oxidasa	-	+	V	+	+	+
Arginina dihidrolasa	-	-	-	+	-	-
Reducción de nitratos	-	-	-	+	+	+
Crecimiento a 41°C	-	V	V	+	-	+
Oxidación de:						
Galactosa	+V	+	+	-		
Glicerol	+W	-	-	+W		
Manosa	+V	-	+	-		
Utilización de:						
Celobiosa	V	+	+	V	-	
Trehalosa	V	V	+	+		
D-Arabinosa	-	+	+	+	-	-
D-Tartato	-V	-W	+	-	V	
Manitol	V	+	+	+		+
Sorbitol	V	+	+	+		+
L-Rhamosa	-	-	-	-	-	
Levulino	V	+	-W	-		
Sacarosa	+	+	+	+		-
Glucosa	+	+	+	+	+	+
Benzoato	V	-V	+	-		
n-Propanol	-	+	-	+W	-	-
β-Alanina	-	-	-	-	-	+
Betaina	-	+	+	+		
L-arginina	-	+	+	+		
L-Lisina	-	+	+	V		
Heptanoato	-	+	+	-		
D-Fucose	-	+	+	+		
D	-	V	-	+		

Nota: + = reacción positiva; - = reacción negativa; V = variable; W = weak (débil).

Fuente: Organización Europea y Mediterránea de Protección Fitosanitaria (EPPO) (2004).

Tabla 3. Pruebas de determinación de biovar en *R. solanacearum*

Utilización de:	Biovar				
	1	2	3	4	5
Maltosa	-	+	+	-	+
Lactosa	-	+	+	-	+
Celobiosa	-	+	+	-	+
Manitol	-	-	+	+	+
Sorbitol	-	-	+	+	-
Dulcitol	-	-	+	+	-

Fuente: Organización Europea y Mediterránea de Protección Fitosanitaria (EPPO) (2004).

Tabla 4. Pruebas para diferenciación de sub-fenotipos de biovar 2 de *R. solanacearum*

Prueba	Biovar 2A	RFLP	Biovar 2A	RFLP	Biovar 2T o 2N
	grupo 26		grupo 27		
Utilización de trehalosa	-		+		+
Utilización de inositol	+		-		+
Utilización de D-ribosa	-		-		+
Actividad pectolítica	Low		Low		High

Fuente: Organización Europea y Mediterránea de Protección Fitosanitaria (EPPO) (2004).

Tabla 5. Determinación de razas en *R. solanacearum*

Raza	1	2	3
Reacción en:			
Tomate/Berenjena	Marchitez	Sin reacción	Marchitez
Tabaco (inoculación tallo)	Marchitez	Sin reacción	Sin reacción
Tabaco (prueba de hipersensibilidad)	Necrosis	HR	Clorosis
<i>Musa acuminata</i>	Sin reacción	Marchitez	Sin reacción

Fuente: Organización Europea y Mediterránea de Protección Fitosanitaria (EPPO) (2004).

Los procedimientos que se harían para la detección están descritos en la Figura 2, esos serían los dos procedimientos usados y descritos sobre los requerimientos para un diagnóstico positivo expuesto por EPPO (2004).

- Los síntomas de la enfermedad, las características morfológicas y bioquímicas del agente patógeno y sus propiedades patógenas deben estar de acuerdo con las descripciones del protocolo.
- Para el aislamiento de la bacteria y las descripciones de las características morfológicas, bioquímicas y patogénicas, deberán seguirse los procedimientos y requisitos del protocolo.
- En el caso de infecciones latentes, tras una prueba de detección inicial el agente patógeno deberá aislarse mediante siembra selectiva antes o después de la inoculación de extracto tisular en plantas de tomate o berenjena y se identificará correctamente, incluyendo una prueba de patogenicidad con el cultivo puro en tomate o berenjena.
- Deberá determinarse el biovar o el genotipo
- Deberá incluirse siempre un control negativo y positivo siempre que sea posible. Las plantas inoculadas con la cepa de control. Las plantas inoculadas con la cepa de control positivo deben mantenerse separadas de otras plantas de ensayo.

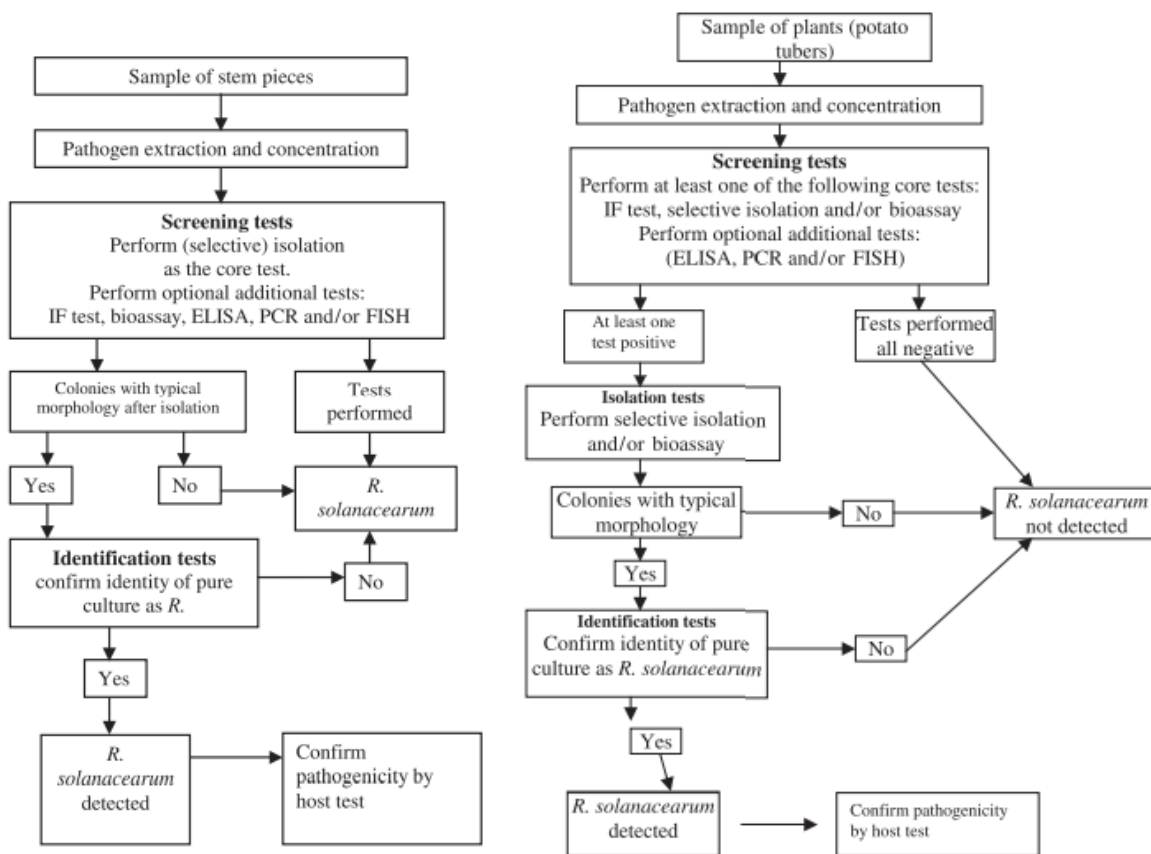


Figura 2. Procedimientos para la detección e identificación de *R. solanacearum*.

Fuente: Organización Europea y Mediterránea de Protección Fitosanitaria (EPPO) (2004).

3.6 Manejo

No existe una única estrategia de control para este patógeno, un buen manejo integrado puede conducir a su reducción significativamente. En regiones donde el patógeno ya está establecido las prácticas culturales como rotación de cultivos con plantas no hospedantes, las rotaciones de cultivos, la eliminación de maleza silvestres, control de nematodos, plantar variedades resistentes (De Armas 2017), dada la complejidad en el manejo de este patógeno, es crucial que el enfoque se centre en prevenir su introducción a las parcelas (Melgar 2012).

3.7 Control Biológico

Es el control mediante la aplicación de agentes biológicos que impidan el desarrollo de la enfermedad por un patógeno. En el caso de las enfermedades de las plantas, los agentes biológicos suelen ser cepas bacterianas o fúngicas aisladas de la endosfera o rizosfera. Se han descubierto mecanismos por los que estos agentes de biocontrol interactúan con la planta hospedante y con otros miembros de la comunidad microbiana asociada a la planta y que comprender estos mecanismos es crucial para aislar agentes de biocontrol que sean eficaces y brinden un manejo comparable al logrado con productos químicos y que sea sostenible a lo largo del tiempo. (O'Brien 2017)

3.8 Bacterias en la rizosfera

La rizosfera es la región del suelo más próxima a la raíz, que está bajo la constante influencia bioquímica de los exudados radiculares, los cuales determinan la composición microbiana de la misma (Moe 2013). El término rizosfera, fue definido por primera vez por Hiltner (1904) y ha sido utilizado ampliamente en la literatura científica con interés creciente en forma permanente. Si bien no existe un límite espacial definido para la rizosfera, se ha propuesto que se extiende desde la superficie de la raíz por unos pocos milímetros hasta el suelo circundante no influenciado directamente por la raíz (Hartman y Tringe 2019). Algunos autores la subdividen en endorizosfera, ectorizosfera y rizoplano: La endorizosfera es la zona de la raíz ocupada por microorganismos y delimitada por el rizoplano que es la superficie de la raíz. La ectorizosfera o rizosfera propiamente dicha en una porción de suelo que está influenciada por la rizodeposición de sustancias aprovechables por los microorganismos edáficos (Reinhold-Hurek *et al.* 2015).

La interacción entre microorganismos y plantas ocurre a lo largo de todo su ciclo de vida, manifestándose tanto en la superficie como en las profundidades del suelo. Activamente las raíces exudan sustancias conformadas por carbono las cuales influyen en el crecimiento microbiano en todo el entorno de la raíz. En general, se ha observado que las plantas

modifican su rizosfera para hacerla más atractiva a microorganismos que tienen rasgos beneficiosos a través de los cuales se produce la promoción del crecimiento vegetal, tales como fijación de nitrógeno atmosférico, solubilización de nutrientes e inhibición del crecimiento de patógenos, entre otros. (Shayanthan *et al.* 2022).

3.8.1 Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (PGPR, por sus siglas en ingles)

Son microorganismos que inducen alteraciones fisiológicas de las plantas o que producen metabolitos como promotores del crecimiento vegetal. Algunas rizobacterias son capaces de sintetizar fitoreguladores como las citoquininas que regulan la división celular impulsando así el crecimiento vegetal y reduciendo la senescencia foliar (García de Salamone *et al.* 2005). Además de este efecto directo muchas PGPR aumentan la productividad de los cultivos por su efecto antagónico frente a fitopatógenos (Djaya *et al.* 2019).

3.8.2 Antecedentes de biocontrol a partir de PGPR

Distintas investigaciones como la de Djaya *et al.* (2019), tuvieron como objetivo demostrar la eficacia del antagonismo de los organismos PGPR. Sus resultados fueron alentadores ya que demostró que ciertos aislados de *Lysinibacillus sp.* y de las PGPR *Bacillus subtilis*, y *Pseudomonas fluorescens* reducen la incidencia de la enfermedad de marchitez causada por la bacteria edáfica *R. solanacearum*, dando como resultado biocontroladores sumado a sus cualidades de promoción del crecimiento vegetal.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Sitio de la investigación

Durante los meses de enero, febrero y marzo del año 2024, se realizaron trabajos experimentales en condiciones controladas en el laboratorio de Ecología Microbiana de la Cátedra de Microbiología Agrícola, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, ubicado en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, República Argentina.

4.2 Materiales y equipo

Materiales: tubos de ensayo de 30 x 300 mm, tapones, gradillas, cajas de Petri (estériles y descartables), ansas, papel de aluminio, tubos de ensayo de 15 x 150 mm, micropipetas (20-200, 100-1000 y 1000-5000 μ L), puntas de micropipetas, pipetas de cristal de 1 mL, peptona de carne, extracto de carne, agar glucosa, solución fisiológica, alcohol al 70%.

Equipos utilizados: flujo laminar (Casiba, VL-1), agitador orbital con calefacción (BIOMINT, modelo BM081), estufa de cultivo (San Jor), autoclave (Vz), vortex (Vicking), plato caliente y agitador magnético (Decalab, Fbr), balanza digital (Denver instrument, modelo MXX-612).

4.3 Selección de aislados

De una colección de 447 aislamientos totales, procedentes de plantas de tomate (Alvarado Ramírez, García de Salamone 2022), del subgrupo de 149 aislados procedentes de calentamiento y formadores de endospora se seleccionaron 15 aislados con características de formación de endospora. Para estos se evaluó *in vitro* la interacción aislado-planta-patógeno, para determinar su capacidad de inhibir la incidencia de la bacteria patógena

R. pseudosolanacearum en plantas de tomate bajo condiciones controladas a una temperatura media de 24°C, con un fotoperiodo de 13/10 horas de luz/oscuridad.

4.4 Producción de colonias y cultivos de los aislados y del patógeno

Los aislados seleccionados fueron sembrados en placas Petri conteniendo medio de cultivo Agar nutritivo (An+Glc), incubados en una estufa de cultivo a 30°C y oscuridad, revisados cada 24 h hasta que formaron colonias. En la cámara de flujo laminar con un ansa estéril se tomó una colonia de la placa Petri respectiva y se transfirió a un medio de cultivo líquido (caldo de cultivo), que tenía la misma composición que el medio An+Glc pero sin agar. Se hicieron dos ciclos con agitación constante a 150 rpm y 27°C. El primer ciclo fue de 24 h para lograr que las células bacterianas se dispersaran. El segundo ciclo se inició con 1 ml del tubo procedente, pero con una duración de 72 h.

4.5 Establecimiento de ensayos de interacción aislado-planta-patógeno

Se preparo la solución Hoagland según lo descrito por Taiz y Zeiger (2002), con modificación de la fuente de hierro propuesta por García de Salamone y Alvarado Ramirez (2023), más ocho gramos de agar por cada litro, para obtener un medio de cultivo semisólido que permitiera el crecimiento de la raíz. Este medio de cultivo fue dosificado en los tubos previamente descritos, para ser esterilizado en autoclave (1 atm y 121°C durante 30 min). Cuando la temperatura descendió a 25-30°C, se inoculó con 1 ml de una dilución de 10^{-3} procedente del segundo ciclo de la preparación del inóculo de los respectivos aislados, se homogeneizaron con un ciclo de 10 segundos en vortex y se dejaron enfriar y solidificar. La siembra de una semilla de tomate variedad Platense por tubo se realizó 24 horas después de la inoculación de los aislados.

En el caso del patógeno, se siguió el mismo procedimiento, pero la inoculación se realizó cuando la plántula emergió y abrió sus cotiledones. Para realizar este procedimiento también se inoculó 1 ml de la dilución de 10^{-3} utilizando una pipeta de vidrio estéril para cada tubo

haciendo la descarga lo más cerca posible a la raíz principal, iniciando desde el fondo del tubo de ensayo liberando el inóculo de abajo hacia arriba.

4.6 Tratamientos

Se consideraron cinco tratamientos para cada aislado evaluado. Los mismos se fueron:

- Aislado + planta + patógeno.
- Aislado + planta.
- Planta + patógeno.
- Caldo de cultivo + planta.
- Plantas (testigo absoluto).

La descripción de cantidad de tubos necesarios para el montaje del ensayo se muestra en la Figura 3, para los quince aislamientos y cada uno de los tratamientos evaluados dentro del ensayo.

Aislado 1 + planta + patógeno				Aislado 12 + planta + patógeno				Aislado 8 + planta		
1	2	3		1	2	3		1	2	3
Aislado 2 + planta + patógeno				Aislado 13 + planta + patógeno				Aislado 9 + planta		
1	2	3		1	2	3		1	2	3
Aislado 3 + planta + patógeno				Aislado 14 + planta + patógeno				Aislado 10 + planta		
1	2	3		1	2	3		1	2	3
Aislado 4 + planta + patógeno				Aislado 15 + planta + patógeno				Aislado 11 + planta		
1	2	3		1	2	3		1	2	3
Aislado 5 + planta + patógeno				Aislado 1 + planta				Aislado 12 + planta		
1	2	3		1	2	3		1	2	3
Aislado 6 + planta + patógeno				Aislado 2 + planta				Aislado 13 + planta		
1	2	3		1	2	3		1	2	3
Aislado 7 + planta + patógeno				Aislado 3 + planta				Aislado 14 + planta		
1	2	3		1	2	3		1	2	3
Aislado 8 + planta + patógeno				Aislado 4 + planta				Aislado 15 + planta		
1	2	3		1	2	3		1	2	3
Aislado 9 + planta + patógeno				Aislado 5 + planta				Planta + patógeno		
1	2	3		1	2	3		1	2	3
Aislado 10 + planta + patógeno				Aislado 6 + planta				Caldo de cultivo + planta		
1	2	3		1	2	3		1	2	3
Aislado 11 + planta + patógeno				Aislado 7 + planta				Plantas (testigo absoluto)		
1	2	3		1	2	3		1	2	3

Figura 3. Esquema experimental de la cantidad de tubos totales (99 totales). El color verde y el numerado en cada caja indican cada una de las repeticiones del respectivo tratamiento.

4.7 Variables de respuesta

Para determinar el efecto de los diferentes aislados evaluados se tomaron tres variables de respuesta:

- a) **Incidencia:** Se tomo como positiva la presencia de los siguientes síntomas: necrosis en los puntos de crecimiento de la raíz principal y laterales, emisión de raíces aéreas, asignando el valor de uno cuando se observaron daños por el patógeno y cero cuando no se presentaron síntomas de daño por el patógeno (A. Ramírez y García de Salamone 2023).
- b) **Días a emisión del primer par de hojas (DEPPHV):** Se tomo cuando ocurrió la elongación del entre nudo de los cotiledones y el primer par de hojas verdaderas.
- c) **Número de raíces laterales:** Se tomo el número final de raíces secundarias y terciaras a los 40 días de iniciado el experimento.

Las variables fueron evaluadas cada tres días, después del día siete de la inoculación con el patógeno, la finalización del ensayo estará sujeta a la emisión del primer par de hojas verdaderas del testigo absoluto, que en este caso fue a los 40 días.

4.8 Diseño experimental y análisis estadístico

En cada ensayo se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones para cada tratamiento. Los datos obtenidos fueron analizados con el software Infostat versión estudiante (Di Rienzo et al. 2013) y con R estudio. Las medias fueron comparadas con la prueba de Tukey con un $\alpha=0.05$ para las variables con distribución normal, y para las que no presentaron normalidad se hizo una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis con un $\alpha=0.05$.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Incidencia

Posterior a la inoculación con *R. pseudosolanacearum*, se realizaron evaluaciones cada tres días durante el desarrollo del ensayo y se pudo contrastar que los síntomas asociados a este patógeno no se expresaron en cuatro de los quince aislados evaluados. Esto se observó en las plantas que fueron tratadas con los aislamientos Ar-RJG_I, Ar-RJG_{VIII}, Ar-RJG_X y Ar-RJG_{XV} (Figura 4). Como resultado, se registró una incidencia del 0% en las plantas inoculadas con los aislamientos mencionados anteriormente. En el caso de las plantas tratadas con los aislamientos Ar-RJG_{II}, Ar-RJG_{III}, Ar-RJG_{IX}, Ar-RJG_{XI} y Ar-RJG_{XII}, se observó una supresión parcial de los síntomas registrando una incidencia equivalente al 33%.

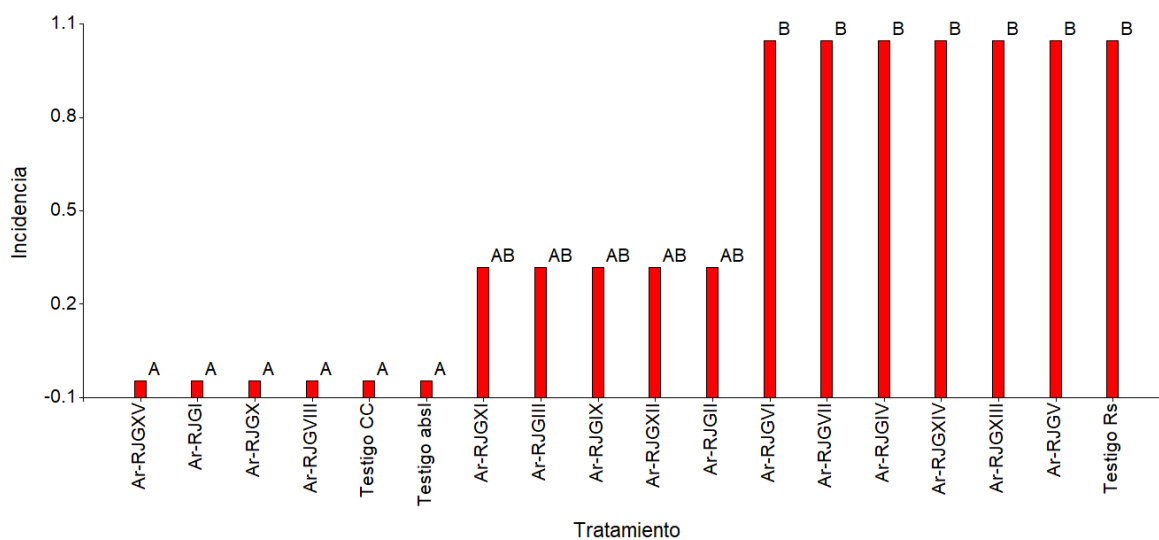


Figura 4. Incidencia de la enfermedad debido a la inoculación con los distintos aislamientos obtenidos de plantas de tomate. Las letras distintas sobre cada barra indican diferencias significativas según el test de Kruskal Wallis ($\alpha=0.05$).

Según datos presentados por Shen *et al.* (2018), demostraron en su estudio en el cual sumergieron raíces de tomate en una solución con *Bacillus pumilus*WP8 y posteriormente en un inóculo *R. solanacearum* que *B. pumilus*WP8 tiene efectos de PGPR y de biocontrolador contra *R. solanacearum*, dando como resultado un 90% en la reducción de incidencia de este patógeno. En este trabajo los resultados con algunas cepas fueron aún mejores dado que se obtuvo una reducción del 100% de la incidencia de la enfermedad.

Además Agarwal *et al.* (2020), quienes evaluaron la capacidad que tienen las bacterias endofíticas como *Staphylococcus warneri* GL1, *Bacillus velezensis* GL3, *B. velezensis* GL5 y *B. velezensis* GMC2 de protección contra *R. solanacearum*, sumergió plántulas de tomate en una solución de agua destilada y los aislados, posteriormente pasaron por un método de inmersión de raíz para la inoculación del patógeno y concluyeron que pueden ser biocontroladores de *R. solanacearum*, ya que sus resultados mostraron que los aislados obtuvieron una reducción en incidencia del 54.63% al 77.67%. Los resultados obtenidos, superan la reducción de la incidencia de la enfermedad, incluso superando el 54.63%, debido a que en los aislados evaluados que tuvieron una reducción parcial la reducción fue del 67%. Seis de los aislados estudiados tuvieron un nivel de incidencia de la enfermedad igual a los controles inoculados solamente con *R. pseudosolanacearum*.

5.2 Días a emisión del primer par de hojas verdaderas (DEPPHV)

Respecto a esta variable, los aislados que se destacaron fueron: Ar-RJG_{XV}, Ar-RJG_{XII} y Ar-RJG_{VIII} los cuales mostraron propiedades de PGPR. Las plantas inoculadas con estos aislamientos manifestaron un mayor desarrollo, presentando la emergencia del primer par de hojas verdaderas al día 28, 30 y 31 después de la inoculación, respectivamente en comparación con los demás tratamientos y testigo, los cuales emitieron el primer par de hojas en los días 37 y 40, respectivamente (Figura 5).

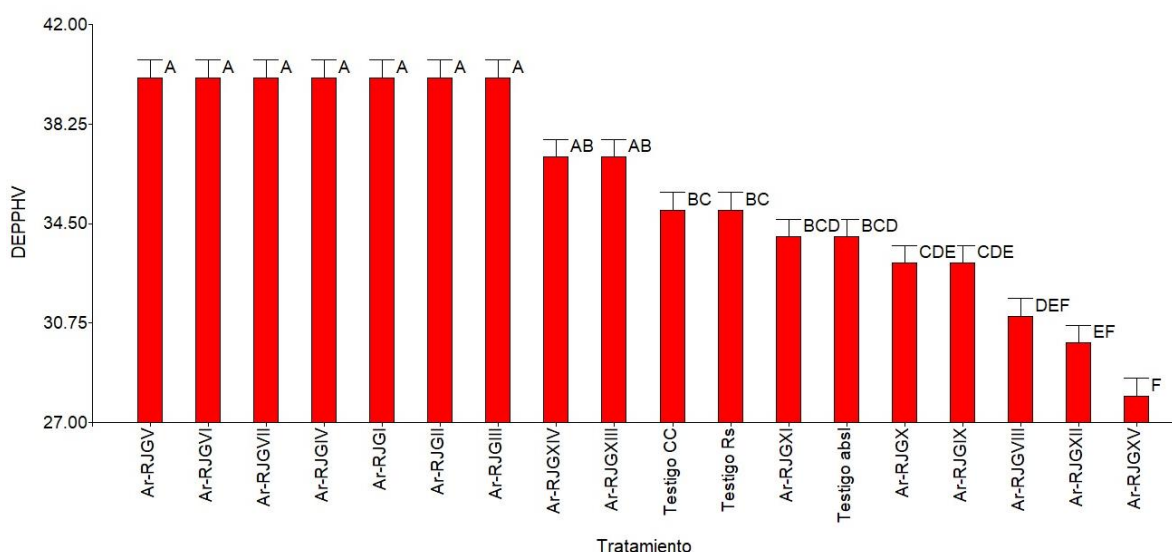


Figura 5. Días a emisión del primer par de hojas verdaderas (DEPPHV) debido a la inoculación con de los distintos aislamientos obtenidos de plantas de tomate. Las letras distintas sobre cada barra indican diferencias significativas según el test de Tukey ($\alpha=0.05$).

Estos resultados coinciden con lo informado por Widnyana (2019), quien en su investigación remojo semillas de tomate en soluciones con *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp y afirma que mediante esta inoculación estas PGPR aumentaron la tasa de crecimiento y generaron en las plantas inoculadas un mayor número de hojas en comparación con el tratamiento control. De igual forma la investigación realizada por Kefela *et al.* (2015) mostró que mediante la inoculación de *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus licheniformis* y *Bradyrhizobium japonicum*, en otra especie cultivable, también observo una tasa de crecimiento más acelerada, resaltando que las plantas inoculadas con *B. japonicum* a la edad de una semana parecían tener dos semanas y las tratadas con *B. licheniformis* y *P. polymyxa* de tres semanas.

5.3 Número de raíces laterales

Los aislamientos Ar-RJGI, Ar-RJGVIII y Ar-RJGX indujeron el mayor número de raíces laterales, con un promedio de 12, 11 y 10, respectivamente, diferenciándose estadísticamente del resto de los tratamientos y del testigo (Figura 6). En otros casos como Ar-RJGVII con un

promedio de una raíz y el testigo de planta más patógeno que mostro un promedio de seis raíces laterales.

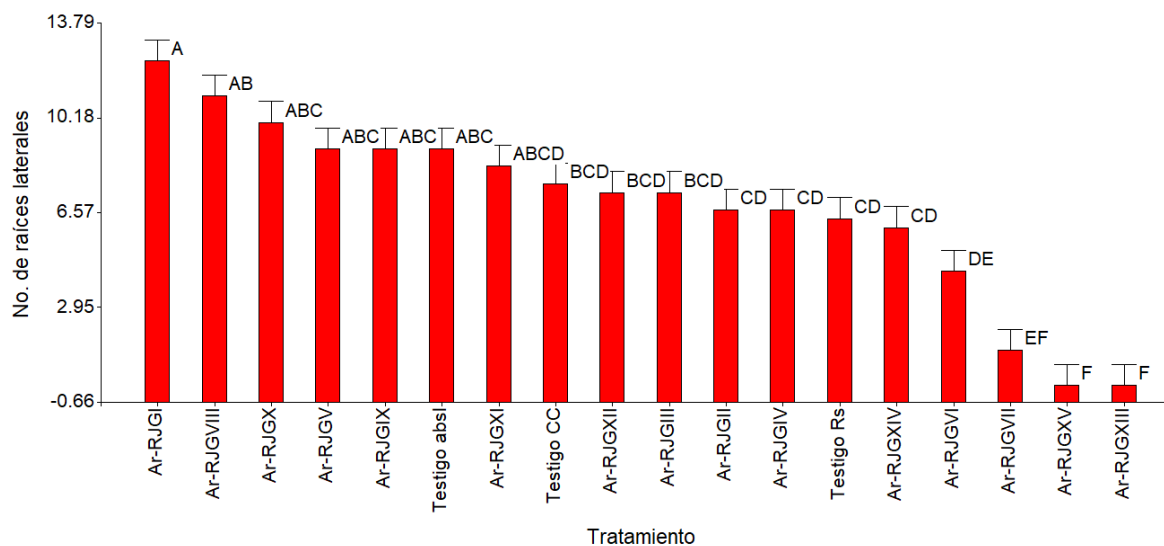


Figura 6. Numero de raíces secundarias en cada uno de los tratamientos. Las letras distintas sobre cada barra indican diferencias significativas según el test de Tukey ($\alpha=0.05$).

Resultados similares informaron Zhao *et al.* (2023), en un estudio aplicando combinaciones de microorganismos como *Providencia vermicola*, *Pseudomonas corrugata*, *Advenella kashmirensis* sub sp. *methylica*, *Empedobacter brevis*. Estos autores observaron que mediante la inoculación con distintas combinaciones de estos microorganismos un aumento del 50% de la cantidad de raíces laterales, con respecto al tratamiento control. Este parámetro es de importancia en los sistemas productivos debido a que aumentando el número de raíces secundarias se favorece la absorción de nutrientes del suelo realizando un mejor aprovechamiento de los recursos disponibles para las plantas Mukherjee (2021).

VI. CONCLUSIONES

- Los aislados Ar-RJGI, Ar-RJGVIII, Ar-RJGX y Ar-RJGXV, fueron capaces de reducir al 0% la incidencia de *R. pseudosolanacearum*, y Ar-RJGII, Ar-RJGIII, Ar-RJGIX, Ar-RJGXI y Ar-RJGXII, registraron una incidencia equivalente al 33%.
- Los aislados Ar-RJGXV, Ar-RJGXII y Ar-RJGVIII, redujeron el número de días a emisión del primer par de hojas verdaderas, con 28, 30 y 31 días después de la inoculación, respectivamente, incluso con la interacción del patógeno.
- Para el número de raíces laterales los aislamientos Ar-RJGI, Ar-RJGVIII y Ar-RJGX, indujeron un promedio de 12, 11 y 10 raíces, respectivamente, observándose mayor formación de raíces laterales, respecto a los testigos.
- La metodología empleada para evaluar los aislamientos obtenidos es adecuada porque permite estudiar la interacción entre los aislados, la planta y el patógeno.
- Según los resultados obtenidos en la presente investigación, el uso de control biológico contra la incidencia de *Ralstonia pseudosolanacearum*, podría ser una herramienta alternativa o complementaria al control químico, como parte del manejo integrado de plagas en tomate.

VII. RECOMENDACIONES

- Los aislados Ar-RJG_{XV}, Ar-RJG_I, Ar-RJG_X y Ar-RJG_{VIII} que fueron seleccionados porque manifestaron una incidencia de *R. pseudosolanacearum* del 0% logrando evitar la acción del patógeno en la planta. Esto indica su potencial como bioinsumos de uso hortícola.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abo-Elyousr, KAM; Hassan, SA. 2021. Biological control of *Ralstonia solanacearum* (Smith), the causal pathogen of bacterial wilt disease by using *Pantoea* spp (en línea). Egyptian Journal of Biological Pest Control. 31, 113. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00460-z>
- Agarwal, H; Dowarah, B; Baruah, PM; Bordoloi, KS; Krishnatreya, DB; Agarwala, N. 2020. Endophytes from *Gnetum gnemon* L. can protect seedlings against the infection of phytopathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum* as well as promote plant growth in tomato (en línea). Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126503>
- Alvarado Ramírez A., García de Salamone I.E. 2022. Análisis de los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas asociadas a plantas de tomate en situación de cultivo con o sin síntomas de marchitamiento bacteriano. (Poster). VII Jornadas Bonaerenses de Microbiología de Suelos para una Agricultura Sustentable (JOBMAS). 10 y 11 de marzo. Universidad Nacional de Hurlingham (UNAHUR).
- Alvarado Ramírez A.; I.E. García de Salamone. 2023. Perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas asociadas a plantas de tomate y aislamientos de potenciales agentes de biocontrol de *Ralstonia solanacearum*. Presentación Oral. II Congreso Internacional de Fisiología, Nutrición y Protección Vegetal, Universidad Nacional de Agricultura de Honduras 16-18/8.
- De Armas, S. 2017. Desarrollo de ensayos *in vitro* para evaluar resistencia a *Ralstonia solanacearum* en germoplasma de papa. Tesina Lic. Uruguay. Universidad De La Republica Uruguay. p. 11.

- Djaya, L; Hersanti; Istifadah, N; Hartati, S; Joni, IM. 2019. In vitro study of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and endophytic bacteria antagonistic to *Ralstonia solanacearum* formulated with graphite and silica nano particles as a biocontrol delivery system (BDS) (en línea). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 19, 101153. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101153>
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW 2011 InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Elphinstone JG. The current bacterial wilt situation: a global overview. In: Allen, C; Prior, P; Hayward, AC (eds.). 2005. *Bacterial Wilt Disease and The Ralstonia solanacearum Species Complex*. American Phytopathological Society Press; St Paul, MN. pp. 9–28
- García de Salamone, I. E; Hynes, R. K; Nelson, L. M. 2005. Role of cytokinins in plant growth promotion by rhizosphere bacteria. *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, 173–195.
- Hartman, K; Tringe, SG. 2019. Interactions Between Plants and Soil Shaping the Root Microbiome Under Abiotic Stress. *Biochem* (en línea). J. 476, 2705–2724. doi: 10.1042/BCJ20180615
- Hayward, AC. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* (en línea). 27(2), 265–277. doi:10.1111/j.1365-2672.1964.tb04912.x
- Hayward; AC. 1991. Biology and Epidemiology of Bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas Solanacearum* (en línea). 29(1), 65–87. *Annual Review of Phytopathology*. Consultado el 27 mar. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.py.29.090191.000433>
- Hiltner, L. 1904. Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arb. Landwirtsch. Ges.* 98:59–78

- Kefela, T; Gachomo¹, EW; Kotchonil, S. 2015. *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus licheniformis* and *Bradyrhizobium japonicum* IRAT FA3 Promote Faster Seed Germination Rate, Growth and Disease Resistance under Pathogenic Pressure. *Journal of Plant Biochemistry & Physiology* (en línea). Disponible en: doi:10.4172/2329-9029.1000145
- Melgar, JC. 2012. Marchitez bacteriana en solanáceas: su reconocimiento y su manejo integrado. Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA) (en línea). http://www.fhia.org.hn/descargas/Departamento_de_Proteccion_Vegetal/manual_marchitez_bacteriana.pdf
- Moe, LA. 2013. Amino Acids in the Rhizosphere: From Plants to Microbes (en línea). *Am. J. Bot.* 100 (9), 1692–1705. doi: 10.3732/AJB.1300033
- Mukherjee, S; Baluška, F. 2021. *Rhizobiology: Molecular Physiology of Plant Roots*. Springer. ISSN 1867-9048
- National Library of Medicine (NCBI). 2020. *Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford)* (en línea). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=3116862&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
- O'Brien; Philip, A. 2017. Biological control of plant diseases. *Australasian Plant Pathology* (en línea). 46(4), 293–304. doi:10.1007/s13313-017-0481-4
- Patrice, J; Caitilyn, A; Jeffrey, B; Carrie, H; Timur, M. 2009. *Ralstonia solanacearum* raza 3 biovar 2. USDA (en línea). https://plantpath.ifas.ufl.edu/rsol/RalstoniaPublications_PDF/Ralstonia_solanacearum_ES_PDF.pdf
- Reinhold-Hurek, B; Büniger, W; Burbano, CS; Sabale, M; Hurek, T. 2015. Roots Shaping Their Microbiome: Global Hotspots for Microbial Activity. *Annu. Rev. Phytopathol* (en línea). 53, 403–424. doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102342

- Rich, J. 2023. Bacterial Wilt in Tomatos: Identification and Prevention. Epic Gardening (en línea). Consultado 22 dic. 2023. Disponible en <https://www.epicgardening.com/bacterial-wilt-tomatoes/>.
- Shayanthan, A; Ordoñez, PAC; Oresnik, IJ. 2022. The Role of Synthetic Microbial Communities (SynCom) in Sustainable Agriculture (en línea). Front. Agron. 4:896307. doi: 10.3389/fagro.2022.896307
- Shen, M; Xia, D; Yin, Z; Zhao Q; Kang, Y. 2018. *Bacillus pumilus* WP8 exhibits biocontrol efficacy against tomato bacterial wilt via attenuation of the virulence of the pathogenic bacterium, Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science, 68:5, 379-387, DOI: 10.1080/09064710.2017.1416663
- Siri, MI. 2010. Estudio genómico comparativo de las cepas de *Ralstonia solanacearum* causante de la marchitez bacteriana de la papa en Uruguay. Tesis Ph.D. Uruguay. Universidad De La Republica Uruguay. p.2-8.
- Smith; EF. 1896. A Bacterial Disease of The Tomato, Eggplant, and Irish Potato (en línea). U.S. Department of Agriculture Division of Vegetable Physiology and Patology. No. 12. Disponible en: [A bacterial disease of the tomato, eggplant, and Irish potato \(Bacillus solanacearum n. sp.\) : Smith, Erwin F. \(Erwin Frink\), 1854-1927 : Free Download, Borrow, and Streaming : Internet Archive](#)
- Sujan, P. 2020. Taxonomy and Phylogenetic Research on *Ralstonia solanacearum* Species Complex: A complex Pathogen with Extraordinary Economic Consequences (en línea). Revista MDPI. 9(11), 886. Consultado 12 nov. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens9110886>
- The International Plant Diagnostic Network (IPDN). 2014. Bacterial Wilt Disease: Standard Operating Procedure for Use in Diagnostic Laboratories. Version: EA-SOP-RS1.
- Wang, Z; Luo, W; Cheng, S; Zhang, H; Zong, J; Zhang, Z.2023. *Ralstonia solanacearum* - A soil borne hidden enemy of plants: Research development in management strategies,

their action mechanism and challenges. Front PlantSci (en línea). Disponible en: doi: 10.3389/fpls.2023.1141902. PMID: 36909396; PMCID: PMC9998985.

Widnyana, K. (2019). PGPR (Plant Growth Promoting Rizobacteria) Benefits in Spurring Germination, Growth and Increase the Yield of Tomato Plants. Recent Advances in Tomato Breeding and Production (en línea). Disponible en: doi:10.5772/intechopen.78776

Yabuuchi, E; Yano, I; Hotta, H; Nishiuchi, Y; kosako, Y. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralsotniagen*. nov. Proposal of *Rasltioniapickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov; *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. no. Microbiol. Immunol. 39:897-904

Yuliar; Nion, YA; Toyota, K. 2015. Recent trends in control methods for bacterial. wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum* (en línea). MicrobesEnviron. 2015;30(1):1-11. Disponible endoi:10.1264/jsme2.ME14144. Epub 2015 Mar 26. PMID: 25762345; PMCID: PMC4356456.

Zhao, Y.; Hong, Y.; Wang, P.; Gou, Y.; Zeng, R.; Zhang, Q.; Chen, D.; Song. 2023. Y. Assembly of Tomato Rhizobacteria from Different Functional Groups Improves Seedling Photosynthesis and Growth. Plants. 12, 4000. <https://doi.org/10.3390/plants12234000>

ANEXOS

Anexo 1. Composición de materiales utilizados:

- Solución Hoagland: 6 mL/L KNO_3 , mL/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 1 mL/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 mL/L de KCl, H_3BO_3 , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y H_2MoO_4 , 1 mL/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.
- Solución fisiológica: 0.9 g/L de NaCl.
- Caldo de cultivo: 5g/L de peptona de carne, 3 g/L de extracto de carne y 5g/L de glucosa.
- Agar nutritivo: 5g/L de peptona de carne, 3 g/L de extracto de carne, 5g/L de glucosa y 16 g/L de agar.

Anexo 2. Análisis estadístico para Incidencia.

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	C	H	p
Incidencia	Ar-ARGI	3	0.00	0.00	0.00	17	0.75	29.89	0.0013
Incidencia	Ar-ARGII	3	0.33	0.58	0.00				
Incidencia	Ar-ARGIII	3	0.33	0.58	0.00				
Incidencia	Ar-ARGIV	3	1.00	0.00	1.00				
Incidencia	Ar-ARGIX	3	0.33	0.58	0.00				
Incidencia	Ar-ARGV	3	1.00	0.00	1.00				
Incidencia	Ar-ARGVI	3	1.00	0.00	1.00				
Incidencia	Ar-ARGVII	3	1.00	0.00	1.00				
Incidencia	Ar-ARGVIII	3	0.00	0.00	0.00				
Incidencia	Ar-ARGX	3	0.00	0.00	0.00				
Incidencia	Ar-ARGXI	3	0.33	0.58	0.00				
Incidencia	Ar-ARGXII	3	0.33	0.58	0.00				
Incidencia	Ar-ARGXIII	3	1.00	0.00	1.00				
Incidencia	Ar-ARGXIV	3	1.00	0.00	1.00				
Incidencia	Ar-ARGXV	3	0.00	0.00	0.00				
Incidencia	Testigo abs1	3	0.00	0.00	0.00				
Incidencia	Testigo CC	3	0.00	0.00	0.00				
Incidencia	Testigo Rs	3	1.00	0.00	1.00				

Anexo 3. Análisis estadístico para días de emisión primer par de hojas verdaderas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
DEPPHV	54	0.94	0.92	3.21

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	800.83	17	47.11	35.33	<0.0001
Tratamiento	800.83	17	47.11	35.33	<0.0001
Error	48.00	36	1.33		
Total	848.83	53			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=3.53587

Error: 1.3333 gl: 36

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
Ar-ARGV	40.00	3	0.67	A
Ar-ARGVI	40.00	3	0.67	A
Ar-ARGVII	40.00	3	0.67	A
Ar-ARGIV	40.00	3	0.67	A
Ar-ARGI	40.00	3	0.67	A
Ar-ARGII	40.00	3	0.67	A
Ar-ARGIII	40.00	3	0.67	A
Ar-ARGXIV	37.00	3	0.67	A B
Ar-ARGXIII	37.00	3	0.67	A B
Testigo CC	35.00	3	0.67	B C
Testigo Rs	35.00	3	0.67	B C
Ar-ARGXI	34.00	3	0.67	B C D
Testigo abs1	34.00	3	0.67	B C D
Ar-ARGX	33.00	3	0.67	C D E
Ar-ARGIX	33.00	3	0.67	C D E
Ar-ARGVIII	31.00	3	0.67	D E F
Ar-ARGXII	30.00	3	0.67	E F
Ar-ARGXV	28.00	3	0.67	F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Anexo 4. Análisis estadístico de numero de raíces laterales.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
No. de raíces secundarias	54	0.90	0.85	20.32

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	618.09	17	36.36	19.06	<0.0001
Tratamiento	618.09	17	36.36	19.06	<0.0001
Error	68.67	36	1.91		
Total	686.76	53			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=4.22910

Error: 1.9074 gl: 36

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
Ar-ARGI	12.33	3	0.80	A
Ar-ARGVIII	11.00	3	0.80	A B
Ar-ARGX	10.00	3	0.80	A B C
Ar-ARGV	9.00	3	0.80	A B C
Ar-ARGIX	9.00	3	0.80	A B C
Testigo abs1	9.00	3	0.80	A B C
Ar-ARGXI	8.33	3	0.80	A B C D
Testigo CC	7.67	3	0.80	B C D
Ar-ARGXII	7.33	3	0.80	B C D
Ar-ARGIII	7.33	3	0.80	B C D
Ar-ARGII	6.67	3	0.80	C D
Ar-ARGIV	6.67	3	0.80	C D
Testigo Rs	6.33	3	0.80	C D
Ar-ARGXIV	6.00	3	0.80	C D
Ar-ARGVI	4.33	3	0.80	D E
Ar-ARGVII	1.33	3	0.80	E F
Ar-ARGXV	0.00	3	0.80	F
Ar-ARGXIII	0.00	3	0.80	F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Anexo 5. Siembra de bacterias en placas Petri.



Anexo 6. Necrosis en puntos de crecimiento en la raíz de la planta.



Anexo 7. Muestra de raíz sana y conteo de raíces laterales.



Anexo 8. Elongación del primer par de hojas verdaderas.



Anexo 9. Comparación de una raíz con signos de *R. solanacearum* y una raíz sana.

