

PAPEL DE LOS SIDERÓFOROS EN LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 HACIA HONGOS FITOPATÓGENOS

Role of Siderophores in Antagonic Activity of *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 Against Plant Fungi

Gustavo Santoyo^{1‡}, Eduardo Valencia-Cantero¹, Ma. del Carmen Orozco-Mosqueda¹,
Juan José Peña-Cabriales² y Rodolfo Farías-Rodríguez¹

RESUMEN

Pseudomonas fluorescens ZUM80 es una cepa que puede inhibir el crecimiento de diversos patógenos de plantas. En este trabajo se reporta que la cepa bacteriana ZUM80 logró restringir el crecimiento de *Colletotrichum lindemuthianum*, *Colletotrichum gloesporioides* y *Phytophthora cinnamomi*, en un 76, 72 y 70%, respectivamente. Los altos grados de inhibición fueron posibles cuando la cepa bacteriana se inoculó con 24 horas de anterioridad a los fitopatógenos. Una mutante de la cepa ZUM80 Sid⁻, carente de la síntesis de sideróforos, no logró restringir el crecimiento de los tres patógenos analizados. Adicionalmente, se utilizó un concentrado de sideróforos de la cepa ZUM80 para restringir el crecimiento de los patógenos en cultivos líquidos. Al adicionar los sideróforos en cultivos de *C. lindemuthianum* y *C. gloesporioides* se observó una disminución significativa en su crecimiento respecto al control. Así, este trabajo muestra que la cepa ZUM80 de *Pseudomonas fluorescens* podría ser una alternativa viable en el control biológico de patógenos de plantas.

Palabras clave: *Pseudomonas*, control biológico, fitopatógenos, sideróforos.

SUMMARY

The bacterial strain *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 is able to inhibit the growth of diverse plant pathogens. In this work, it was reported that strain

ZUM80 restricted the growth of *Colletotrichum lindemuthianum*, *Colletotrichum gloesporioides* and *Phytophthora cinnamomi* up to 76, 72, and 70%, respectively. The high degree of inhibition was possible when the bacterial strain was inoculated 24 hours before the pathogens. A mutant of the ZUM80 Sid⁻ strain, lacking siderophore synthesis, was unable to restrict the growth of the three plant pathogens. Additionally, a concentrate of siderophores was also able to limit the growth of *C. lindemuthianum* and *C. gloesporioides* in liquid cultures. This work shows that the ZUM80 strain of *Pseudomonas fluorescens* may be a viable alternative in the biocontrol of plant pathogens.

Index words: *Pseudomonas*, biocontrol, plant pathogens, siderophores.

INTRODUCCIÓN

Los cultivos agrícolas son severamente afectados por la presencia de patógenos, los cuales pueden causar daños significativos en la producción y pérdidas económicas para los agricultores. Una estrategia empleada desde hace mucho tiempo para contender contra las enfermedades vegetales es el uso de compuestos químicos; sin embargo, se ha comprobado que estos tienen diversas consecuencias negativas en el ambiente, así como en la salud humana (Kah y Brown, 2006). Por lo tanto, se han buscado nuevas estrategias que puedan controlar dichas plagas vegetales. Así, el uso de microorganismos con capacidades para restringir el crecimiento de fitopatógenos se ha convertido en una opción atractiva y viable (Gardner *et al.*, 1984; Bano y Musarrat, 2003; Haas y Keel, 2003). Las bacterias *Pseudomonas* del grupo fluorescente se consideran una opción prometedora en el control biológico de fitopatógenos (Johri *et al.*, 1997; Paulsen *et al.*, 2005). Este grupo bacteriano es un importante colonizador de la rizósfera de plantas, además de presentar actividad antagonica hacia diversos fitopatógenos y ser promotoras del crecimiento (Banger y Tomashow, 1996; Burkhead

¹ Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Ed. B-5, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 58030 Morelia, Michoacán, México.

[‡] Autor responsable (gustavo_santoyo@yahoo.com) (gsantoyo@umich.mx)

² Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Unidad Irapuato. 36500 Irapuato, Guanajuato, México.

et al., 1994; Sutra *et al.*, 2000). Actualmente existen diversas cepas de *Pseudomonas fluorescens* que han sido registradas (y algunas de ellas patentadas) para ser usadas en los cultivos agrícolas (Powell *et al.*, 1990).

Los mecanismos de acción de estas bacterias en contra de fitopatógenos son diversos. Investigaciones han mostrado que varias especies de *Pseudomonas* producen antibióticos como pirrolnitrina, 2,4-diacetilfloroglucinol, piocianina y el ácido fenacín-1-carboxílico, además de los sideróforos y bacteriocinas (Haas y Keel, 2003; Weller *et al.*, 2002; Validov *et al.*, 2005; Valencia-Cantero *et al.*, 2005). La síntesis de estos metabolitos secundarios participan en el biocontrol de diversos fitopatógenos. Particularmente, a la síntesis de sideróforos por *Pseudomonas* fluorescentes se les ha atribuido un enorme interés por participar en la promoción del crecimiento vegetal y suprimir el crecimiento de patógenos de raíz (Kloepper *et al.*, 1980; Loper y Schroth, 1986). Se ha propuesto que tales compuestos pueden secuestrar el hierro del ambiente rizosférico, impidiendo que sea disponible para los patógenos. Así, las *Pseudomonas* que sintetizan sideróforos, tendrán ventajas de ocupar nuevos espacios, desplazando la demás microbiota del suelo (Farías-Rodríguez *et al.*, 1990, 1997; Kloepper *et al.*, 1980).

Anteriormente, los autores reportaron el papel inhibitorio de la cepa ZUM80 de *Pseudomonas fluorescens* hacia los patógenos *Erwinia carotovora* y *Ralstonia solanacearum* (antes clasificada dentro del género *Pseudomonas*) (Farías-Rodríguez *et al.*, 1997). Estudios recientes mostraron que la misma cepa ZUM80, logra inhibir el crecimiento del hongo *Fusarium oxysporum* (Valencia-Cantero *et al.*, 2005). Dicha cepa ZUM80 de *P. fluorescens*, inhibe el crecimiento del fitopatógeno en condiciones limitantes de hierro. De forma interesante, se observó que la mutante Sid⁻, aún en condiciones donde el hierro no era una limitante, seguía mostrando actividad antagonista hacia dicho patógeno (Valencia-Cantero *et al.*, 2005). Los resultados sugirieron que probablemente algún otro metabolito, no regulado por hierro, podía inhibir el crecimiento de *F. oxysporum*.

En este trabajo, se reporta que la capacidad antagonista de la cepa ZUM80 de *P. fluorescens* es diversa, ya que suprimió significativamente el crecimiento de los patógenos de frijol *Colletotrichum lindemuthianum* y de aguacate *Colletotrichum gloesporioides* y *Phytophthora cinnamomi* (Araya, 2003; Pegg *et al.*, 1982). Una mutante de la cepa

ZUM80 Sid⁻, carente de la síntesis de sideróforos, no logró restringir el crecimiento de los tres patógenos analizados. Adicionalmente, el uso de un concentrado de sideróforos mostró actividad antifúngica hacia *C. lindemuthianum* y *C. gloesporioides* restringiendo su crecimiento de manera significativa en condiciones limitantes de hierro. Por el contrario, al adicionar hierro al medio, el efecto inhibitorio se perdió totalmente. Lo anterior sugiere que la actividad antifúngica por parte de los sideróforos de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 es regulada por hierro.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas Bacterianas

Se utilizó la cepa *Pseudomonas fluorescens* ZUM80, la cual fue aislada de la rizósfera de plantas de papa en Zamora Mich. México, y seleccionada por su alta capacidad de síntesis de sideróforos del tipo pseudobactina (Valencia-Cantero *et al.*, 2005). La cepa mutante Sid⁻ (incapaz de sintetizar sideróforos) fue construida a partir de la cepa parental ZUM80, siendo caracterizada en un trabajo previo (Farías-Rodríguez *et al.*, 1997; Valencia-Cantero *et al.*, 2005). Ambas cepas fueron sembradas rutinariamente y mantenidas a 30 °C en medio King B agar (KB) (King *et al.*, 1954).

Hongos Patógenos

Los patógenos *Colletotrichum lindemuthianum*, *Colletotrichum gloesporioides* y *Phytophthora cinnamomi* fueron donados por el Laboratorio de Biotecnología vegetal del Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Los hongos fueron cultivados en medio KB sólido y sembrados cada quince días y conservados a 4 °C.

Pruebas de Antagonismo en Medio Sólido

Se realizaron experimentos de antagonismo *in vitro* en cajas petri con medio BK sólido con las cepas ZUM80 y Sid⁻ contra cada uno de los patógenos. Esta técnica ha sido previamente reportada por Filippi *et al.* (1984). Las cepas fueron inoculadas en forma de cruz y en cada cuadrante se inoculó una porción circular de 4 mm de diámetro del patógeno (crecido previamente). En un primer experimento se inocularon al mismo tiempo

y por separado las cepas ZUM80 y Sid⁻ con los hongos. En un segundo experimento se inocularon las cepas bacterianas con 24 h de anterioridad a los patógenos. Finalmente, en un tercer experimento se inocularon los hongos 24 h antes que las bacterias. Las mediciones del micelio de los patógenos se realizaron durante 24, 48 y 72 h de crecimiento a 30 °C. Cada experimento se realizó al menos en tres repeticiones de manera independiente.

Inducción de la Síntesis de Sideróforos

La síntesis de sideróforos de la cepa ZUM80 se realizó en medio líquido SM en frascos de 500 mL (Elad y Baker, 1985). Los cultivos se mantuvieron en agitación orbital durante 24 h a 30 °C. Posteriormente el medio fue centrifugado dos veces a 16 000 g durante 10 min para obtener el sobrenadante libre de células. La presencia de estos compuestos se determinó mediante un barrido a una longitud de onda desde 350 a 450 nm en un espectrofotómetro, siendo notable un pico de absorción a 408 nm. Se redujo el volumen del sobrenadante 10 veces y se centrifugó nuevamente para eliminar impurezas. Se determinó la concentración de los sideróforos, usando el valor máximo de absorción y el coeficiente de absorción molar ($\lambda_{\text{max}} = 400 \text{ nm}$ y $\epsilon = 20\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) de acuerdo al método de Meyer y Abdallah (1978).

Pruebas de Antagonismo de Medio Líquido

Los experimentos de antagonismo en medios de cultivo líquido se llevaron a cabo esterilizando el sobrenadante obtenido por filtración utilizando una membrana de 0.22 μm de diámetro de poro (Millipore). Posteriormente, el sobrenadante se transfirió a matraces erlenmeyer de 500 mL previamente esterilizados. La concentración final de los sideróforos fue de 20 μM . Simultáneamente, se inocularon las porciones circulares de 4 mm de diámetro de los patógenos correspondientes en cada matraz. Como control se utilizaron medios inoculados únicamente con los patógenos. En ciertos tratamientos se adicionaron 10 μM de FeCl_3 . La incubación se realizó a 30 °C durante 6 días en agitación. Al final de este periodo se determinó el peso seco del micelio de los hongos. Para el análisis estadístico se utilizó un diseño completamente aleatorio de tres a cinco repeticiones. La comparación de las medias se realizó a través de la prueba de Duncan con un α del 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad Antifúngica de *Pseudomonas fluorescens* ZUM 80

Se llevaron a cabo experimentos *in vitro* para conocer el efecto inhibitorio de la cepa ZUM80 contra los patógenos de plantas *Colletotrichum lindemuthianum*, *Colletotrichum gloesporioides* y *Phytophthora cinnamom*. Como se muestra en la Figura 1, el tiempo de inoculación fue importante para observar un alto grado de inhibición contra *C. lindemuthianum*. El mayor grado de inhibición se observó en el tratamiento donde se inoculó la cepa ZUM80 con 24 h de anterioridad a *C. lindemuthianum* (76%), no así cuando se inocularon simultáneamente (30%) o 24 h después (28%). Para el patógeno *C. gloesporioides* se observó un patrón similar, ya que al inocularlo 24 h después de la cepa bacteriana su crecimiento se restringió hasta en un 72% (Figura 2). El crecimiento del micelio de *P. cinnamomi* fue de igual manera inhibido hasta en un 70% cuando fue inoculado 24 h después a la cepa bacteriana. Fue interesante notar que al inocular *P. cinnamomi* 24 h antes que *P. fluorescens*, la inhibición fue totalmente nula (Figura 3).

El observar altos porcentajes de inhibición cuando *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 fue inoculada con 24 horas de anterioridad a los patógenos, sugiere que las bacterias necesitan tiempo para sintetizar los metabolitos secundarios que causan la inhibición. En el caso de la síntesis de compuestos como los sideróforos, es conocido que son sintetizados principalmente en etapas exponenciales de crecimiento, siendo la fase donde la población requiere más nutrientes para la división celular (O'Sullivan y O'Gara, 1992). La alta constante de estabilidad ($\text{pK}_a = 29$) para el complejo pseudobactina-Fe (Chen *et al.*, 1994) provoca que virtualmente toda molécula de pseudobactina excretada se una al Fe presente en el medio, este complejo actúa como sistema de suministro de Fe (III) para la bacteria al ser introducido en la célula bacteriana (Koster *et al.*, 1995; Loper y Henkels, 1999; Jurkevich *et al.*, 1992). Por lo tanto, en microambientes como la rizósfera, la síntesis de sideróforos es importante para conferir una ventaja competitiva por nutrientes y espacios (Loper y Henkels, 1999), y por exclusión, restringir el crecimiento de organismos dañinos a las plantas (Farías-Rodríguez *et al.*, 1990). Esta hipótesis concuerda con otros trabajos, donde se sugiere que las *Pseudomonas* inhiben

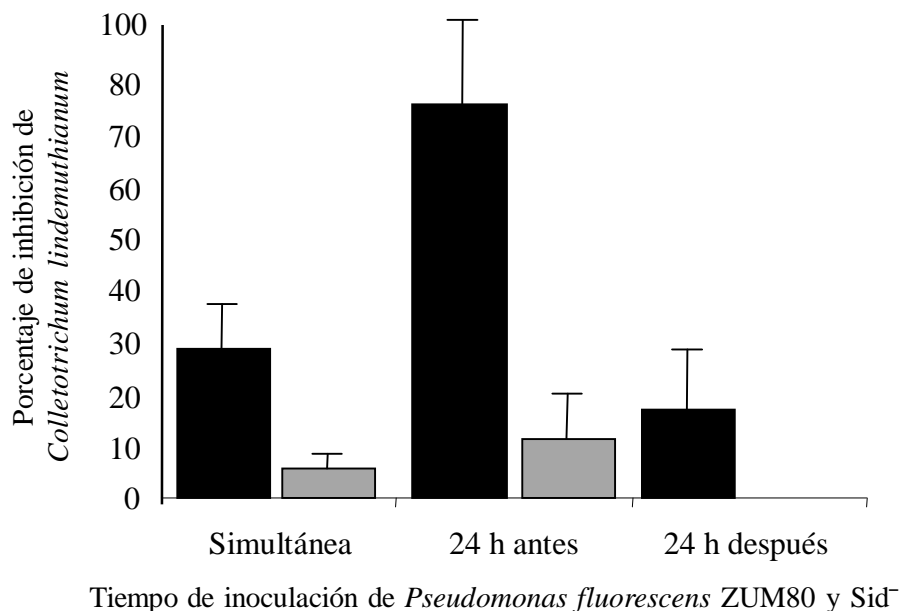


Figura 1. Inhibición del crecimiento del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* por parte de la cepas *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 (barras negras) y Sid⁻ (barras grises). Los valores representan el promedio de al menos tres repeticiones independientes con respecto al control donde se inoculó únicamente el patógeno. T = desviación estándar. Las mediciones del diámetro del micelio se realizaron a las 72 h de incubación a 30 °C.

el crecimiento de patógenos mediante este mecanismo (O'Sullivan y O'Gara, 1992; Farías-Rodríguez *et al.*, 1997; Sharma y Johri, 2003; Renault *et al.*, 2007).

Por otro lado, un ligero efecto antagónico se observó por la cepa mutante Sid⁻ hacia los patógenos (Figuras

1, 2 y 3). Sin embargo, el efecto inhibitorio no fue estadísticamente diferente de cero. Lo anterior puede deberse a que las bacterias *Pseudomonas* sintetizan una gran variedad de compuestos con efectos antimicrobianos (Bangera y Tomashow, 1996; O'Sullivan

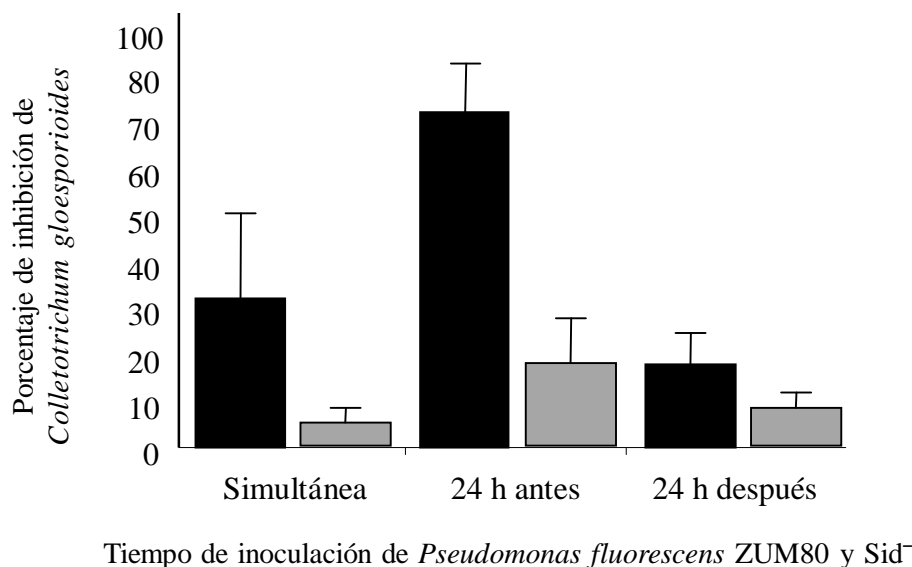


Figura 2. Inhibición del crecimiento del hongo *Colletotrichum gloesporioides* por la cepa *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 (barras negras) y Sid⁻ (barras grises). Los valores representan el promedio de al menos tres repeticiones independientes con respecto al control donde se inoculó únicamente el patógeno. T = desviación estándar. Las mediciones del diámetro del micelio se realizaron a las 72 h de incubación a 30 °C.

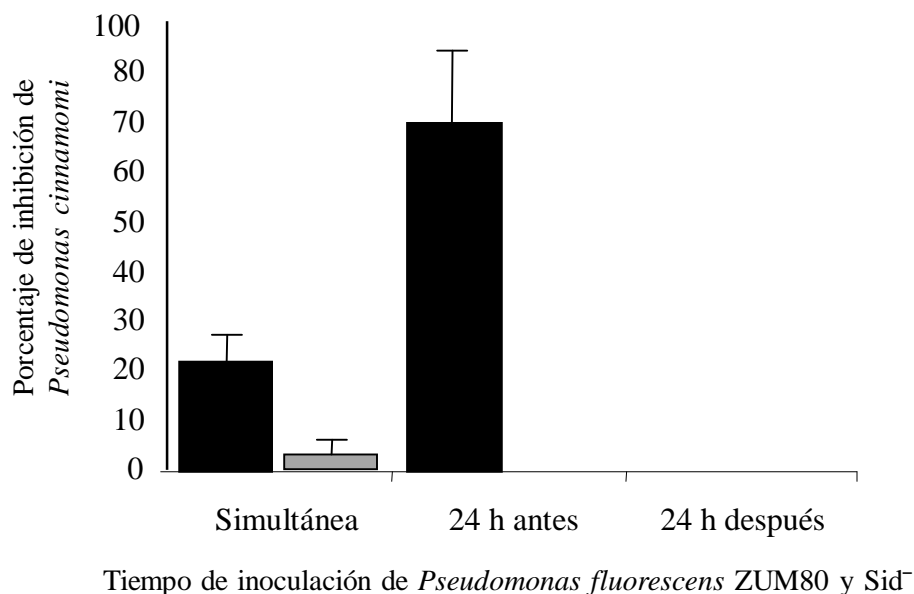


Figura 3. Inhibición del crecimiento del hongo *Pseudomonas cinnamomi* por parte de la cepa *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 (barras negras) y Sid⁻ (barras grises). Los valores representan el promedio de al menos tres repeticiones independientes con respecto al control donde se inoculó únicamente el patógeno. T = desviación estándar. Las mediciones del diámetro del micelio se realizaron a las 72 h de incubación a 30 °C.

y O’Gara, 1992). Esto sugiere que algún otro compuesto, también posiblemente sintetizado por la cepa ZUM80, puede mostrar cierta actividad antifúngica hacia los fitopatógenos analizados en este estudio. Por otra parte, Valencia-Cantero y colaboradores (2005) reportaron que mutantes Sid⁻ de ZUM 80 mostraron actividad inhibitoria contra *Fusarium oxysporum*, no obstante en el presente trabajo no mostró la misma capacidad inhibitoria contra *C. lindemuthianum*, *C. gloesporioides* o *P. cinnamomi*. Es posible que la actividad de este metabolito(s), desconocido hasta el momento, sea patógeno-específico, en este sentido Lee y colaboradores (2003) reportan que *P. fluorescens* MM-B16, produce un antibiótico con una actividad diferencial sobre *Colletotrichum*, *Phytophthora* y *Fusarium*, de manera que las concentraciones medias inhibitorias para cada uno de los géneros de fitopatógenos varían hasta en un orden de magnitud.

Actividad Antagónica de los Sideróforos

Este ensayo tuvo el propósito de conocer el efecto de los sideróforos en el crecimiento de los patógenos en medios de cultivo líquidos. Los resultados de estos experimentos muestran que al adicionar el concentrado de los sideróforos existe un efecto inhibitorio

en el crecimiento del micelio de los tres fitopatógenos analizados (Cuadro 1). Sin embargo, sólo se observaron diferencias significativas para los patógenos *C. lindemuthianum* y *C. gloesporioides*, aún cuando el grado de inhibición sobre estos patógenos fue menor comparado con el ejercido sobre *P. cinnamomi* el cual tuvo una variación experimental considerablemente mayor (± 22 mg) comparado con los tratamientos con *C. lindemuthianum* y *C. gloesporioides* (± 10 , ± 8 mg respectivamente). Al adicionar hierro al medio de cultivo se incrementó notablemente el crecimiento de los patógenos, además de que la actividad antifúngica se perdió por completo (Cuadro 1). Estos resultados están en concordancia con lo reportado por De la Rosa-García y colaboradores (2007) que encuentran que de sus 46 aislados bacterianos con capacidad antimicrobiana, el 86% producen sideróforos, el 30% disminuye su capacidad inhibitoria en presencia de FeCl₃ y el 13% pierden completamente el efecto antimicrobiano al adicionar el metal.

El hierro del suelo es captado por los sideróforos, los cuales actúan como sistemas de transporte del elemento hacia las bacterias y lo hacen al mismo tiempo menos disponible para los patógenos (Silver y Walderhaug, 1992). Se ha demostrado que mediante este mecanismo los sideróforos restringen el crecimiento

Cuadro 1. Efecto de los sideróforos sobre el crecimiento de algunos fitopatógenos.

Fitopatógeno	Control	+ Sideróforos	+ Sideróforos + Fe	% de inhibición
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	230	177	276*	13
<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	268	222	250*	17
<i>Pseudomonas cinnamomi</i>	149	119	180*	20

Los resultados muestran la media del peso seco del micelio de los patógenos en mg. En el tratamiento control se inocularon los patógenos sin sideróforos o hierro. El porcentaje de inhibición es mostrado por el factor sideróforos respecto al control. Los asteriscos muestran diferencias significativas respecto al tratamiento control ($\alpha = 0.05$).

de microorganismos que causan enfermedades en plantas (Haas y Keel, 2003; Weller *et al.*, 2002; Validov *et al.*, 2005). En cultivos líquidos, los sideróforos logran tener un efecto inhibitorio en el crecimiento del micelio de los tres patógenos analizados (Cuadro 1); efecto que se pierde al adicionar hierro en los cultivos, por lo que al igual que De la Rosa-García y colaboradores (2007), se puede inferir que dicho metal es el elemento regulador de la actividad antifúngica. El crecimiento de los patógenos observado en los tratamientos donde se adicionó hierro, sugiere que la cantidad de sideróforos adicionada al medio no fue el suficiente para capturar el hierro disponible, y por lo tanto, el restante del elemento es utilizado por los patógenos. Estos resultados concuerdan con lo encontrados por Ambrosi y colaboradores (2000), donde observaron que el grado de inhibición del patógeno *Erwinia carotovora* estaba relacionado con la cantidad de sideróforos producidos por la cepa B10 de *Pseudomonas*.

Es interesante notar que los porcentajes de inhibición en cultivos líquidos fueron similares a los experimentos en cultivos sólidos donde se inocularon los patógenos y la cepa bacteriana simultáneamente (Figuras 1, 2, 3). Esto indica que existe una relación entre el tiempo de adición de los sideróforos y el grado de antagonismo, similar a los experimentos en cultivos sólidos. Estos resultados sugieren un estudio más detallado sobre la síntesis de sideróforos y la competencia por el hierro en ambientes como la rizósfera. La cantidad inhibitoria del sideróforo es un aspecto de gran interés, Crowley (2006) señala que la concentración de sideróforos en los suelos rizosféricos puede variar entre 0.3 y 3 μM , pero que en micronichos colonizados por bacterias productoras de sideróforos puede incrementarse en varios órdenes de magnitud. Por tal motivo, se recomienda estudiar en mayor detalle este factor en futuros experimentos.

Actualmente, el problema del empleo de pesticidas para usos agrícolas sigue sin resolverse, algunas alternativas planteadas son el uso de plantas transgénicas

resistentes a diversos patógenos, que sin embargo cae en la controversia del uso de dichas plantas y sus frutos para consumo humano. Otra alternativa es el uso de bacterias productoras de sideróforos como agentes de biocontrol, campo en el que se siguen invirtiendo grandes esfuerzos (De la Rosa-García *et al.*, 2007; Renault *et al.*, 2007) y es en este sentido en donde se circunscribe el presente trabajo. En conclusión, los resultados obtenidos muestran que *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 inhibe a los fitopatógenos *C. lindemuthianum*, *C. gloesporioides* y *P. cinnamomi* mediante un mecanismo que involucra la producción de sideróforos, y además señalan que las *Pseudomonas* son una buena opción de control biológico de patógenos de plantas que podría ayudar a disminuir el uso de químicos en cultivos agrícolas, además de evitar daños al medio ambiente y graves pérdidas económicas.

CONCLUSIONES

- Los sideróforos producidos por la bacteria *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 participan en la inhibición del crecimiento de los patógenos de plantas *Colletotrichum lindemuthianum*, *Colletotrichum gloesporioides* y *Phytophthora cinnamomi*.
- El mayor grado de inhibición en el crecimiento del micelio de los patógenos se observó cuando la cepa ZUM80 se inoculó 24 h antes que los hongos.
- Una cepa incapaz de sintetizar sideróforos (ZUM80 Sid⁻) no logró inhibir significativamente el crecimiento de los patógenos analizados.
- Utilizar un concentrado de sideróforos presenta una alternativa para inhibir el crecimiento de los patógenos, en especial contra *Colletotrichum lindemuthianum* y *Colletotrichum gloesporioides*.
- Es probable que el hierro participe como elemento regulador en la actividad inhibitoria de los sideróforos.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a los revisores anónimos por los comentarios y sugerencias que en gran medida lograron mejorar el escrito. G. S. agradece a la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana, al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología de Michoacán y al PROMEP-SEP, por financiar parcialmente el trabajo en nuestro laboratorio.

LITERATURA CITADA

- Ambrosi, C., L. Leoni, L. Putigani, N. Orsi, and P. Visca. 2000. Pseudobactin biogenesis in the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas* strain b10: identification and functional analysis of the L-Ornithine N⁵-Oxygenase (*psbA*) gene. *J. Bacteriol.* 182: 6233-6238.
- Araya, C. M. 2003. Coevolución de interacciones hospedante-patógeno en frijol común. *Fitopatol. Bras.* 28: 221-228.
- Bangera, M. G. and L. S. Tomashow. 1996. Characterization of a genomic locus required for synthesis of the antibiotic 2,4-diacetylphloglucinol by the biological control agent of *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *Mol. Plant Microbe Interact.* 9: 83-90.
- Bano, N. and J. Musarrat. 2003. Characterization of a new *Pseudomonas aeruginosa* strain NJ-15 as a potential biocontrol agent. *Curr. Microbiol.* 46: 324-328.
- Burkhead, K. D., D. A. Schisler, and P. J. Slininger. 1994. Pyrrolnitrin production by biological control agent *Pseudomonas cepacia* B37w in culture and in colonized wounds of potatoes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2031-2039.
- Chen, Y., E. Jurkevitch, E. Bar-Ness, and Y. Hadar. 1994. Stability constants of pseudobactin complexes with transition metals. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 58: 390-396.
- Crowley, D. E. 2006. Microbial siderophores in the plant rhizosphere. pp. 169-198. *In: Barton, L. L. and Abadía, J. (Eds). Iron Nutrition in plants and rhizospheric microorganisms.* Springer. Dordrecht, The Netherlands.
- De la Rosa-García, S. C., A. A. Muñoz-García, L. F. Barahona-Pérez, and M. M. Gamboa-Angulo. 2007. Antimicrobial properties of moderately halotolerant bacteria from cenotes of the Yucatán peninsula. *Lett. Appl. Microbiol.* 45: 289-294.
- Elad, Y. A. and R. Baker. 1985. Influence of trace amounts of cations and siderophore-producing pseudomonads on clamydospore germination of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 75: 1047-1052.
- Farías-Rodríguez, R., E. Soriano y C. Cervantes. 1990. Los sideróforos microbianos y su influencia en el desarrollo vegetal. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 56: 662-676.
- Farías-Rodríguez, R., E. Zamora y J. J. Peña-Cabriales. 1997. *Pseudomonas* fluorescentes como agentes de control de bacterias patógenas de plantas: II. Inoculación en planta. *Terra* 15: 391-396.
- Filippi, C., G. Bagnoli, G. Treggi, and G. Picci. 1984. Antagonistic effects of soil bacteria on *Fusarium oxysporum*. Schlecht f. sp. *Dianthii* (Print and Del.) Syd. and Hans. I. *In vitro* experiments and preliminary assays on Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Plant Soil* 80: 119-125.
- Gardner, J. M., J. L. Chandler, and A. W. Feldman. 1984. Growth promotion and inhibition by antibiotics producing fluorescent *Pseudomonads* on citrus root. *Plant Soil* 77: 103-113.
- Haas, D. and C. Keel. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41: 117-153.
- Johri, B. N., C. Rao, and R. Goel. 1997. Fluorescent *pseudomonas* in plant disease management. pp. 193-221. *In: K. R. Dadarwal (ed.). Biotechnological approaches in soil microorganism for sustainable crop production.* Scientific Publishers. Jodhpur, India.
- Jurkevitch, E., Y. Hadar, and Y. Chen. 1992. Differential siderophore utilization and iron uptake by soil and rhizosphere bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 119-124.
- Kah, M. and C. D. Brown. 2006. Adsorption of ionizable pesticides in soils. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 188: 149-217.
- King, E. O., M. K. Ward, and D. E. Raney. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44: 301-307.
- Kloepper, J. W., J. Leong, M. Teintze, and M. N. Schroth. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* 286: 885-886.
- Koster, M., W. Ova, W. Bitter, and P. Weisbeek. 1995. Multiple outer membrane receptors for uptake of ferric pseudobactins in *Pseudomonas putida* WCS358. *Mol. Gen. Genet.* 248: 735-743.
- Lee, J. Y., S. S. Moon, and B. K. Hwang. 2003. Isolation and antifungal and antioomycete activities of aerugine produced by *Pseudomonas fluorescens* strain MM-B16. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2023-2031.
- Loper, J. E. and M. N. Schroth. 1986. Importance of siderophores in microbial interactions in the rhizosphere. pp. 77-84. *In: T. R. Swinburne (ed.). Iron, siderophores and plant diseases.* Plenum Press. New York, NY, USA.
- Loper, J. E. and M. D. Henkels. 1999. Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 5357-5363.
- Meyer, J. M. and M. A. Abdallah. 1978. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *J. Gen. Microbiol.* 107: 319-328.
- O'Sullivan, D. J. and F. O'Gara. 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.* 56: 662-676.
- Paulsen, I. T., C. M. Press, J. Ravel, D. Y. Kobayashi, G. S. Myers, D. V. Mavrodi, R. T. DeBoy, R. Seshadri, Q. Ren, R. Madupu, R. J. Dodson, A. S. Durkin, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, S. A. Sullivan, M. J. Rosovitz, M. L. Gwinn, L. Zhou, D. J. Schneider, S. W. Cartinhour, W. C. Nelson, J. Weidman, K. Watkins, K. Tran, H. Khouri, E. A. Pierson, L. S. Pierson, L. S. Thomashow, and J. E. Loper. 2005. Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nature Biotechnol.* 23: 873-878.
- Pegg, K. H., L. I. Forsberg, and A. W. Whaley. 1982. Avocado root rot. *Queensland Agric. J.* 108: 162-168.
- Powell, K. A., J. L. Faull, and A. Renwick. 1990. The commercial and regulatory challenge. pp. 445-463. *In: D. Horny (ed.). Biological Control of Soilborne Plant Pathogens.* CAB International. Wallingford, UK.

- Renault, D., F. Déniel, E. Benizri, D. Sohier, G. Barbier, and P. Rey. 2007. Characterization of *Bacillus* and *Pseudomonas* strains with suppressive traits isolated from tomato hydroponic-slow filtration unit. *Can. J. Microbiol.* 53: 784-797.
- Sharma, A. and B. N. Johri. 2003. Growth promoting influence of siderophore-producing *Pseudomonas* strains GRP3A and PRS9 in maize (*Zea mays* L.) under iron limiting conditions. *Microbiol. Res.* 158: 243-248.
- Silver, S. and M. Walderhaug. 1992. Gene regulation of plasmid- and chromosome-determined inorganic iron transport in bacteria. *Microbiol. Rev.* 56: 195-228.
- Sutra, L., J. M. Risede, and L. Gardan. 2000. Isolation of fluorescent pseudomonads from rhizosphere of banana plants antagonistic towards root necrosing fungi. *Lett. Appl. Microbiol.* 31: 289-293.
- Valencia-Cantero, E., J. Villegas-Moreno, J. M. Sánchez-Yáñez, J. J. Peña-Cabriales y R. Farías-Rodríguez. 2005. Inhibición de *Fusarium oxysporum* por cepas mutantes de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 incapaces de producir sideróforos. *Terra Latinoamericana* 23: 81-88.
- Validov, S., O Mavrodi, L. De La Fuente, A. Boronin, D. Weller, L. Thomashow, and D. Mavrodi. 2005. Antagonistic activity among 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* 242: 249-256.
- Weller, D. M., J. M. Raaijmakers, B. B. Gardener, and L. S. Thomashow. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40: 309-48.