

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS DE PAPA ASOCIADAS CON SÍNTOMAS DE PUNTA MORADA

MARÍA ISABEL NOTARIO ZACARÍAS

TESIS

Presentada como requisito parcial

para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias
en Parasitología Agrícola



Universidad Autónoma Agraria
"Antonio Narro"
PROGRAMA DE GRADUADOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Octubre de 2009

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"**

DIRECCIÓN DE POSTGRADO

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS DE PAPA ASOCIADAS
CON SÍNTOMAS DE PUNTA MORADA**

TESIS

POR

MARÍA ISABEL NOTARIO ZACARÍAS

**ELABORADA BAJO LA SUPERVISIÓN DEL COMITÉ PARTICULAR DE ASESORÍA Y
APROBADA COMO REQUISITO PARCIAL, PARA OPTAR AL GRADO DE:**

**Maestro en Ciencias
en Parasitología Agrícola**

Comité Particular:

Asesor principal

Dr. Alberto Flores Olivas

Asesor

Dr. Gabriel Gallegos Morales

Asesor

Dr. Oswaldo García Martínez

Asesor

Dr. Víctor Olalde Portugal

**Dr. Jerónimo Landeros Flores
Director de Postgrado**

Buenavista, Saltillo, Coahuila, Octubre de 2009

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sincera y fervientemente:

A la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro" por otorgarme la oportunidad de fortalecer mi formación profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme apoyo económico durante el transcurso de estudios en maestría.

Al Dr. Víctor Olalde Portugal por fungir como un pilar en los aspectos concernientes al procedimiento y culminación del proyecto.

A Horacio Claudio Morales Torres por su valioso apoyo, recibidos en las distintas etapas del este trabajo.

A la M.C. Rosalinda Serrato Flores por su asesoría y colaboración en diversos procedimientos implementados en este proyecto.

Al Dr. Alberto Flores Olivas por su atención y ayuda recibidos, y a su ímpetu por tornar mi formación como fitopatóloga.

A el Dr. Jerónimo Landeros Flores, Dr. Melchor Cepeda Siller, Dr. Oswaldo García Martínez, Dr. Gabriel Gallegos Morales, M.C. César Estrada Torres, M.C. Antonio Cárdenas Elizondo.

A Juan Octavio Chirino Romero, Hugo Rosales Bravo, Irving Aarón Alemán Navarro, Blanca Estela Mares Fermín, Desiré Dávila Medina, Humberto Torres, Daniel, Sra. Alicia, Julieta Mireles, Claudio Ríos, Luis Patricio, Sarita, Marisol, Juanita, Yolanda, Gloria León Martínez y Susana Gómez, por su amistad y apoyo manifestados en diversas ocasiones y procedimientos implementados en el presente trabajo.

Y por último, pero no menos importante; a Dios, porque mediante sus diversos medios y seres deíficos, culminé algo, prácticamente, dado por perdido...

DEDICATORIA

A mis padres:

Sara Zacarías Zacarías

Ángel Notario Alejo

Porque a pesar de estar lejos físicamente por tanto tiempo, a cada momento siento su cálido amor cubriéndome y protegiéndome de adversidades... -mamá, papá...los quiero mucho y les dedico este pequeño trabajo como ofrenda al inmenso amor que me brindan día con día...

A mis hermanos: Beatriz Adriana y Miguel Ángel y, mis sobrinos Miguel Ángel y Daniel Isidro.

A Horacio Claudio Morales Torres, por haber iluminado mi sendero con su cariño y amistad, por su apoyo incondicional, por compartir conmigo los momentos más felices en mi estancia en Irapuato y de los mejores en mi vida...

A Juan Octavio Chirino Romero, Arq. Evelio Garza Alcalá, Don Eduardo Hernández y Dña. Marta, y respectivas familias por su amistad y ayuda servidas desde que los conocí...

A Hugo Rosales Bravo y seres queridos, por el múltiple apoyo y cariño recibidos cuando pasé por situaciones muy desfavorables en Irapuato.

COMPENDIO

Aislamiento y Caracterización de Bacterias Endófitas de Papa Asociadas con Síntomas de Punta Morada

POR

MARÍA ISABEL NOTARIO ZACARÍAS

**MAESTRÍA EN CIENCIAS
PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, OCTUBRE 2009**

Dr. Alberto Flores Olivas - Asesor-

Palabras Clave: Promoción de crecimiento, Antagonismo, Nicho ecológico.

El objetivo de este trabajo consiste en aislar y caracterizar bacterias endófitas presentes en plantas de papa enfermas de punta morada; para lo cual se propone crear medios de cultivo apropiados, realizar una caracterización microscópica, fisiológica y morfológica a las bacterias aisladas, así como una identificación molecular; además de realizar pruebas en invernadero y laboratorio para descubrir la funcionalidad de dichas bacterias en plantas hospederas.

Se identificaron y caracterizaron nueve cepas bacterianas endófitas de papa con sintomatología de punta morada; de los cuales ninguna resultó ser fitopatógena; seis de ellas muestran capacidad antagónica a agentes fitopatógenos, utilizan el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (precursor del etileno) como fuente de nitrógeno, cinco cepas promueven la generación de raíz, y dos producen sideróforos.

ABSTRACT

Isolation and Characterization of Endophytic Bacteria Associated with Purple Top Symptoms in Potato

BY

MARÍA ISABEL NOTARIO ZACARÍAS

MASTER IN SCIENCES
AGRICULTURAL PARASITHOLOGY

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, OCTUBRE 2009

Dr. Alberto Flores Olivas - Advisor-

Key words: Growth Promoting, Antagonism, Ecologic Niche.

The goal of this study is to isolate and characterize endophytic bacteria present in potato plant with purple tip symptoms; in order to do so, it is proposed: the development of appropriate culture media; the microscopic, physiologic and morphologic characterizations, and the molecular identification; also is important to make greenhouse and laboratory assays to define the effects of these bacteria in the host plants.

Were identified and characterized nine endophytic strains in potato plants with purple tip symptomatology; none of them resulted to be pathogenic; six showed antagonistic characteristics against phytopathogenic agents, used the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (the ethylene precursor) as nitrogen source; five strains promoted root generation; and two produced siderophores.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	PÁGINA
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	3
Importancia de la Papa	3
Papa: Bacterias Patógenas y Benéficas	4
Importancia de Bacterias Patógenas	4
Importancia de Bacterias Benéficas	5
Definición de Organismo Endofítico y Generalidades de Bacterias Endófitas	6
Evolución del Endofitismo en Bacterias	8
Nicho Endofítico de Bacterias	9
Asociación y Nutrición en la Planta	9
Componentes Morfológicos y Químicos del Nicho Endofítico	10
Biología de la Asociación Endofítica	11
Diversidad de Endofíticas y Hospederos	11
Producción de Metabolitos Secundarios en la Planta y Afectaciones en Hospederos	13
Utilidad Tecnológica de las Bacterias Endófitas	14
Agentes de Control Biológico	14
Crecimiento de Plantas	15
Proyecciones Tecnológicas Futuras para Bacterias Endófitas	16
Requerimiento de Cepas Endófitas para Explotaciones.....	16
Transformación Sucedánea o Paratransgénesis de Plantas	16
Fitorremediación de Polutantes	17
ASLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS DE PAPA ASOCIADAS CON SÍNTOMAS DE PUNTA MORADA	19
Abstract	19
Resumen	20
Introducción	20

Materiales y Métodos	21
Resultados	25
Discusión	30
Conclusiones	32
Agradecimientos	32
Literatura Citada	32
CONCLUSIONES GENERALES	36
RESUMEN	38
LITERATURA CITADA	39
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	vii
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x

ÍNDICE DE CUADROS

	PÁGINA
Cuadro 1. Valores de constantes de velocidad específica de crecimiento (μ) y capacidad portadora del medio (k) de los aislados endófitos de papa, generados en las cinéticas de crecimiento.....	27
Cuadro 2. Desarrollo colonial de nueve bacterias endófitas de papa en caldo de papa con seis concentraciones de dextrosa	28

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Tiempos de generación de nueve aislados bacterianos endófitos de papa con sintomatología de Punta Morada	27

INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum*L.) es uno de los alimentos principales a nivel mundial, debido a que permite la subsistencia de una gran cantidad de personas en todo el planeta; esto gracias al manejo agronómico de su cultivo, ya sea por propósitos comerciales o de autoconsumo (Secor, 2004). Asimismo, posee cualidades nutrimentales dignas de consideración en la ingesta humana, debido a su aporte valioso de vitaminas, minerales, proteínas, aminoácidos esenciales (Struik, 2006) y carbohidratos complejos (Secor, 2004; Struik, 2006). Además es un cultivo altamente eficiente en el uso de algunas fuentes tales como suelo y energía (Struik, 2006). Éstas constituyen algunas razones por lo cual es el cultivo dicotiledóneo de mayor importancia en el ámbito alimentario humano, viéndose superado únicamente en nivel de importancia por los cereales trigo, arroz y maíz (Hooker, 2001). Es por motivos de nutrición humana, seguridad alimentaria y economía nacional que su cultivo se reviste de importancia en los países en vías de desarrollo (Scott, 2002).

Por sus características botánicas, la papa es una planta incluida en la familia Solanaceae y, al igual que otras plantas de la misma familia, tiene problemas persistentes de importancia, y una porción de estos factores limitantes es originado por plagas (Struik, 2002), cuyos agentes etiológicos pertenecen a los grupos de organismos tales como algas, virus, bacterias, hongos, nematodos e insectos (Strange, 2005). Probablemente es la planta cultivable con incidencia de la mayor cantidad de enfermedades, superando a cualquier otro cultivo; así, si se consideran las principales enfermedades de la papa, las menores y aquellas de etiología desconocida, sobrepasaría a 100 enfermedades (Secor, 2004). Problemas asociados con la forma de reproducción utilizada: propagación clonal (Struik, 2006).

Además, recientemente numerosas enfermedades están siendo descubiertas o, al menos, su importancia esta revistiendo mayor fuerza debido a los intensos daños generados a últimas fechas (Secor, 2004). Tal es el caso de la enfermedad de punta morada (V. Borges, 1972; Leyva-López, 2002; Cadena-Hinojosa, 2003; Jones, 2005; Rubio-Covarrubias, 2006; Lee, 2006) la cual genera pérdidas considerables en varios países productores (Khadhair, 2003; Secor, 2004; Lee, 2004; Munyaneza, 2006; Munyaneza, 2007; Nasir, 2007; Girsova, 2008).

En México, se encuentra presente en las principales zonas productoras de papa, provocando una disminución substancial en el rendimiento y calidad del producto cosechado (Cadena-Hinojosa, 2003),

causando pérdidas que van desde 30 a 80 por ciento de la producción debido a la no-germinación de los tubérculos semilla junto con la pérdida de plantas después de la emergencia (Haverkort, 2007). Esta enfermedad es asociada principalmente a fitoplasmas (V. Borges, 1972; Leyva-López, 2002; Cadena-Hinojosa, 2003; Rubio-Covarrubias, 2006; Lee, 2006; Almeida-León, 2008), los cuales se caracterizan por ser bacterias de la clase Mollicutes, carentes de pared celular que habitan en los elementos cribosos del floema en plantas infectadas; las cuales exhiben una sintomatología que sugiere profundos disturbios en el balance normal de fitohormonas o reguladores de crecimiento (Lee, 2000; Maust, 2003), en la concentración y translocación de carbohidratos y aminoácidos (Lepka, 1999; Maust, 2003).

Los fitoplasmas son organismos que viven estrechamente asociados con sus hospederos, y su supervivencia depende estrictamente de dicha asociación (Welliver, 1999; Lee, 1986; Khadhair, 2003), debido a que su genoma manifestó la pérdida de muchos genes metabólicos importantes, tal como el gen ATP sintasa, y la formación de pseudogenes; debido al posible resultado de evolución reductora durante su adaptación a un ambiente rico en nutrientes (Shen, 1993; Kakizawa, 2006).

El interior de las plantas de papa también se encuentra habitado por una gran cantidad de bacterias, aún y cuando la planta manifiesta estar completamente sana (Hollis, 1951; De Boer, 1974; Sturz, 1995). Algunas de estas bacterias son promotoras de crecimiento y/o antagonistas de agentes fitopatógenos (Sessitsch, 2004); otras tantas son inocuas y simplemente no generan algún beneficio visible a la planta hospedera (Hollis, 1951; De Boer, 1974).

La importancia de lo anteriormente citado respecto a las bacterias asociadas a plantas recae en el entendimiento de su papel ecológico, de su interacción con la planta y; además, en la futura aplicación práctica de dichos conocimientos, tal es el caso del uso de control biológico contra fitopatógenos o hasta el aislamiento de compuestos bioactivos. Por tal razón, en este trabajo se pretende estudiar bacterias presentes en el interior de plantas de papa, enfermas con punta morada y descubrir la relación que pudieran tener con dicha sintomatología; razón por lo cual se expone el siguiente objetivo general: aislar y caracterizar bacterias endófitas presentes en plantas de papa enfermas de punta morada, desglosándose los siguientes objetivos particulares: (1) generar medios de cultivo naturales apropiados para el aislamiento de bacterias endófitas de plantas de papa; (2) caracterizar la morfología, fisiología y funcionalidad de las bacterias endófitas en su hospedero y, realizar una identificación molecular; (3) estudiar la capacidad de bacterias endófitas como promotoras de crecimiento de plantas hospederas, mediante pruebas *in vitro* e *in planta* y; (4) descartar la capacidad de las bacterias endófitas como patógenas de plantas hospederas.

REVISIÓN DE LITERATURA

Importancia de la Papa

La cuna de la papa se encuentra en América del Sur -donde se ubica la zona andina, que comprende los países de Perú, Ecuador, Bolivia y Chile- (FAO, 2008; CONPAPA, 2008); sin embargo los principales países productores de este cultivo alimenticio pertenecen a otros continentes; de donde China, Rusia, India, Estados Unidos, Alemania, Ucrania, Francia, Polonia, Países Bajos e Irán destacan en producción en el 2007; dejando a América del Sur con el nivel más bajo de producción de papa (menor de 16 millones de toneladas en el mismo año), donde los principales países productores son: Perú, Brasil, Argentina, Colombia, México, Chile, Bolivia, Venezuela, Ecuador, Guatemala y Cuba (FAO, 2008).

La presencia de papas silvestres en México indica que este país se encuentra en el área de origen de este tubérculo (Hijmans, 2001; FAO, 2008). En donde, en el decenio de 1960, su cultivo se limitaba a las zonas de secano situadas en las zonas volcánicas del centro de México, con una producción anual de 300,000 toneladas, y una productividad inferior a seis toneladas por hectárea. En los siguientes 20 años, la producción se extendió a las zonas comerciales de regadío del norte y occidente del país, donde la producción actual alcanza las 40 toneladas. Si bien la superficie dedicada a la producción de papa ha cambiado poco desde 1980, el rendimiento promedio casi se ha triplicado desde 1961 y, en 2007 hubo una cosecha extraordinaria de 1.75 millones de toneladas (FAO, 2008).

La papa es un alimento que se cultiva a lo largo de todo el año agrícola, producto que prácticamente se destina al consumo interno, ya que es poco lo que se exporta. La papa es una hortaliza multifacética en sus usos, los cuales pueden ser clasificados en cinco grandes rubros (CONPAPA, 2008), que son: 1) consumo doméstico y consumo animal en fresco; 2) en industria de alimentos donde predominan la producción de hojuelas o chips, bastones de papa pre-cocidas o para freír, puré, mayonesas, jaleas, etc. (CONPAPA, 2008; Scott, 2002); 3) industria química, en la cual se extrae alcohol para realizar: licores, esencias y aromas; 4) también es usada como pulpa de proteína, de la cual se puede extraer proteína líquida, proteína seca, agregados para piensos, forrajes, abonos, entre otros y; 5) como papa deshidratada conglutinante (CONPAPA, 2008; FAO, 2008).

Es necesario mencionar el problema de imagen del que es acreedor este tubérculo. Los consumidores consideran a la papa como un componente alimenticio insubstancial, que es la ración de alimento que contiene mucha grasa y alto contenido de carbohidratos; lo cual contribuye a la pandemia de la obesidad. Asimismo, se asocia con habilidades intelectuales limitadas (Struik, 2006).

No obstante, un aspecto que contradice lo anterior e importante de destacar es la composición química de la papa (Kaur & Mukerji, 2004), la cual contiene 72-75 por ciento de agua, 16-20 por ciento de almidón, 2-2.5 por ciento de proteínas, 1-1.8 por ciento de fibra y, 0.15 por ciento de ácidos grasos (FAO, 2008). Además, son abundantes en micronutrientes tales como vitamina C, contiene una cantidad moderada de hierro, pero el gran contenido de vitamina C fomenta la absorción de este mineral. Además, tiene vitaminas B1, B3 y B6, y otros minerales como potasio, fósforo y magnesio, así como folato, ácido pantoténico y riboflavina. También contiene antioxidantes alimentarios (FAO, 2008), aunque su composición puede variar dependiendo del cultivar que se trate (Ortiz, 2009).

Papa: Bacterias Patógenas y Benéficas

Existe una gran cantidad de bacterias asociadas a la papa y, la naturaleza de estos organismos suele ser muy variada; asimismo, cada organismo tiene funciones y capacidades muy particulares (De Boer, 1974; Long, 1988; Berg, 2005; Dandie, 2007; Yang, 2008). Sin embargo, para utilidad agronómica, estas bacterias pueden ser agrupadas en dos grandes categorías: la primera incluye a aquellas que generan una enfermedad o disminución de vitalidad en la planta con la cual se asocian, llamadas patógenas (Long, 1988) y; la segunda integra a aquellas cuya relación genera un beneficio, implicando en la mejora de calidad y rendimiento del cultivo, denominadas benéficas (Sziderics, 2007).

Importancia de Bacterias Patógenas

A continuación se citan las principales bacterias fitopatógenas que atacan el cultivo de la papa, también se presenta una breve reseña de la sintomatología que generan en plantas afectadas.

- Pierna negra y pudrición blanda. Es causado por *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Jones). En plantas relativamente pequeñas, las hojas se tornan amarillas y se enrollan hacia arriba. Las plantas tienden a ponerse de forma vertical. La primera porción subterránea del tallo se torna negra, conforme la enfermedad progresa el color negro avanza varios centímetros hacia arriba del tallo, tornándose

delgado. Plantas severamente afectadas se marchitan y mueren. La enfermedad también progresa hacia abajo a través de los estolones y dentro de los tubérculos. En condiciones húmedas, los tubérculos se pudren rápidamente, ocasionando la desintegración total del tejido (Kaur & Mukerji, 2004).

- Pudrición de anillo. Es ocasionado por *Corynebacterium sepedonicum* (Speck & Kotth) Skapt & Burkh. Se reconoce por el marchitamiento del follaje y pudrición del anillo vascular de los tubérculos. La planta presenta una clorosis, las hojas se tornan de color café marginal y se marchitan. En los tubérculos se detecta una decoloración amarillo-claro de los elementos vasculares, los cuales exudan un flujo celular cuando el tubérculo es oprimido (Kaur & Mukerji, 2004).

- Pudrición café de la raíz. Es causado por *Ralstonia solanacearum*. El síntoma característico es el marchitamiento repentino de las plantas. Las papas cosechadas pueden no manifestar síntomas externos. Sin embargo, en general, los tubérculos infectados presentan decoloración café en la región vascular, en los cuales, sólo basta ejercer una ligera presión para generar un flujo bacteriano a partir de la región vascular. En etapas avanzadas, frecuentemente, se observan masas de flujo bacteriano fuera de los tubérculos (Kaur & Mukerji, 2004).

- Sarna común. Es causada por el actinomiceto *Streptomyces scabies* (Thaxter) Lambert & Loria. Se reconoce por áreas ligeramente levantadas o lesiones ásperas, tejido de acorchado, en el tubérculo. Su superficie entera se ve envuelta. Se presentan lesiones superficiales y profundas en el tubérculo. En la costra superficial, los tubérculos muestran ligeras áreas rugosas, elevadas y a menudo ligeramente debajo del plano de la piel sana. Las lesiones consisten de tejido acorchado, el cual se genera de una proliferación anormal de células en la peridermis del tubérculo debido al ataque del patógeno. En la costra de minas profundas, las lesiones miden 1-3 mm o más en profundidad y son más oscuras que las lesiones de la costra superficial. Son acorchadas y pueden unirse hasta afectar la superficie total del tubérculo (Kaur & Mukerji, 2004).

Importancia de Bacterias Benéficas

La rizósfera comprende el volumen de suelo que rodea las raíces, misma porción que es influenciada química, física y biológicamente por la raíz de la planta. Es un hábitat favorable para la proliferación de microorganismos y ejerce un impacto potencial en la salud de la planta y fertilidad del suelo (Manoharachary, 2006). Los exudados de la raíz son compuestos ricos en aminoácidos,

monosacáridos y ácidos orgánicos, los cuales sirven como fuente principal de alimento y mantienen el crecimiento dinámico y actividad de varios microorganismos dentro de las inmediaciones de las raíces. Estos organismos colonizadores de raíz pueden ser de vida libre, parásitos o sapófitos y, su diversidad continúa dinámica, permitiendo un cambio frecuente en la estructura de la comunidad y abundancia de especies (Singh, 2006). Un grupo importante de estas comunidades microbianas, que ejercen efectos benéficos en el crecimiento de plantas sobre la colonización de la raíz, fueron llamadas rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas (PGPRs). El crecimiento acrecentado de la planta por PGPRs es cuantificado como un incremento en la emergencia de plántulas, vigor, biomasa, proliferación de sistema radicular y rendimiento en varias especies de plantas. Desde su reconocimiento como una sub-serie de microorganismos colonizadores de raíz, en las pasadas décadas se condujeron varios estudios dirigidos a identificar las PGPRs en diferentes sistemas de cultivo y zonas agroecológicas (Vessey, 2003). De este modo, los resultados obtenidos generaron la liberación de algunas razas bacterianas para propósitos comerciales, adquiriendo, así, atención como un grupo de bacterias benéficas importante en la agricultura junto con bacterias fijadoras de nitrógeno (Podile & Kishore, 2007).

Definición de Organismo Endofítico y Generalidades de Bacterias Endófitas

Existe una heterogeneidad muy alta en el manejo dado al concepto "endófito", lo cual genera información biológica y ecológica muy diversa de organismos endófitos. Frecuentemente, los términos "endófita" y "endofítica" son usados con particular significado para dirigirse a grupos particulares de hospederos y microbios; sin embargo, investigadores que trabajan con distintos grupos de organismos (infecciones asintomáticas de hongos y bacterias que viven dentro de plantas) aplican estos términos para diferentes sistemas, generando confusión y controversia (Stone, 2000). Es así como la aplicación contemporánea del término no siempre es consistente o aceptada entre todos los investigadores, aunque comúnmente usan el término dirigiéndose a microbios capaces de no generar sintomatología en tejido de plantas aparentemente sanas (Hallmann, 1997).

Los conceptos que se tienen de endofitismo han variado en el grado de inclusión en función de, si las interacciones entre organismos o ecología descriptiva de ensamble de endófitas fueron enfatizados y, si la metodología de investigación fue principalmente histológica o basada en aislamientos de cultivos (Stone, 2000).

Investigadores con un enfoque principalmente de organismo hacen intentos para caracterizar endófitas en términos de atributos ecológicos y fisiológicos particulares; con frecuencia enfatizan en aspectos de especificidad y adaptación hospedera. Alternativamente, investigadores, quienes su principal interés radica en la ecología descriptiva, estudios de biodiversidad, o análisis de comunidad en términos generales, incluyen a todos los microbios encontrados; habitando tejido del hospedero (Stone, 2000), a menudo incluyen saprófitos y especies relacionadas con organismos fitopatógenos como patógenos latentes, quiescentes u oportunistas entre listados de endófitas (Sturz, 2000).

Entre las definiciones propuestas para el término endófitas están "microorganismos que viven en el interior de plantas sin causar efectos patogénicos inmediatos en su hospedero"(Reiter, 2002; Bacon & Hinton, 2007). Esta definición virtualmente incluye el espectro entero de organismos tales como hongos, microbios procariontes: bacterias y algas verde-azules; o plantas vasculares endófitas (Stone, 2000); sin embargo, no contempla el espectro entero de interacciones simbióticas donde estos organismos y plantas participan: parasitismo, comensalismo y mutualismo (Bills, 1996).

Una definición más inclusiva de "endófitas", además de destacar la sintomatología de la infección en los hospederos sin limitar el término a cualquier grupo particular de organismos, debe considerar a los patógenos latentes e inactivos, ya que éstos son endófitas como lo son los microbios mutualistas y comensales benignos (Stone, 2000).

Algunos investigadores consideran al término "endófitas" puramente topográfico, de tal modo que: "las endófitas colonizan asintóticamente los tejidos internos vivos de sus hospederos, aún cuando pueden, después de un periodo de incubación o latencia, causar enfermedad" (Sturz 2000; Stone, 2000).

Una bacteria endófitas es definida básicamente como un microorganismo que vive formando una asociación de carácter biotrófico intercelular asintomático con plantas (Hallmann, 1997). Las bacterias endófitas son diferenciadas de visitantes transitorios que forman asociaciones con la planta como casualidades, que no sobreviven mucho tiempo. Las bacterias endófitas incluyen a las bacterias intercelulares que imparten un beneficio ecológico sin hacer daño substancial a la planta. Inherente a la definición de bacteria endófitas está el concepto de asintomático, no-productora de síntoma de enfermedad, que resulta en una serie de interacciones en la gama de sin efectos sobre los hospederos (neutralismo), beneficios a los hospederos y bacteria (mutualismo) o, beneficiar solo a un miembro (comensalismo) (Bacon & Hinton, 2007).

Las bacterias endófitas colonizan un gran número de plantas, no obstante, por razón de no provocar síntomas, estos organismos no pueden ser detectados, de no ser por su aislamiento a partir de la superficie esterilizada de plantas colocadas en agar bacteriológico; mismo procedimiento que dificulta generar un estimado válido del número de bacterias endófitas y sus funciones en la planta (Bacon & Hinton, 2007).

Las bacterias endófitas colonizan activamente tejidos de plantas, establecen asociaciones a largo plazo, en realidad asociaciones naturales de toda la vida y, generalmente no son órgano-específicas. Así, pueden estar asociadas a raíces, hojas y tallos y, unas pocas a inflorescencia y frutos (Bacon & Hinton, 2007).

Evolución del Endofitismo en Bacterias

Las asociaciones biológicas de plantas han ocurrido con bacterias Gram positivas y Gram negativas, a pesar de sus principales diferencias en morfología celular y especializaciones bioquímicas, indicando los beneficios derivados de las asociaciones con plantas. Es más, filogenéticamente estas asociaciones han ocurrido en el grupo didermo y derivados y, en el grupo monodermo (referente a uno o dos membranas lipídicas envolviendo la célula, Gram positivo y negativo, respectivamente), siendo el primero, visto actualmente como el grupo más primitivo. No obstante, la mayoría de las especies endófitas se encuentran en el grupo de las bacterias monodermas, sugiriendo que las asociaciones endofíticas podrían ser un rasgo ancestral, en oposición, a lo visto *a priori*, de que es una característica evolutivamente derivada. Si en verdad la evolución de la bacteria ocurriera en una dirección progresiva en el tiempo, las bacterias endofíticas monodermas podrían no ser tan primitivas como la asociación sugiere, pues desde que los cambios ambientales han ocurrido sobre los periodos evolutivos sólo han permitido que éstas sobrevivan, viviendo en nichos protegidos tales como los espacios intercelulares de plantas (Bacon & Hinton, 2007). La incidencia de las bacterias endófitas, como vestigios de las formas primitivas, está reforzado por sus números bajos y, dentro de ellas, las cifras más abundantes pertenecen a los grupos de α -proteobacterias y β -proteobacterias, colocándolos en el margen principal de evolución (Gupta, 2002), por ejemplo especies de *Burkholderia* (McInroy & Kloepper, 1995). Sin embargo, esta conclusión esta basaba en el número total de bacterias cultivables. Otro estudio de bacterias no-aisladas de maíz, basado en el análisis del 16S ADNr extraído directamente de sus raíces, indicaron que el grupo *Proteobacteria* es el más grande, con la predominancia de las β -proteobacterias,

seguido por las α -proteobacterias y, las β -proteobacterias como el tercer grupo más abundante (Chelius & Tiplett, 2001).

Finalmente, el comportamiento fisiológico de las bacterias varía con el hospedero. Por ejemplo, existe información específica que indica diferencias en la fisiología de especies de bacterias endófitas cuando colonizan plantas silvestres en comparación con sus relacionadas cultivadas (Bacon & Hinton, 2007).

Entonces, existe una amplia serie de estrategias evolutivas en las bacterias endófitas, las cuales, debido a la diversidad observada, son difíciles de determinar; lo cual condujo a concluir que cada especie de bacterias ha evolucionado hacia el mejoramiento de su salud o sobrevivencia y, cada una podría no expresar una tendencia evolutiva de saprofitismo o parasitismo, y finalmente a endofitismo. Pudiendo resultar en la existencia de dos tipos generalmente diferentes, evolucionado y no evolucionado (Kobayashi & Palumbo, 2000).

Nicho Endofítico de Bacterias

Asociación y Nutrición en la Planta

Las bacterias endófitas son intercelulares (Bacon & Hinton, 2007; McCully, 2001), y pueden colonizar partes de las plantas exclusivamente bajo el suelo, encima del suelo o ambos. Sin embargo, las bacterias endófitas no son intercelulares exclusivamente, tienen alguna forma de asociación intracelular también, por ejemplo, habitan dentro de tejidos de xilema (Stone, 2000; Bacon & Hinton, 2007). Aunque el xilema es una fuente rica de nutrimentos, las endófitas que viven dentro de él son consideradas endófitas no ideales ya que tales vasos son no-funcionales y, esto es considerado un detrimento para la planta (McCully, 2001).

Las bacterias endófitas están asociadas con plantas como simbiontes biotróficos y, estas asociaciones pueden ser obligadas o facultativas; las cuales incluyen a miles de plantas hospederas, aunque algunas endófitas están restringidas a pocas familias de plantas. Algunas están asociadas únicamente con pastos, mientras otros son simbiontes con un amplio rango de especies de plantas, incluyendo tanto a monocotiledóneas como dicotiledóneas. La mayoría de los estudios sugiere que la infección intercelular se logra a través de roturas, taras o heridas de las raíces de plántulas durante la germinación o poco tiempo después de ésta, las cuales permanecen abiertas por varios días. Infecciones

aéreas pueden tomar lugar a través de las células guardas de los estomas y en otros poros naturales (Hallmann, 1997), pero tampoco están demostradas como entradas de infección natural (Bacon & Hinton, 2007). Sin embargo, las raíces inactivas no ofrecen la entrada casual a microbios (McCully, 2001). Como se trata de bacterias no patogénicas, existe muy poca probabilidad de que posean el arsenal de enzimas hidrolíticas que son usadas por organismos patógenos, para conseguir entrar a las raíces y hojas (Hallmann, 1997; Bacon & Hinton, 2007).

El beneficio que proporciona el hábitat interior de las plantas a las bacterias endófitas radica en que es un nicho protegido, en el cual hay relativamente poca competencia con otros organismos (Forchetti, 2007) y con una fuente de nutrimentos constante y confiable. De hecho, las exigencias alimenticias de las bacterias endófitas se han reportado como copiotróficas, lo cual es reforzado con datos que indican que los espacios intercelulares son en efecto ricos en nutrimentos orgánicos e inorgánicos capaces de sostener la concentración celular de bacterias observadas en plantas con infección endófitas (Bacon & Hinton, 2007).

Componentes Morfológicos y Químicos del Nicho Endofítico

Es importante saber cuáles son las características de los espacios intercelulares y qué sustancias están contenidas en él y así, poder entender la naturaleza de las interacciones que permiten existir a las bacterias endófitas en este nicho. Sin embargo, la naturaleza interactiva de los espacios intercelulares aún no está resuelta, opiniones modernas sugieren que es un área de las plantas muy importante y su naturaleza varía para cada especie (Bacon & Hinton, 2007).

De manera general, se puede decir que los espacios intercelulares consisten de una serie de componentes no vivientes conectados en la planta, referida como apoplasto, el cual es distinto del contenido celular, referido como el simplasto. Los espacios intercelulares están localizados en el tejido cortical de la raíz y en el tejido parenquimatoso de las hojas. Los espacios intercelulares están formados por la yuxtaposición de tres a cuatro células y la disolución de la lamela media, diferenciándose significativamente en hojas y tallos con respecto de las raíces. El volumen ocupado por espacios intercelulares consiste de una porción significativa del eje de la planta y en hojas (el 6 por ciento del tejido de la hoja consiste de espacios intercelulares en caña de azúcar). Los espacios intercelulares de raíces en la mayoría de plantas son típicamente esquizógenos, aunque en pastos pueden ser largos, constando de una laguna lisígena formada por la avería de células circundantes. La composición de estos

espacios varía y algunos constan de aire o depósitos escamosos secos, pero la mayoría de los espacios consisten de fluidos, los cuales en maíz han mostrado contener los iones inorgánicos potasio, calcio, sulfuro, fósforo y cloro. Los espacios intercelulares de la porción verde de las plantas también consisten de gases y fluidos. Los espacios intercelulares en hojas están predominantemente localizados en los tejidos parenquimatosos extrafasciculares de la planta, que consisten de oxígeno y agua saturada de aire y fluido (Bacon & Hinton, 2007).

La concentración de nutrimentos en apoplasma y simplasma es interactiva con el floema; investigaciones recientes indican que el transporte de nutrimentos dentro de los tejidos de la planta ocurre a través de un recorrido apoplástico, vía pared celular continua, y ruta simplástica, vía plasmodesmos (Madore & Webb, 1981). Los nutrimentos orgánicos dentro del apoplasma constan de los muchos azúcares y carbohidratos relacionados derivados de la fotosíntesis - sacarosa, glucosa, fructosa, verbascosa, estaquiosa, rafinosa, , galactosa, , galactinol, mioinositol, etc.- (Madore & Webb, 1981), aunque varios compuestos nitrogenados tales como aminoácidos y aminos también están presentes, así como nutrimentos inorgánicos clave -glutamina, ácido aspártico, serina, alanina, asparagina, amonio, ácido -aminobutírico, treonina, valina, lisina, tirosina, leucina, glicina, isoleucina, arginina, histidina, metionina, ácido málico, ácido tartárico, ácido oxálico, ácido fumárico, ácido cítrico, cistina, potasio, calcio, azufre, fósforo, cloro- (Canny & McCully, 1988; Canny & Huang, 1993). Las concentraciones de azúcar disponibles dentro del apoplasma dependen de la naturaleza del floema cargándose ya sea del apoplasma o del simplasma. De este modo, el espacio intercelular es rico en sustancias necesarias para sostener el crecimiento de organismos, lo cual se refuerza con el gran número de células bacterianas viviendo en él (Bacon & Hinton, 2007).

Biología de la Asociación Endofítica

Diversidad de Endofíticas y Hospederos

Las bacterias endofitas muestran una gran diversidad tanto en la taxa bacteriana como en los grupos de plantas hospederas. Han sido aisladas de estructuras reproductivas tales como tallos, raíces, hojas (Stone, 2000), frutos, semillas y frutos secos, plantas herbáceas, por ejemplo, malas hierbas, hierbas acuáticas, vegetales importantes, pastos anuales y perennes, y plantas leñosas (Sturz, 2000; Hallmann, 1997; McLroy & Kloepper, 1995). Las plantas maderables reportadas como hospederas de

bacterias endófitas, incluyen especies de árboles maderables como roble, olmo, pera, álamo temblón y pino (Bacon & Hinton, 2007).

Las bacterias endófitas constan de especies Gram negativas y Gram positivas, sin embargo, un alto número de especies del grupo Gram negativas han sido reportadas como agentes de control biológico, figurando con un número de especies mayor que el grupo de Gram positivas; es considerado más diverso evolutivamente y superior que los Firmicutes primitivos (Gupta, 2002). A pesar de ello, el número de especies reportadas como endófitas es muy bajo, comparado con otras especies encontradas en plantas como colonizadores epífitos, epibióticos o rizosféricos; pero, indudablemente este número podría incrementarse cuando continúe la búsqueda de más agentes de biocontrol endófitos eficientes y a medida que más especies sean definidas por tecnología molecular (Bacon & Hinton, 2007).

Existen reportes que avalan la presencia de varias endófitas en algunos hospederos, los cuales sirven como reservorios para un amplio rango de taxas endófitas. Por ejemplo, el tubérculo de papa, es habitado por: *Acidovorax* sp., *Acinetobacter* sp., *Agrobacterium* sp., *Alcaligenes* sp., *Arthrobacter ureafaciens*, *Bacillus alclophialus*, *B. pasteurii*, *B. sphaericus*, *Capnocytophaga* sp., *Comamonas* sp., *Corynebacterium* sp., *Curtobacterium citreum*, *C. luteum*, *Enterobacter* sp., *Erwinia* sp., *Flavobacterium* sp., *Kingella kingae*, *Klebsiella* sp., *Leuconostoc* sp., *Methylobacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Pantoea* sp., *Photobacterium* sp., *Pseudomonas plymuthica*, *P. tolaasii*, *Psychrobacter* sp., *Serratia liquefaciens*, *S. proteamaculans*, *Shewanella* sp., *Sphingomonas aurantiaca*, *Vibrio* sp., *Xanthomonas* sp. (Hollis, 1951; Sturz, 1995, 1998; Sessitsch, 2004). Sin embargo, no se sabe cuántos de estos organismos están coexistiendo, en realidad, como endófitas fisiológicamente viables dentro del mismo nicho o están como propágulos dominantes (Bacon & Hinton, 2007).

Los números de endófitas bacterianas contenidas dentro de tejidos de plantas varían, pero son sumamente mayores que las bacterias patógenas. Se han reportado concentraciones internas hasta de 10^7 UFC/g de peso húmedo del tejido de plantas de varias especies, sin embargo, es normal encontrar concentraciones de 10^2 a 10^6 UFC/g de peso húmedo de tejido de plantas. El número total de bacterias endófitas que colonizan una planta está relacionado con su genotipo, factores bióticos y abióticos y, genotipo bacteriano. Las poblaciones endófitas fluctúan temporalmente, dependiendo en la temperatura de crecimiento y genética del hospedero, o bien sea intra- o interespecifica la presencia de endófitas o especies epífitas competidoras, alteraciones químicas en el hospedante, así como la sequedad, calor y salinidad de los suelos (Sturz, 2000; Bacon & Hinton, 2007).

Producción de Metabolitos Secundarios en la Planta y Afectaciones en Hospederos

El enfoque principal de los estudios con bacterias endófitas consiste en su utilización para la mejora de plantas de interés agrícola, debido a que tienen un amplio espectro de efectos en hospederos (Bacon & Hinton, 2007), lo cual se debe a la producción de metabolitos secundarios que alteran el crecimiento del hospedero y el fenotipo (Forchetti, 2007). Las principales utilidades de las bacterias endófitas son soporte de crecimiento y promoción de la salud de la planta (Hallmann, 1997) y, protección de plantas contra enfermedades (Andreote, 2009). Un ejemplo de la utilidad agronómica que se le da a estos organismos se reporta en caña de azúcar pues, ha sido cultivada continuamente por 100 años en partes de Brasil sin adición de nitrógeno; en cambio, este nutrimento es suministrado por la bacteria endófito *Acetobacter diaetrophicus* (Stone, 2000).

La mejora en el crecimiento de plantas es atribuido a la producción de fitohormonas, tales como auxinas, citoquininas y las giberelinas (Holl & Chanway, 1992; Lebuhn, 1997), a la producción de antibióticos (Leifert, 1995), al suministro de nitrógeno a la planta infectada y/o solubilización de hierro y fósforo en el suelo (Sturz, 1998) y, la supresión de niveles endógenos de la producción de etileno (Glick, 1995). Por consecuencia son descritas como bacterias promotoras de crecimiento, además se sugiere que tienen una tendencia en estar restringidas a hospederos, lo cual puede limitar su uso como promoción de crecimiento de plantas en general (Bacon & Hinton, 2007).

El control biológico de enfermedades de plantas es, quizá, el principal efecto observado en plantas infectadas con bacterias endófitas. La supresión *in vitro* de patógenos de plantas se demuestra en el cultivo, lo cual puede no tener los mecanismos expresados bajo condiciones naturales. Sin embargo, datos de campo sustentan la supresión de varias enfermedades de plantas que se correlacionan con la mayoría de los estudios *in vitro*, los cuales conducen al interés en bacterias endófitas (Bacon & Hinton, 2007). Muchos estudios indican que las especies de endófitas producen antibióticos (Sturz 2005), sideróforos y enzimas líticas, pero muy pocas sustentan la producción de estas sustancias *in planta*. El mecanismo común para el control de enfermedades por bacterias endófitas en plantas es inducido en la resistencia sistémica (Bacon & Hinton, 2007).

Utilidad Tecnológica de las Bacterias Endófitas

Históricamente, las bacterias endófitas que no produjeron enfermedades fueron bien descritas hace más de 50 años (Hollis, 1951), pero las bacterias endófitas rápidamente están formando parte de un grupo definido de organismos de biocontrol, indicado por el incremento reciente de publicaciones, las cuales reflejan un interés en su potencial benéfico en la agricultura (McInroy, 1995; Hallmann, 1997). Sin embargo, existen algunas especies que aparentemente han evolucionado junto con las plantas, explotando el hábitat endofítico y habiendo desarrollado algunos grados de especificidad de hospedero, lo cual sugiere que el nicho endofítico es, quizá, diferente para cada una de las especies de plantas y podrá requerir modificaciones considerables para alojar a cualquiera otra bacteria. Esto es en particular importante ya que hay algunas bacterias que exponen algunos grados de especificidad en cuanto a las especies de hongos que controlan. De este modo, en suma a la producción de plantas, también se debe hacer un intento consciente en modificar la bacteria para el nicho endofítico (Bacon & Hinton, 2007).

Otras aplicaciones prácticas de las endófitas implican aprovecharlas como fuentes de nuevos metabolitos útiles en medicina, usos en protección industrial y como búsqueda de modelo de sistemas para la investigación de interacciones hospedero-parásito y evolución en sistemas naturales (Stone, 2000).

Agentes de Control Biológico

El nicho endofítico ofrece un único hábitat para el control de patógenos a partir de que la bacteria endófitas es contenida en la planta y no está sujeta a la influencia directa del ambiente, repercutiendo en su multiplicación dentro de los espacios intercelulares a medida que la planta crece; de ese modo, potencialmente se coloniza la planta entera. La bacteria está dentro de un ambiente estable. Además la asociación se establece a largo plazo, lo que promueve aptitud, por parte de estos organismos, en perennes tales como árboles. Otro beneficio es que la mayoría de las bacterias endófitas pueden ser aplicadas fácilmente a la planta o semilla antes de, o a la plantación, con lo cual la infección natural acontece al mismo tiempo de su aplicación. Además, las plantas hospedantes parecen ser buenas aceptadoras de endófitas bacterianas de modo que la modificación genética de la planta no se requiere para la infección (Bacon & Hinton, 2007).

La diversidad de bacterias endófitas podría reflejar el gran número de probables mecanismos de acción que se han reportado sirven como la base de supresión de enfermedades. De este modo, los

mecanismos de acción por agentes de biocontrol endofítico incluye la producción de compuestos antimicrobianos (Leifert, 1995), la competencia por nutrimentos y el traslape del nicho, competencia por micronutrimentos tales como hierro por producción de sideróforos y más recientemente la adquisición de resistencia sistémica del hospedero (Bacon & Hinton, 2007).

Un aspecto a considerar en el uso de endófitas bacterianas para el control de enfermedades es la posibilidad de que el patógeno produzca antibióticos para alterar la expresión del agente biocontrol. Lo cual se ha observado sucede con el hongo patógeno *Fusarium verticillioides*, que produce ácido fusárico, que es un potente antibiótico para muchas especies de biocontrol. Sin embargo, se pueden y se han desarrollado razas mutantes de endófitas de biocontrol tolerantes al ácido fusárico, lo cual ofrece una promesa para el uso de estas especies en campo (Bacon & Hinton, 2007).

Crecimiento de Plantas

Las respuestas del crecimiento de plantas por la acción de bacterias endófitas están bien establecidas para varias plantas cultivables. Lo que no se conoce es la participación directa de los muchos agentes relacionados con las bacterias específicas que afectan el crecimiento de plantas. Sin embargo, las causas más obvias incluyen la producción de fitohormonas tales como etileno, auxinas y citoquininas, todo lo cual tendrá un efecto positivo en el crecimiento y desarrollo de la planta (Bacon & Hinton, 2007).

Otros efectos en el crecimiento de plantas atribuidos a bacterias endófitas son acrecentar la respuesta mineral tal como la solubilización de hierro y fósforo atado en el suelo y, proporcionar nitrógeno a la planta. Efectos adicionales son que interactúan con la población bacteriana del suelo, historia de cosecha previa y acumulación de bacterias de suelo y los beneficios resultantes derivados de la alelopatía (Sturz, 2000). Se ha estimado que por el uso de endófitas en plantas se puede producir alrededor de 200 kg de nitrógeno por hectárea por año (Ladha & Reddy, 1995).

Los efectos en el crecimiento de plantas pueden ser indirectos. El control de organismos patogénicos podría maximizar el crecimiento de plantas debido a la falta de parasitismo y enfermedades, así como disminuir la susceptibilidad a estreses abióticos tales como tolerancia a sequía o resistencia a heladas. Adicionalmente, efectos indirectos en crecimiento de plantas por estímulo de la planta hospedera para producir una cantidad mayor de fitohormonas y disponibilidad mineral (Bacon & Hinton, 2007).

Proyecciones Tecnológicas Futuras para Bacterias Endófitas

Requerimiento de Capas Endófitas para Explotaciones

Las endófitas bacterianas ofrecen un hábito único para la protección de plantas y otras aplicaciones: esto es su auto-contenido, sistema de auto-perpetuación que es amortiguado y protegido de los muchos cambios en el ambiente natural, muy poco requiriendo del medio ambiente y normalmente teniendo muy poca competencia dentro del nicho endofítico. El primer requerimiento que deben cubrir las bacterias endófitas, para este propósito, es que deben prescindir del potencial para inducir enfermedades en plantas. Deben ser capaces de ser distribuidas dentro la planta, especialmente a posiciones donde se espera que las plagas residan. Igualmente importante, y en la ausencia de una distribución uniforme en la planta, es que liberen plaguicida, sustancia que puede ser trasladada a partir de la bacteria, a través de la planta y al objetivo. El tercer requerimiento es que el organismo pueda ser cultivable, fácilmente transformable y manipulado genéticamente con facilidad. Un cuarto requerimiento, aunque no incondicional es que la colonización endofítica sea natural y obligada para las especies. Estudios indican los papeles importantes que desempeñan los plásmidos en las asociaciones de bacterias con plantas, sugiriendo importantes usos potenciales de plásmidos específicos en la colonización endofítica de plantas por bacterias, ya sea en términos de eficiencia incrementada y/o en plantas que se conocen por ser difíciles como hospederas o no-hospedera de endófitas (Bacon & Hinton, 2007).

El uso de bacterias endófitas para controlar otros endófitos, hongos o bacterias, requiere que las especies biocontrol sean altamente competitivas en el orden de controlar el patógeno endofítico. Así, lo que se necesita es una medida de competición inter- e intra-específica para cuantificar, o al menos, medir el potencial de éxito de competencia del nicho. (Bacon & Hinton, 2007).

Transformación Sucedánea o Paratransgénesis de Plantas

El término transformación sucedánea se usa para describir el uso de tecnología transgénica en la protección de cultivos donde, el mutualismo bacteriano es transformado con un gen o genes específicos y la raza es reinsertada en la planta para la expresión del gen. Paratransgénesis, es el concepto que se usa para indicar que la bacteria endófito forma una asociación mutualista con la planta; o al menos la asociación es neutral, resultando en respuesta no hospedera a la asociación biológica (Bacon & Hinton, 2007).

Cada agente de biocontrol simbiótico específico tiene muchas llaves características que una endófita debe poseer en orden para que sea un agente efectivo para transformación sucedánea. La principal característica puede incluir una transformación exitosa sin la pérdida de aptitud endofítica poseída por los no-transformantes. Los genes introducidos deben ser expresados y no regulados *in planta* y, el producto o mecanismo debe ser entregado en los sitios debidos, lo cual debería ser específico, especialmente si el resultado deseado es el biocontrol. Las ventajas de la transformación sucedánea sobre la transformación tradicional de plantas incluyen la facilidad de la transformación bacteriana, comparado con las plantas más difíciles tales como pastos y, la extensión horizontal de los genes introducidos es reducida. Además, el proceso de transformación bacteriana es rápido, razonablemente económico, es más fácil que en eucariontes y es posible la introducción de un gran número de genes dentro de una bacteria endófita (Bacon & Hinton, 2007).

La paratransgénesis o transformación sucedánea puede ser usada para aspectos medicinales específicos de medicina humana y otras aplicaciones farmacéuticas. La mayoría de los usos de la transformación sucedánea de endófitas bacterianas han sido para la entrega de plaguicidas, tales como Bt, a varias plantas. Sin embargo, la transformación sucedánea tiene el potencial para su uso como un sistema de entrega de gen en plantas para comportamiento incrementado de la planta en eficiencia de nitrógeno, resistencia a estrés biótico y abiótico, emergencia de plántulas acelerada y subsecuente desarrollo de planta, cualidades nutrimentales incrementadas o mejoradas, y producción de herbaje incrementado. Las bacterias endófitas tienen el potencial como vectores de transformación de productos útiles que pueden ser expresados *in planta*, aumentando las cualidades nutrimentales naturales de alimentos o produciendo componentes de valor agregado de cultivos alimenticios, así como vectores viviendo de pesticidas (Bacon & Hinton, 2007).

Fitorremediación de Polutantes

Recientemente se estableció que las bacterias endófitas pueden ser usadas para remediar directamente suelos contaminados o contribuir a plantas que detoxifican suelos contaminados. Los usos que se les da a las bacterias endófitas para la fitorremediación varían, incluyendo la reducción de contaminaciones de hidrocarburo de petróleo en suelos para reducir sus niveles de metales pesados, incluyendo solubles en agua y xenobióticos orgánicos volátiles. Existen reportes de polutantes que son reducidos por bacterias endófitas, incluyendo benceno, tolueno, etilbenceno, desperdicios con alto contenido de amoníaco y estiércol animal, cloroformo, diclorometano, xileno y otros polutantes

hidrofóbicos. La degradación endofítica ocurre dentro de la planta o, en la rizósfera si la bacteria se localiza en la raíz (Bacon & Hinton, 2007).

Las razas de bacterias endófitas establecidas para uso en fitorremediación son aquellas que colonizan xilema, así como espacios intercelulares. Esto es porque la mayoría de los polutantes son traslocados en el sistema vascular de las plantas, por lo tanto es eficiente la bacteria que sea capaz de colonizar el sistema vascular de la planta. En ausencia de bacterias endófitas, la planta dispone de los polutantes descompuestos como volátiles, que son liberadas al ambiente por transpiración por las hojas. En cambio, si una bacteria es requerida, se previene la mayoría de las metilaciones usadas por la planta para hacer compuestos volátiles y, la cantidad de volátiles tóxicos son eliminados, haciendo el proceso de fitorremediación microbiana más segura que cuando se hace con plantas únicamente (Bacon & Hinton, 2007).

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS DE PAPA ASOCIADAS CON SÍNTOMAS DE PUNTA MORADA

Isolation and Characterization of Endophytic Bacteria Associated with Purple Top Symptoms in Potato

María Isabel Notario-Zacarías¹, Alberto Flores-Olivas¹, Gabriel Gallegos Morales¹, Oswaldo García-Martínez¹, Víctor Olalde-Portugal²

¹Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Dpto. de Parasitología Agrícola, Calzada Antonio Narro 1923. Col. Buenavista, Saltillo, Coahuila, C. P. 25315 México. Apdo. Postal 342.

²Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, Lab. de Bioquímica Ecológica, Unidad Irapuato, Guanajuato, México C. P. 36500, Correspondencia: aflooli@uaaan.mx.

Abstract

The potato (*Solanum tuberosum*L.) is the fourth most important crop at world level, and is attacked severely by the disease "purple top". Phytoplasmas are considered the principal etiologic agent of the disease. In a first trial for isolating phytoplasmas by using natural culture media, it was observed a great quantity of endophytic bacteria and, because of their unknown nature and function on the plants from they were isolated, in this study it was done a general probe of the endophytic bacteria in potato plants affected by purple top disease with the objective of clearing the some of the questions about these bacteria and their roll in plants infected by the mentioned disease. By the means of isolation and recognition procedures, were indentified several genera like *Labrys*, *Shinella*, *Ralstonia*, among others. Among the performed tests, the most prominent are the ones of growth promotion, pathogenicity tests and antagonism tests with some phytopatogenic fungus and algae. The probes show that the bacteria do not produce a harmful effect on potato plants, some are growth promoters and others are antagonic with some phytopatogenic agents. The results move us to think that the endophytic bacteria help maintaining the potato plant alive even with the purple top symptoms because of their growth promoting and antagonistic capabilities; that way, the plant is favored by the joint benefit.

Key words: Antagonism, Ecological Niche

Resumen

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es el cuarto cultivo de mayor importancia a nivel mundial, y es atacado severamente por la enfermedad Punta Morada. Se considera a los fitoplasmas como el principal agente etiológico de la misma. En un primer intento de aislar fitoplasmas a través de medios de cultivo naturales se observó una gran cantidad de bacterias endófitas, por lo que se propuso hacer un sondeo general en plantas de papa enfermas con Punta Morada. Mediante los procedimientos de aislamiento y reconocimiento de las bacterias se identificaron algunos géneros tales como *Labrys*, *Shinella*, *Ralstonia*, entre otros. Entre los ensayos realizados destacan la promoción de crecimiento, pruebas de patogenicidad, antagonismo a algunos hongos fitopatógenos. Los resultados obtenidos demuestran que dichas bacterias no producen efecto perjudicial en las plantas de papa, algunas ayudan a mantener viva a la planta aún con la sintomatología de punta morada, debido a su capacidad antagónica y efecto promotor de crecimiento, ya que, si bien las bacterias únicamente presentan alguna de estas capacidades, la planta se favorece de los beneficios conjuntos.

Palabras clave: Antagonismo, Nicho Ecológico.

Introducción

La papa (*Solanum tuberosum* L.) constituye uno de los alimentos básicos, debido a que ocupa el cuarto lugar de importancia a nivel mundial (Secor & Rivera-Varas, 2004), genera una producción anual mayor de 200 millones de toneladas, las cuales tienen impacto directo en la alimentación de gran parte de la población en todo el mundo (Buckenhüskes, 2005; Van Gijssel, 2005). Proporciona alimento a muchas personas con la producción generada (24.6 ton/ha) (FAO, 2007). Muchos estudios agronómicos han mostrado la alta eficiencia en el uso de recursos tales como tierra y energía por el cultivo de la papa. Este producto agrícola proporciona un valioso aporte de vitaminas, minerales, proteínas, aminoácidos esenciales y carbohidratos (Buckenhüskes, 2005; Van Gijssel, 2005). En México también constituye uno de los cultivos más importantes (Hooker, 1981) debido a su trascendencia económica y social (Estévez et al, 2001). Sin embargo, el cultivo de la papa es susceptible a más de 300 plagas, aunque no todas ellas causan pérdidas de rendimiento significativas (Hooker, 1981). Actualmente, a nivel mundial, se considera al tizón tardío, cuyo agente etiológico es *Phytophthora infestans*, como la enfermedad de mayor importancia. Sin embargo en México y otros países, recientemente, una sintomatología conocida como punta morada de la papa (Lee, 2006; Munyaneza, 2007) asociada inicialmente a fitoplasmas (Martínez-Soriano, 1999) es el principal problema fitosanitario por combatir. La importancia de esta enfermedad radica en su nivel de daño a la producción ya que ésta disminuye considerablemente la producción así como su calidad. Debido a la importancia que ha revestido, muchos investigadores se han dedicado a la tarea de estudiar a sus agentes etiológicos; es así como este trabajo se suma a la tarea de indagar más

respecto a los organismos (bacterias) que se encuentran presentes en el interior de las plantas que presentan la sintomatología de Punta Morada y tratar de dilucidar la función de su presencia en estas plantas. El objetivo del presente estudio fue aislar y caracterizar bacterias endófitas de la papa asociadas a la sintomatología de Punta Morada y conocer su nicho en este sistema.

Materiales y Métodos

Preparación de Medios de Cultivo

Se licuó 50 g de tejido vegetal (hojas, tallos, brotes terminales, raíces y tubérculos) en medio de sales Dubo (medio base) cuyos constituyentes son: $K_2 HPO_4$, 1.0 g; $NaNO_3$, 0.5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g; KCl, 0.5 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01 g; por litro de agua destilada, pH 6.7. El licuado se centrifugó dos veces a 10,000 rpm por seis min, el sobrenadante se aforó a un litro, con el medio de sales y 18 g de agar. Se esterilizó en autoclave por 20 min. Se adicionó ampicilina (50 $\mu g/lt$) antes del vaciado en placa. Se prepararon cuatro medios: los dos primeros incluyen los jugos de tejidos aéreos de la planta, a uno de ellos se agregó aceite de aguacate (1%); los dos medios restantes contienen los jugos de tejidos subterráneos, y de los cuales uno tiene aceite de aguacate (1%) como agente de tensión en el medio (agregado antes de esterilizar).

Aislamiento y Purificación de Bacterias

El inóculo (brotes axilares, tubérculos aéreos, tubérculos y estolones) se desinfectó con hipoclorito de sodio (concentración de producto comercial) por tres min, seguido de dos pasos de lavado con agua destilada estéril (dos min), un lavado en leche ultrapasteurizada y un lavado con agua destilada estéril. Se maceró con 20 ml de medio de sales Dubo y, sembró un ml del inóculo original y las diluciones 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} por inmersión en los medios preparados. Se incubó por 15 días a 26 °C, con transferencia periódica de colonias emergentes, mediante el método de picadura.

Selección de Aislados

Los aislados obtenidos se traspasaron a cada uno de los medios de cultivo preparados, se observó la morfología colonial en ellos y, seleccionaron los aislados con morfología diferente. Posteriormente se sembraron en Agar Nutritivo y PDA, para observar su capacidad de crecimiento en medios convencionales para posterior manipulación en ellos.

Caracterización General e Identificación Molecular

Morfología Colonial, Celular y Prueba de Gram. Los aislados se sembraron en placas con PDA por el método de estría cruzada, se incubaron a 28 °C. La prueba de Gram y, descripción de forma y tamaño celular se realizaron cuando los aislados alcanzaron un crecimiento de 24 h. La morfología colonial se describió en aislados con 48 h de crecimiento; las características consideradas son: tamaño, color, forma y bordes.

Tiempo de Generación. Se inocularon matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 80 ml de caldo nutritivo (extracto de levadura, 2.5 g; peptona de caseína, 5.0 g; glucosa, 1.0 g; por litro) con un ml de cultivo de cada aislado (crecidos durante la noche), siendo incubados a 28 °C y 170 rpm. El crecimiento poblacional bacteriano se midió con absorbancia a 640 nm y siembra en placa con agar nutritivo en Spiral Biotech (Inc. Autoplate 4000 Automated Spiral Plater) para el conteo de unidades formadoras de colonia por ml (UFC/ml), cada tres horas a partir de la inoculación. La medición de absorbancia sirvió para correlacionar con el conteo de las UFC. Las placas sembradas se incubaron a 28 °C hasta por 48 h. El conteo de UFC/ml se hizo de acuerdo a las indicaciones del manual del Spiral Biotech.

Resistencia a Antibióticos. Esta prueba se realizó por razón del empleo de antibiogramas (Multidiscos Combinados, BIO-RAD S.A.). Se sembraron 100 µl de cada aislado (de un cultivo de una noche), mediante extensión en placas de 190 mm, conteniendo agar nutritivo; se colocó un multidisco con 12 antibióticos y se incubó durante una hora a 4 °C, y posteriormente a 28 °C durante 24 h. Se midieron los diámetros de halos de inhibición generados por cada antibiótico y se compararon con la tabla de datos proporcionada por la empresa.

Efecto de la Concentración de Dextrosa Sobre el Desarrollo Colonial. Se inoculó 15 µl de cada aislado bacteriano, (crecimiento de una noche) en tubos de ensayo conteniendo 15 ml de medio de infusión de papa y seis concentraciones de dextrosa (1, 5, 10, 15, 20 y 25 %) por duplicado. El crecimiento se determinó con la medición de absorbancia a 640 nm en periodos de 24 h durante seis días.

Secuenciación de la Región 16S ADNr. Se partió de la extracción de ADN cromosómico, para ello se empleó el método Harwood & Cutting (1990) modificado. Se tomó una alícuota de cultivo bacteriano (crecimiento de una noche) y centrifugó a 14,000 rpm por seis min. Se decantó el sobrenadante y adicionó 100 µl de buffer de lisis (NaCl, 0.1 M; EDTA, 50 mM, pH7.5) a la pastilla y centrifugó por cuatro min. El sobrenadante se decantó y adicionó 250 µl de buffer de lisis junto con 25 µl de N-sarcosine. Se mezcló con 5 µl de proteinasa K e incubó 10 min a temperatura ambiente. Seguido, se incubó 30 min a 80 °C con agitación de 300 rpm. Se transfirió a hielo durante 5 min. Se atemperó, adicionó 2 µl de RNasa e incubó a temperatura ambiente por 10 min. Se añadió 330 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), centrifugó por 10 min a 14,000 rpm. La fase acuosa se separó y se le adicionó 200 µl de cloroformo: alcohol isoamílico, se mezcló y centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min. Después de repetir este paso se adicionó 20 µl de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 500 µl de isopropanol frío. Se incubó durante 20 min a 4 °C y centrifugó a 14,000 rpm por 15 min. La pastilla se lavó con etanol al 70%, resuspendió en 25 µl de agua ultrapura y almacenó a 4 °C. La amplificación de la región 16S ADNr se realizó con los iniciadores de secuencia generales Fd1/rP2 (Weisburg, 1991). La reacción de PCR constó de 1µl de preparación de ADN, amortiguador de Taq ADN polimerasa 1X, MgCl₂ 2mM, dNTP's 0.2mM, iniciadores de secuencia 1pM, Taq ADN polimerasa 1UDO (Invitrogen Technologies). La reacción se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones de amplificación: cinco min de desnaturalización inicial a 94 °C; 30 seg de desnaturalización a 95 °C, 45 seg de alineamiento a 60 °C, un min de extensión a 72 °C (28 ciclos), y cinco min de extensión final de 72 °C. El segmento amplificado se insertó en un vector TOPO 2.1 (Kit TOPO TA Cloning) y multiplicado en células quimiocompetentes. El vector con el inserto se aisló mediante una lisis alcalina (Birnboim & Doly, 1979). Se constató la integridad del ADN, se ajustó la concentración de ADN plasmídico a 2µg/µl y se envió a secuenciar al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, CINVESTAV-I. Las secuencias se sometieron a una comparación dentro de la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Caracterización para Determinar Promoción de Crecimiento

Crecimiento en Medio ACC. Se preparó medio mínimo de sales DF (Dworkin & Foster, 1958), con el uso de ACC (1-aminocicloporpano-1-ácido carboxílico) como fuente de nitrógeno (Penrose & Glick, 2003). Los aislados se sembraron mediante el depósito de 15 µl de cultivo bacteriano (crecimiento de una noche) en discos de papel absorbente, de 0.5 cm de diámetro, adheridos a la superficie del medio de cultivo. Se dejó incubar a 28 °C durante tres días y observar el crecimiento de los aislados en el contorno de los discos.

Producción de Sideróforos. Se utilizó el medio agar-CAS, preparado de acuerdo a la metodología descrita por Alexander y Zuberer (1991). Los aislados se sembraron en placas de agar-CAS, mediante el método de estría cruzada, se incubó a 28 °C durante cuatro días para observar el crecimiento colonial de color naranja y el halo del mismo color en el medio, lo cual es indicativo de la liberación de hierro a partir del complejo colorido Fe-CAS por parte de los sideróforos bacterianos.

Efecto de Estimulación de Crecimiento. Se utilizó semilla de sorgo Caloro BJ86 libre de residuos de productos biocidas, se desinfectó con hipoclorito de sodio (2%) durante dos min y se lavó dos veces con agua destilada estéril. Se colocó en cámara húmeda para promover su germinación. Las plántulas generadas se traspararon a invernadero (sustrato estéril); al mismo tiempo fueron inoculadas con los aislados bacterianos, el control positivo (*Bacillus subtilis* cepa comercial Kodiak) y el control negativo (infusión papa-dextrosa). Se inocularon seis plántulas por tratamiento, con tres ml de cultivo, crecido durante la noche, cada una. Las plantas se extrajeron del sustrato y se les midió volumen de raíz, número de raíces adventicias, longitud total y peso seco de raíz y vástago. Los datos generados fueron procesados por separado mediante un análisis de varianza bajo el diseño estadístico completamente al azar.

Pruebas de Antagonismo Ante Agentes Fitopatógenos. Las pruebas se realizaron contra *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Rhizoctonia* sp. y *Pythium* sp. (los organismos fueron proporcionados por el laboratorio de Bioquímica Ecológica del CINVESTAV-I). Se sembraron en el centro de placas con infusión de papa-dextrosa-agar (PDA) mediante el uso de sacabocados de 0.3 mm de diámetro. Se incubaron a 28 °C hasta alcanzar un crecimiento radial de 0.5 cm, para confrontarlos con los aislamientos bacterianos; para lo cual en cada placa se trazaron dos líneas (equidistantes del centro de crecimiento del hongo) con 15 µl, cada una, de cultivo previamente crecido, se utilizó caldo nutritivo como control. Se incubaron nuevamente y el crecimiento (radial) de los agentes fitopatógenos se midió cuando éstos alcanzaron la

línea trazada por el control (caldo nutritivo). *Pythium*, los aislados bacterianos y el control negativo se sembraron al mismo tiempo; debido al crecimiento rápido de esta alga, su medición se realizó después de transcurrir 24 h de incubación. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza y comparación de medias DMS al 0.01 de significancia, para cada agente fitopatógeno estudiado.

Prueba de Patogenicidad *In Vitro*. Se sub-cultivaron yemas axilares de papa variedad Fábula en tubos de crecimiento conteniendo medio de sales base Murashige & Skoog con orgánicos, micronutrientes y vitaminas mínimos (MSMO, Sigma-Aldrich), sacarosa (3% p/v) como fuente de carbono y agar (0.6% p/v) (Difco, Detroit, MI, USA), con pH ajustado a 5.7. Se colocaron en cámara de crecimiento con temperatura de 25 °C y fotoperiodo de 12 h. Después de tres semanas de crecimiento (aprox. 6 cm altura), se inocularon con los aislados bacterianos (cultivo de una noche) y un control negativo (infusión papa-dextrosa). Cada plántula fue herida por punción en una de sus hojas y en la parte media del tallo. Después de la inoculación, las plántulas fueron incubadas nuevamente, durante tres semanas, bajo las mismas condiciones de temperatura y fotoperiodo. Se tomaron en cuenta las siguientes variables: síntomas de enfermedad, peso seco de plántula, longitudes del tallo y de raíz; variables analizadas estadísticamente bajo el diseño completamente al azar.

Resultados

Caracterización General e Identificación Molecular

Se obtuvieron nueve aislados bacterianos provenientes de plantas de papa con síntomas evidentes de punta morada, a los cuales se les realizaron diferentes pruebas para tratar de conocer su naturaleza y nicho en estas plantas. El reconocimiento molecular mostró que un aislado tiene alto parecido a *Labrys mijagiensis* (Número de Acceso AB236171), dos tienen mayor homología con *Shinella zoogloeoides* (Número de Acceso EU373395), uno más es similar a *Ralstonia metallidurans* (Número de Acceso CP000353), los restantes tienen mayor parecido a *Staphylococcus haemolyticus* (Número de Acceso AP006716), *Bosea* sp. (Número de Acceso EU373419), *Variovorax paradoxus* (Número de Acceso DQ256487), *Curtobacterium flaccumfaciens* (Número de Acceso AJ310414) y *Curtobacterium* sp. (Número de Acceso AJ784400). Todos los aislados son Gram negativo, excepto *S. haemolyticus*. *L. mijagiensis* tiene una morfología celular de cocobacilo (1 x 1.5 µm), los aislados de *S. zoogloeoides* son bacilos (0.5 x 2.5-3 µm), *R. metallidurans* es bacilo (0.5 x 2-2.5 µm), *S. haemolyticus* es coco (1-0.8 x 1-0.8 µm), *Bosea* sp. es cocobacilo (1 x 0.5-0.8 µm), *V. paradoxus* es vibrio (1.5 x 0.5 µm), *C. flaccumfaciens* y

Curtobacterium sp. son cocobacilos (1 x 0.5 µm). La morfología colonial de los aislados presenta pocas diferencias entre sí a las 48 h de crecimiento ya que, hasta ese momento, en su mayoría son colonias extremadamente pequeñas. *L. mijagiensis* presenta un diámetro de 0.45 mm, color blanco, forma circular y borde entero; los aislados de *S. zoogloeooides* presentan 0.69-0.88 mm de diámetro, color blanco, forma circular y borde entero; *R. metallidurans* tiene 3.31 mm de diámetro, es de color beige-amarillo, forma circular y borde ondulado; *S. haemolyticus* mide 0.64 mm de diámetro, es de color blanco, circular con borde entero; *Bosea* sp. mide 0.22 mm de diámetro, es blanco, circular y borde entero; *V. paradoxus* mide 0.24 mm de diámetro y las demás características son iguales al aislado anterior; *C. flaccumfaciens* mide 2.03 mm de diámetro, es beige-amarillo, con forma circular y borde entero y; *Curtobacterium* sp. mide 1.97 mm de diámetro y las demás características son iguales al aislado anterior.

Tiempo de Generación. El crecimiento poblacional de los aislados se comportó de forma distinta en cada aislado, los datos obtenidos se ajustaron de acuerdo al modelo logístico Verhulst-Pearl
$$N = \frac{k}{1 + e^{a - (m * t)}}$$
. La correlación (R^2) se mantuvo dentro del límite 0.8-0.99. Los aislados mostraron diferencias marcadas en el número de células generadas por cada aislado, al momento de alcanzar la fase estacionaria, de donde *V. paradoxus* alcanzó su mayor número de células viables a las 24 h con $1.55 * 10^7$ unidades formadoras de colonia, en contraste con *R. metallidurans*, que alcanzó $3.92 * 10^9$ unidades formadoras de colonias en 36 horas. La Figura 1 muestra el comportamiento del crecimiento poblacional de los aislados en estudio; y el Cuadro 1 presenta las constantes para los aislados, generadas por el modelo logístico usado.

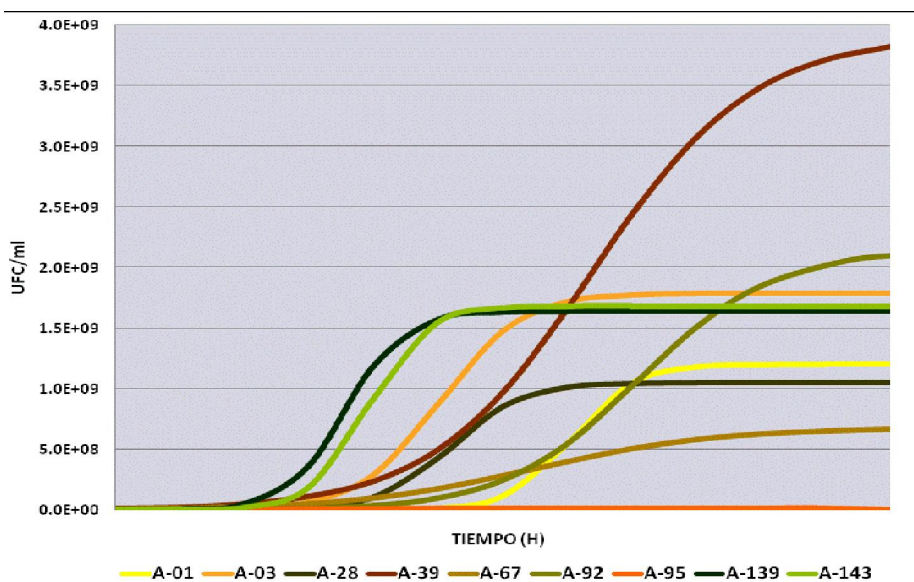


Figura 1. Tiempos de generación de nueve aislados bacterianos endófitos de papa con sintomatología de Punta Morada. A-01 *L. miyagiensis*; A-03 *S. zoogloeoides*; A-28 *S. zoogloeoides*; A-39 *R. metallidurans*; A-67 *S. haemolyticus*; A-92 *Bosea* sp., A-95 *V. paradoxus*; A-139 *C. flaccumfaciens* y A-143 *Curtobacterium* sp.

Cuadro 1. Valores de constantes de velocidad específica de crecimiento (m) y capacidad portadora del medio (k) de los aislados endófitos de papa, generados en las cinéticas de crecimiento.

Organismo	k	m	Organismo	k	m
<i>L. miyagiensis</i>	1.2E+9	0.700	<i>Bosea</i> sp.	2.14E+9	0.326
<i>S. zoogloeoides</i>	1.79E+9	0.534	<i>V. paradoxus</i>	1.55E+7	0.452
<i>S. zoogloeoides</i>	1.05E+9	0.599	<i>C. flaccumfaciens</i>	1.64E+9	0.736
<i>R. metallidurans</i>	3.92E+9	0.269	<i>Curtobacterium</i> , sp.	1.68 E+9	0.749
<i>S. haemolyticus</i>	6.82E+8	0.234			

m= UFC/ml; k=h⁻¹

Resistencia a Antibióticos. Todos los aislados mostraron resistencia a la penicilina, ampicilina y dicloxacilina. *L. miyagiensis*, *Bosea* sp. y *V. paradoxus* son resistentes a enoxacina. *R. metallidurans* y *S. haemolyticus* son resistentes a netilmicina. *L. miyagiensis*, *R. metallidurans*, *S. haemolyticus* y *V. paradoxus* son resistentes a cefalotina. *L. miyagiensis*, *R. metallidurans*, *S. haemolyticus*, *Bosea* sp. y *V. paradoxus* son resistentes a gentamicina. *L. miyagiensis* y *V. paradoxus* son resistentes a ceftriaxona; *S. zoogloeoides*, *C. flaccumfaciens* y *Curtobacterium* sp. presentan resistencia intermedia. *L. miyagiensis* es resistente a trimetoprim-sulfametoxazol; *Bosea* sp. manifiesta resistencia intermedia. *L. miyagiensis*, *S. zoogloeoides* y *V. paradoxus* son resistentes a la eritromicina; *S. zoogloeoides* y *Bosea* sp. tienen resistencia intermedia. *L. miyagiensis*, *R. metallidurans* y *S. haemolyticus* son resistentes a cloranfenicol y *V. paradoxus* demuestra resistencia intermedia. *R. metallidurans* y *S. haemolyticus* presentan resistencia

ante la amikacina; *L. miyagiensis* y *Bosea* sp. manifiestan resistencia intermedia ante el antibiótico. Es necesario hacer notar que los aislados son resistentes a la ampicilina debido a que este antibiótico se usó en los medios de cultivo, al aislarlos de plantas de papa.

Efecto de la Concentración de Dextrosa Sobre el Desarrollo Colonial. En el medio con uno por ciento de dextrosa se observó crecimiento de todos los aislados, con ritmos diferentes de crecimiento. El segundo aislado de *S. zoogloeoides* es el único que no creció en el medio con cinco por ciento de dextrosa. En el medio con el tercer y cuarto grados de concentración de dextrosa crecieron *R. metallidurans*, *S. haemolyticus*, *C. flaccumfaciens* y *Curtobacterium* sp. En el medio con 20 por ciento de dextrosa crecieron *S. haemolyticus*, *C. flaccumfaciens* y *Curtobacterium* sp.; y los últimos dos organismos citados fueron los únicos capaces de crecer en concentraciones de 25 por ciento de dextrosa. A partir del segundo nivel de concentración de dextrosa aplicado se distinguió cambios notorios en la capacidad de generación de células, en cada aislado se vio disminuida en diferentes grados. En el Cuadro 2 se muestra el comportamiento en el crecimiento de los distintos organismos ante distintas concentraciones de dextrosa.

Cuadro 2. Desarrollo colonial de nueve bacterias endófitas de papa en caldo de papa con seis concentraciones de dextrosa.

Aislados	Concentraciones de Dextrosa (%)					
	1	5	10	15	20	25
<i>L. miyagiensis</i>	24 (0.1461)	120 (0.2910)	-	-	-	-
<i>S. zoogloeoides</i>	24 (0.0636)	120 (0.0442)	-	-	-	-
<i>S. zoogloeoides</i>	24 (0.0434)	-	-	-	-	-
<i>R. metallidurans</i>	24 (0.7679)	24 (0.5145)	48 (0.2024)	96 (0.1283)	-	-
<i>S. haemolyticus</i>	24 (0.3321)	24 (0.1204)	24 (0.0380)	72 (0.0276)	120 (0.0159)	-
<i>Bosea</i> sp.	24 (0.0142)	96 (0.0552)	-	-	-	-
<i>V. paradoxus</i>	24 (0.0171)	96 (0.0782)	-	-	-	-
<i>C. flaccumfaciens</i>	24 (0.5677)	24 (0.4664)	24 (0.2126)	48 (0.2750)	48 (0.0800)	96 (0.0663)
<i>Curtobacterium</i> sp.	24 (0.4630)	24 (0.3394)	24 (0.1678)	48 (0.2372)	48 (0.0773)	96 (0.0639)

Se reporta el tiempo (horas) en el cual se observó crecimiento bacteriano. El valor encerrado en paréntesis es la absorbancia media registrada en los tiempos de observación. (-) Representa ausencia de crecimiento bacteriano en las respectivas concentraciones de dextrosa.

Caracterización para Determinar Promoción de Crecimiento

Crecimiento en Medio ACC. A las 24 h de incubación de los aislados en el medio ACC se observó crecimiento bacteriano en *L. miyagiensis*, *S. zoogloeooides*, *R. metallidurans* y *Curtobacterium* sp. Sin embargo, el crecimiento se siguió observando por 72 h más. A las 48 h, *C. flaccumfaciens* mostró crecimiento en este medio, y después de este tiempo ningún otro aislado logró crecer en él.

Producción de Sideróforos. Transcurridos cuatro días de incubación de los aislados en el medio agar-CAS, se observó que las placas sembradas con *L. miyagiensis* y *R. metallidurans* mostraron halos tenues color naranja alrededor del crecimiento bacteriano, además, la misma masa bacteriana creció adquiriendo esa tonalidad naranja. Sin embargo, la producción de sideróforos es baja. Por otra parte, los demás aislados no lograron crecer en dicho medio.

Efecto de Estimulación de Crecimiento. Los resultados generados, por el diseño estadístico utilizado, muestran que no existe diferencia estadística significativa en los valores correspondientes a cada una de las variables evaluadas, excepto longitud total de raíz. Otro punto a observar es que los datos analizados presentaron una dispersión hasta de un 44.39%. *L. miyagiensis* estimuló el desarrollo de raíz en comparación con el control positivo *B. subtilis* (Kodiak), un aislado de *Shinella zoogloeooides*, *Variovorax paradoxus*, *C. flaccumfaciens* y *Curtobacterium* sp., estimularon el crecimiento de raíz en la misma magnitud que el control positivo, a diferencia de *Bosea* sp., *R. metallidurans* y *S. haemolyticus*.

Pruebas de Antagonismo Ante Agentes fFitopatógenos. *L. miyagiensis* mostró mayor efecto antagónico contra *Pythium* sp., *Alternaria* sp. y *Fusarium* sp.; *S. zoogloeooides* manifestó actividad antagónica contra *Alternaria* sp. y *Fusarium* sp.; por su parte, *R. metallidurans* es antagónico contra *Fusarium* sp. y *Rhizoctonia* sp.; *C. flaccumfaciens* expuso mejor actividad antagónica contra *Pythium* sp., *Alternaria* sp. y *Fusarium* sp.; mientras *Curtobacterium* sp. tiene mayor capacidad antagónica contra *Fusarium* sp.

Prueba de Patogenicidad *In Vitro*. Esta prueba mostró que ninguna planta manifestó síntomas de enfermedad aparente, las áreas inoculadas por punción tampoco mostraron clorosis o algún otro síntoma de daño. En cuanto a las variables de peso seco de la plántula, longitud del tallo y de raíz, no se encontró diferencia estadística en su respuesta ante el estímulo de los aislados bacterianos.

Discusión

Se trabajó con nueve aislados bacterianos debido a que en el proceso de aislamiento y purificación de los mismos, muchos de ellos se tornaron incultivables. Por ello se considera altamente probable el haber conseguido el aislamiento de fitoplasmas en las primeras etapas de aislamiento de organismos. Sin embargo, no se pudo corroborar debido a la rápida pérdida de capacidad de crecimiento en los medios de cultivos preparados. El ADNr de los nueve aislados fue sometido a alineamiento de secuencias en una base de datos (BLAST). Los datos generados por la base de datos permitieron dar a conocer tentativamente a los organismos, sin embargo es necesario realizar más pruebas para conocerlos de manera certera. Estos organismos se han reportado en diferentes hábitats; en Japón, *L. miyagiensis* se aisló de hábitats de rizósfera (Islam *et al*, 2007); *S. zoogloeoides* se encontró en suelos cultivados con arroz (Xie & Yokota, 2006); *R. metallidurans* es tolerante a altas concentraciones de metales pesados (Brenner *et al*, 2005; Avoscan *et al*, 2007; Scherer & Nies, 2008), es endófito de plantas resistentes a altas concentraciones de metales pesados (Cubaka-Kabagale *et al*, 2008), está presente en rizósfera de cebada (Schmalenberger & Kertesz, 2007) y en aguas contaminadas (Alfreider *et al*, 2009). *Bosea* sp. se identificó como endófito asociado a nódulos en raíces de leguminosas (Rincón *et al*, 2008; Zakhia *et al*, 2006), se encontró también en campos de cultivos de papa (Dandie *et al*, 2007). *V. paradoxus* se aisló de suelos de invernaderos (Kim *et al*, 2006), así como de superficie estéril de raíz del pasto *Lasiurus indicus*, en la India (Chowdhury *et al*, 2007) y rizósfera de cebada (Schmalenberger & Kertesz, 2007). *C. flaccumfaciens* es la única especie del género al que se le atribuyen propiedades patogénicas, se encontró en varias plantas sin síntomas de enfermedades, ej: filósfera de malezas, pastos, caña de azúcar, cacahuate y trigo (Dworkin *et al*, 2006), sin embargo en este trabajo no provocó alguna patogenicidad en las plantas tratadas con la bacteria, lo cual concuerda con otros trabajos (Reiter *et al*, 2002; Sessitsch *et al*, 2004) donde, de acuerdo a las secuencias del gen 16s ARNr de algunos aislados mostraron alta homología a bacterias fitopatógenas tales como *C. flaccumfaciens* y *Erwinia amylovora*, sin embargo, ambas especies se encontraron como endófitas de papa. Datos disponibles sugieren que el principal hábitat natural de *Curtobacterium* sp. está constituido por diferentes plantas y fuentes relacionadas tales como suelo y otros ambientes. Se ha encontrado *Curtobacterium* en hojas y semillas de plantas de las familias Asteraceae, Cyperaceae, Poaceae y Lamiaceae. Sin embargo los métodos de aislamiento no involucran desinfección de superficie, por lo que resulta desconocido si las bacterias saprófitas son epifitas o endófitas viviendo en tejidos de plantas sin provocar daño o beneficio por su residencia (Dworkin *et al*, 2006). Existen reportes de bacterias endófitas en tallos y tubérculos de papa saludables, donde se han encontrado y cuantificado a los siguientes géneros: *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Agrobacterium* y *Xanthomonas* (De Boer & Copeman, 1974), sin embargo en el presente trabajo se han

encontrado otros géneros, los cuales, a pesar de no haber provocado ningún síntoma de enfermedad, pudieran estar vinculados con la presencia de otros organismos en la planta, que pueden ser los agentes causales directos de la sintomatología de Punta Morada, y que cuando éstos atacan a la planta, pudieran desencadenar un aumento en la densidad de población de las bacterias encontradas en este trabajo. Existen reportes donde se asocian bacterias endófitas en papa con hongos o algas fitopatógenas (Sturdy & Cole, 1974). Sin embargo, todos los aislados mostraron actividad antagonica ante algunos agentes patógenos, esto es interesante debido a que muchos de los hongos confrontados están presentes en los cultivos de papa con sintomatología de punta morada, además es evidente que las plantas, aún cuando se encuentran en etapas muy desarrolladas de enfermedad, rara vez perecen, aquí es donde entra en juego el papel de estas bacterias, por tanto, debido a que muestran cierto nivel de acción contra estos patógenos, reducen su nivel de daño.

Por su parte, *L. mijagiensis* mostró mayor producción de raíz que el resto de los aislados, dicho organismo creció en medio con ACC con fuente de nitrógeno (precursor del etileno) y produjo sideróforos, sin embargo *S. zoogloeoides*, *Curtobacterium* sp. y *R. metallidurans* no favorecieron el crecimiento de plantas de sorgo tanto como *L. mijagiensis*; a pesar de que todos ellos crecieron en el medio mínimo con ACC y el último produjo sideróforos. Además presentaron el mismo comportamiento que otros aislados que no manifestaron las mismas cualidades de los anteriores; lo cual indica que en el ecosistema existen factores que a veces impiden que la producción de etileno y sideróforos generen una respuesta de aumento en el crecimiento de la planta, ocasionando los mismos resultados que las bacterias que no los producen. El efecto de la concentración de dextrosa es marcado en el crecimiento de *S. zoogloeoides* y *L. mijagiensis*; no siendo así para los otros dos organismos; este puede ser un factor que interfiera con la efectividad de la promoción de crecimiento por parte de los aislados, ya que es un compuesto abundante en los haces vasculares de la papa. Sin embargo, sería de utilidad hacer inoculaciones en plantas utilizando mezclas de las bacterias y observar su comportamiento, ya que la concentración de dextrosa en los haces vasculares no generan un impedimento para su existencia en ese hábitat. Otro factor a considerar es que las bacterias fueron inoculadas en plantas de sorgo y no en papa, esta diferencia de familia puede generar una diferencia marcada en el efecto de las bacterias de estudio. Sin embargo, se utilizaron plantas de papa in vitro para observar el efecto de patogenicidad por parte de las mismas bacterias, y se pudo notar que, aunado a la no patogenicidad de las bacterias, tampoco se mostraron efectos contundentes en el crecimiento de las plántulas de papa. Cabe resaltar que se aisló *Staphylococcus haemolyticus* en las plantas de papa, bacteria que constituye un riesgo para la salud humana. Resultados análogos son reportados en otras investigaciones (Berg *et al*, 2005a; Berg *et al*, 2005b) donde se han detectado razas que son conocidas como patógenos facultativos de humanos, tales

como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermis* y *S. pasteurii*. Tales investigaciones hacen notar que no existe una distinción definida entre bacterias endófitas en plantas y patógenas.

Conclusiones

Con base en los resultados generados en este trabajo, se afirma que las bacterias endófitas estudiadas tienen la función de proteger su hábitat, es decir, cuidar de la planta con la que se asocian. Se observa que cada aislado tiene propiedades particulares en cuanto a capacidad antagónica contra agentes patogénicos, cualidades de promoción de crecimiento directa (producción de sideróforos) e inocuidad (todas las bacterias); deduciéndose que estos organismos actúan en equipo para ayudar a la planta a realizar sus funciones de forma más saludable, debido a que cada uno aporta el producto de su trabajo. Cuando la planta es sometida a la enfermedad de Punta Morada, tales los productos y/o capacidades de las bacterias endófitas promueven que los síntomas de la enfermedad no sean tan devastadores, permitiéndole completar su ciclo de vida.

Agradecimientos

Se agradece a CONACYT por el soporte económico otorgado y a la M.C. Rosalinda Serrato Flores por su apoyo técnico y participación en la reproducción de plantas de papa *in vitro* y por la asesoría brindada para la realización de los métodos, utilizados en este trabajo.

Literatura Citada

- Alexander, D. B. and Zuberer, D. A. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils* 12: 39-45.
- Alfreider, A., Vogt, C., Geider-Kaiser, M., Psenner, R. 2009. Distribution and diversity of autotrophic bacteria in groundwater systems based on the analysis of PubisCO genotypes. *Systematic and Applied Microbiology* 32:140-150.

- Avoscan, L., Untereiner, G., Degrouard, J., Carriere, M., Gouget, B. 2007. Uranium and selenium resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34. *Toxicology Letters*. Abstracts of the 44th Congress of the European Societies of Toxicology 172(1):S157.
- Berg, G., Eberl, L. and Hartmann, A. 2005a. The rizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology* 7(11):1673-1685.
- Berg, G., Krechel, A., Ditz, M., Sikora, R. A., Ulrich, A., Hallmann, J. 2005b. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Ecology* 51:215-229.
- Birnboim, H. C. and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7(6): 1513-1523.
- Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. 2005. *Bergey's manual of systematic bacteriology. The proteobacteria. Part C. The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria. Vol. 2. Second Ed.* Springer-Verlag. New York. 1388p.
- Buckenhüskes, H. J. 2005. Nutritionally relevant aspects of potatoes and potato constituents. pp. 17-26. // Haverkort, A. J., Struik PC (Eds.) *Potato in progress. Science meets practice.* Wageningen Academic Publishers, Wageningen. The Netherlands.
- Chowdhury, S. P., Schmid, M., Hartmann, A., Tripathi, K. 2007. Community associated with roots of *Lasiurus sinducus*, a perennial grass of Thar Desert, India. *Microbial Ecology* 54: 82-90.
- Cubaka-Kabagale, A, Vander-Wauven, C., van Vliet, F., Droogmans, L., Lumbu-Simbi, J. B., Mergeay, M., Verbruggen, N. 2008. Bacteria-plant associations in the Katangese copper belt. Mini-symposium. *Cupriavidus metallidurans: a unique γ -proteobacterium, appearing where you least expect it.* Mol, Belgium, April 21-23, 2008 (Abstract).
- Dandie, C. E., Burton, D. L., Zabarth, B. J., Trevors, J. T., Goyer, C. 2007. Analysis of denitrification genes and comparison of *nosZ*, *cnorB* and 16S rDNA from culturable denitrifying bacteria in potato cropping systems. *Systematic and Applied Microbiology* 30(2):128-138.
- De Boer, S. H. and Copeman, R. J. 1974. Endophytic bacterial flora in *Solanum tuberosum* and its significance in bacterial ring rot diagnosis. *Canadian Journal Plant Science* 54:115-122.
- Dworkin, M, Falkow, S, Rosenberg, E., Schleifer, K-H., Stackebrand, E. 2006. *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes. Volume 3. Third Edition.* Springer. New York, USA. 1146p.
- Dworkin, M., Foster, J. W. 1958. Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. *Journal of Bacteriology* 75:592-603.
- Estévez, A., González, M., Hernández, M., Castillo, J., Moré, O. y Cordero, M. 2001. Estrategia para el desarrollo del mejoramiento de la papa. *Granma Ciencia* 5: 21-30.

- Harwood, C. R., Cutting S. M. 1990. Molecular biological methods for *Bacillus*, John Wiley & Sons, Chichester, UK. 450p.
- Hooker, W. J. 1981. Compendium of potato diseases. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minn. 125p.
- Kim, B-Y., Weon, H-Y., Yoo, S-H., Lee, S-Y., Kwon, S-W., Go, S-J., Stackebrandt, E. 2006. *Vaiovorax soli* sp. Nov., isolated from greenhouse soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56:2899-2901.
- Lee, I.-M., Bottner, K. D., Secor, G., Rivera Varas, V. 2006. '*Candidatus* Phytoplasma americanum', a phytoplasma associated with a potato purple top wilt disease complex. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56:1593-1597.
- Martínez-Soriano, J. P., Leyva-López, N. E., Zavala-Soto, M. E. 1999. Detección molecular del agente causal del síndrome "bola de hilo" de la papa en semillas infectadas y asintomáticas. Biotecnología Aplicada 16:93-96.
- Munyaneza, J. E., Crosslin, J. M., Lee, I.-M. 2007. Phytoplasma diseases and insect vectors in potatoes of the Pacific northwest of the United States. Bulletin of Insectology 60(2):181-182.
- Penrose, D. M. and Glick B. R. 2003. Physiologia Plantarum. Methods for isolation and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria 118:10-15.
- Reiter, B., Pfeifer, U., Schwab, H., Sessitsch, A. 2002. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. Applied and Environmental Microbiology 68(5):2261-2268.
- Rincón, A., Arenal, F., González, I, Manrique, E., Lucas, M. M., Pueyo, J. J. 2008. Diversity of rhizobial bacteria isolated from nodules of the Gypsophyte *Ononis tridentata* L. growing in Spanish soils. Microbial Ecology 56(2):223-233.
- Scherer, J. and Nies, D. H. 2008. Relevance of the four Pb (II)/Zn(II)/Cd(II) P-type ATPases for cadmium, cobalt or zinc detoxification in *Cupriavidus metallidurans* CH34. Mini-symposium. *Cupriavidus metallidurans*: a unique α -proteobacterium, appearing where you least expect it. Mol, Belgium, April 21-23, 2008.
- Schmalenberger, A., Kertesz, M. A. 2007. Desulfurization of aromatic sulfonates by rhizosphere bacteria: high diversity of the *asfA* gene. Environmental Microbiology 9(2):535-545.
- Secor, G. A. and Rivera-Varas, V. V. 2004. Emerging diseases of cultivated potato and their impact on Latin America. Suplemento Revista Latinoamericana de la Papa.
- Sessitsch, A., Reiter B., Berg, G. 2004. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. Canadian Journal of Microbiology 50:239-249.

- Sturdy, M. L. and Cole, L. J. 1974. Studies on endogenous bacteria in potato tubers infected by *Phytophthora erythroseptica* Pethybr. *Annals of Botany* 38:121-127.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173(2):697-703.
- Van Gijssel, J. 2005. The potential of potatoes for attractive convenience food: focus on product quality and nutritional value. pp. 27-32. // Haverkort, A. J., Struik PC (Eds.) *Potato in progress. Science meets practice*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.
- Xie, C-H., Yokota, A. 2006. *Zoogloea orizae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from rice paddy soil, and reclassification of the strain ATCC 19623 as *Crabtreeella saccharophila* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56(3):619-624.
- Zakhia, F., Jeder, H., Willems, A., Gillis, M., Dreyfus, B., de Lajudie, P., 2006. Diverse bacteria associated with root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for nifH-like gene within the genera *Microbacterium* and *Starkeya*. *Microbial Ecology* 51(3): 375-93.

CONCLUSIONES GENERALES

- Se elaboraron medios de cultivos apropiados para el aislamiento de bacterias endófitas de papa; sin embargo, la alta dependencia de muchas de ellas, por su hospedero, provocó su efímera sobrevivencia en dichos medios.

- Se logró realizar una caracterización fisiológica de bacterias endófitas de papa asociadas a punta morada, además de caracterizaciones complementarias y una identificación molecular con base en el gen 16S ADNr.

- La mayoría de las bacterias endófitas encontradas en plantas de papa con síntomas de Punta Morada mostraron, mediante trabajos de laboratorio e invernadero, tener cualidades para promover crecimiento.

- Las bacterias endófitas de papa asociadas a punta morada no generaron síntomas de enfermedad en plantas inoculadas.

- Los resultados recabados en este trabajo son insuficientes para ofrecer un veredicto final referente a la función de las bacterias endófitas encontradas en plantas de papa con síntomas de punta morada, sin embargo, las observaciones apuntan a que dicha carga microbiana encontrada en estas plantas tienden a proteger su hábitat. Lo cual concuerda con trabajos donde se prueba la respuesta de bacterias endófitas de papa contra agentes fitopatógenos (Reiter, 2002; Sessitsch, 2004) y contra estrés abiótico en Chile (Sziderics, 2007).

- Comparar a las bacterias endófitas aisladas en plantas de papa enfermas de punta morada, en este estudio, en contraste con las encontradas en plantas de papa sana (De Boer and Copeman, 1974; Hollis, 1951; Long, 1988; Sturz, 1995), se observa un cambio en la composición microbiana endófitas de las mismas, o al menos existe una alteración en las concentraciones originales, desencadenado posiblemente a cambios metabólicos que sufre la planta en consecuencia de la enfermedad.

- Existen bacterias endófitas que, después de cierto tiempo, perdieron su capacidad para crecer en los medios de cultivo. De esto se asume que la planta y esas bacterias son organismos relacionados estrechamente a causa de una evolución conjunta generada, tal vez, por razones de cooperación metabólica; lo cual generó una especialización tal que impide que ésta última sobreviva mucho tiempo sin su anfitrión, conduciendo, a su vez, a considerar que existen otras innumerables bacterias plenamente incultivables en los medios de cultivo artificiales considerados.

- La presencia de bacterias endófitas en papa, las cuales, en ciertas condiciones, son patógenas en humanos (Schleifer, 1975), deja una laguna cognoscitiva respecto al límite establecido entre organismo benigno y patógeno. Sin embargo, se puede pensar que estos organismos están capacitados para hacer relaciones con otros individuos, y de no poder ser de beneficio mutuo, adaptan su supervivencia por medio del parasitismo.

- Es necesario considerar ensayos más detallados para definir plenamente la función que desempeña cada organismo endófito aislado, tal es el caso de más pruebas bioquímicas, fisiológicas y considerar los efectos generados en plantas de papa, cuando éstas son inoculadas por el consorcio.

RESUMEN

La papa (*Solanum tuberosum*L.) forma parte de los principales cultivos alimenticios a nivel mundial. Se encuentra asociada con una gran diversidad de organismos de naturaleza muy variada de donde, la asociación de parasitismo es comúnmente la más destacada en el ámbito fitopatológico. No obstante, la papa mantiene otras asociaciones simbióticas incluyendo aquellas con características particulares de mutualismo. Estas simbiosis generalmente ocurren fuera de la planta, sin embargo, existe un grupo de organismos que viven dentro de ella, llamados endófitos, los cuales también tienen importancia fitopatológica debido a la estimulación de crecimiento de la planta y actividad antagonista. Este trabajo hace énfasis en la identificación y estudio de las bacterias endófitas de papa asociadas a plantas con sintomatología de Punta Morada; dado que permiten un alto nivel de supervivencia de plantas enfermas. Se aislaron bacterias de superficie esterilizada de plantas de papa en medios de cultivo naturales, se les practicaron caracterizaciones morfológicas colonial y microscópica; fisiológica de resistencia a antibióticos, sobrevivencia a concentraciones de dextrosa y tiempo de generación poblacional; molecular; de patogenicidad y promoción de crecimiento. Los análisis de las secuencias del gen 16S ADN proyectaron la presencia de *Labrys*, *Shinella*, *Ralstonia*, entre otros. Los resultados obtenidos demuestran que dichas bacterias no producen enfermedad a las plantas de papa, algunas son promotoras de crecimiento y/o tienen actividad antagonista contra algunos patógenos. Incitando a pensar que las bacterias endófitas encontradas ayudan a mantener viva a la planta aún con la sintomatología de Punta Morada.

LITERATURA CITADA

- Almeida-León, I. H., Sánchez-Salas, J. A., Garzón-Tiznado, J. A. 2008. Vectores causantes de punta morada de la papa en Coahuila y Nuevo León, México. *Agricultura Técnica en México*. 34(2):141-150.
- Andreote, F. D., de Araújo, W. L., de Azevedo, J. L., van Elsas, J. D., da Rocha, U. N. and van Overbeek, L. S. 2009. Endophytic colonization of potato (*Solanum tuberosum* L.) by a Novel Competent Bacterial Endophyte, *Pseudomonas putida* Strain P9, and Its Effect on Associated Bacterial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(11):3396-3406.
- Bacon, C. W. and Hinton, D. M. 2007. Bacterial endophytes: the endophytic niche, its occupants, and its utility. In: *Plant-associated bacteria*. Ed. Samuel S. Gnanamanickam. Springer. The Netherlands. pp. 155-194.
- Berg, G., Krechel, A., Ditz, M., Sikora, R. A., Ulrich, A., Hallmann, J. 2005. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Ecology*. 51:215-229.
- Bills, G. F. 1996. Isolation and analysis of endophytic fungal communities from woody plants In: *Endophytic fungi in grasses and woody plants*. Eds. Redlin, S. C., Carris, L. M. St Paul, Minnesota: APS Press. pp 31–65.
- Cadena-Hinojosa, M. A., Guzmán-Plazola, R., Díaz-Valasis, M., Zavala-Quintana, T. E., Magaña-Torres, O. S., Almeyda-León, I. H., López-Delgado, H., Rivera-Peña, A., Rubio-Covarrubias, O. 2003. Distribución, incidencia y severidad del pardeamiento y la brotación anormal en los tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) en valles altos y sierras de los Estados de México, Tlaxcala y el Distrito Federal, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21(3):248-259.
- Canny, M. J., Huang, C. X. 1993. What is in the intercellular spaces of roots? Evidence from the cryo-analytical-scanning electron microscope. *Physiologia Plantarum*. 87: 561–568.
- Canny, M. J., McCully, M.E. 1988. The xylem sap of maize roots: its collection, composition and formation. *Australian Journal of Plant Physiology*. 15:557–566.
- Chelius, M. K. and Triplett, E. W. 2001. The diversity of Archaeae and Bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. *Microbial Ecology*. 41:252-263.
- Dandie, C. E., Burton, D. L., Zabarth, B. J., Trevors, J. T., Goyer, C. 2007. Analysis of denitrification genes and comparison of nosZ, cnorB and 16S rDNA from culturable denitrifying bacteria in potato cropping systems. *Systematic and Applied Microbiology*. 30(2):128-138.

- De Boer, S. H. and Copeman, R. J. 1974. Endophytic bacterial flora in *Solanum tuberosum* and its significance in bacterial ring rot diagnosis. *Canadian Journal Plant Science*. 54:115-122.
- French, E., Gutarra, L., Aley, P. 1997. Enfermedades bacterianas en la producción de tubérculos-semillas. Producción de Tubérculos-semilla de Papa. Manual de Capacitación. Fascículo 3.4. Centro Internacional de la Papa. 11pp.
- Forchetti, G, Masciarelli, O., Alemano, S., Alvarez, D., Abdala, G. 2007. Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.) isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Applied Microbial Biotechnology*. 76:1145-1152.
- Girsova, N. Bottner, K. D., Mozhaeva, A., Kastayeva, T. B., Owens, R. A., Lee, I.-M. Molecular detection and identification of group 16SrI and 16SrXII phytoplasmas associated with diseased potatoes in Russia. *Plant Disease*. 92(4):654.
- Glick, B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 41:109-117.
- Gupta, R. S. 2002. Phylogeny of Bacteria: Are we now close to understanding it? *ASM News*. 68:284-291.
- Hallmann, J, Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. F., Kloepper, J. W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*. 43:895-914.
- Haverkort A. and Wiersema, S. 2007. Sustainable potato production in Mexico. Wageningen University and Research Centre. The Netherlands. 16pp.
- Hijmans, R. J. and Spooner, D. M. 2001. Geographic distribution of wild potato species. *American Journal of Botany*. 88(11):2101-2112.
- Holl, F. B. and Chanway, C. P. 1992. Rhizosphere colonization and seedling growth promotion of lodgepole pine by *Bacillus polymyxa*. *Canadian Journal of Microbiology*. 38:303-308.
- Hollis, J. P. 1951. Bacteria in healthy potato tissue. *Phytopathology*. 41:350-366.
- Hooker, W, J. 2001. Compendium of potato diseases. American Phytopathological Society Press.
- Jones, P., Arocha, Y., Antesana, O., Montellano, E., Franco, P. 2005. 'Brotos grandes' (big bud) of potato: a new disease associated with a 16SrI-B subgroup phytoplasma in Bolivia. *Plant Pathology*. 54:234.
- Kakizawa, S., Oshima, K., Jung, H.-Y., Suzuki, S., Nishigawa, H., Arashida, R., Miyata, S.-i., Ugaki, M., Kishino, H., Namba, S. 2006. Positive selection acting on a surface membrane protein of the plant-pathogenic phytoplasmas. *Journal of Bacteriology*. 188(9):3424-2428.

- Kaur, S. and Mukerji, K. G. 2004. Potato diseases and their management. Disease management of fruits and vegetables. Vol. 1. Ed. K. G. Mukerji. Kluwer Academic Publisher. Netherlands. pp.233-280.
- Khadhair, A.-H., Duplessis McAlister.P., Among-Nyarko, K., Bains, P. 2003. Transmission and characterization of phytoplasma diseases associated with infected potato cultivars in Alberta. *Acta Horticulturae*. 619:167-176.
- Ladha, J. K. and Reddy, P. M. 1995. Introduction: assessing opportunities for nitrogen fixation in rice a frontier project. *Plant and Soil*. 194:1-10.
- Lebuhn, M., Heulin, T. and Hartmann, A. 1997. Production of auxin and other indole and phenolic compounds by *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from different proximity to plant roots. *FEMS Microbiology Ecology*. 22:325-334.
- Lee, I.-M. 2000. Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. *Annual Review of Microbiology*. 54:221-255.
- Lee, I.-M., Botner, K. D. 2004. Clover Proliferation Group (16SrVI) Subgroup A (16SrVI-A) Phytoplasma is a probable causal agent of Potato Purple Top disease in Washington and Oregon. *Plant Disease*. 88(4):429.
- Lee, I.-M., Bottner, K. D., Secor, G., Rivera Varas, V. 2006. '*Candidatus* Phytoplasma americanum', a phytoplasma associated with a potato purple top wilt disease complex. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56:1593-1597.
- Lee, I.-M., Davis, R. E. 1986. Prospects for in vitro culture of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms. *Annual Review of Phytopathology*. 24:339-354.
- Leifert, C., Li, H., Chidburee, S., Hampson, S., Workman, S., Sigee, D. 1995. Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. *Journal of Applied Bacteriology*. 78:97-108.
- Lepka, P., Stitt, M., Moll, E. and Seemüller, E. 1999. Effect of phytoplasmal infection on concentration and translocation of carbohydrates and amino acids in periwinkle and tobacco. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 55:59-68.
- Leyva-López, N. E., Ochoa-Sánchez, J. C., Leal-Klevezas, D. S., Martínez-Soriano, J. P. 2002. Multiple phytoplasmas associated with potato diseases in Mexico. *Canadian Journal of Microbiology*. 48:1062-1068.
- Long, R. D., Curtin, T. F., Cassells, A. C. 1988. An investigation of the effects of bacterial contaminations on potato nodal cultures. *Acta Horticulturae* 225:83-91.

- Madore, M. and Webb, J. A. 1981. Lead free space analysis and veins loading in *Cucurbita pepo*. Canadian Journal Botany. 59:2550-2557.
- Manoharachary, C. and Mukerji, K. G. 2006. Rhizosphere Biology - an Overview. In: Microbial activity in the rhizosphere. Ed. K. G. Mukerji, C. Manoharachary, J. Singh. Springer. Germany.
- Maust, B. E., Espadas, F., Talavera, C., Agular, M., Santamaría, J. M. and Oropeza, C. Changes in carbohydrate metabolims in coconut palm infected with the letal yellowing phytoplasma. Phytopathology. 93:976-981.
- MacCully, M. E. 2001. Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. Australian Journal of Plant Physiology. 28:983-990.
- McInroy, J. A. and Kloepper, J. W. 1995. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. Plant and Soil. 173:337-342.
- Munyaneza, J. E. 2006. Impact of the Columbia Basin potato purple top phytoplasma on potato tuber processing quality. Potato Country USA. 22:12-13.
- Munyaneza, J. E., Crosslin, J. M., Lee, I.-M. 2007. Phytoplasma diseases and insect vectors in potatoes of the Pacific northwest of the United States. Bulletin of Insectology. 60(2):181-182.
- Ortiz-Medina, E., Sosle, V., Raghaven, V., Donnelly, D. J. (2009). A method for intercultur comparison of potato tuber nutrient content using specific tissue weighth proportions. Journal of Food Science. 74(5):S177-S181.
- Podile, A. R. and Kishore, G. K. 2007. Plant growth-promoting rhizobacteria. In: Plant-associated bacteria. Ed. Samuel S. Gnanamanickam. Springer. The Netherlands. pp. 195-230.
- Reiter, B., Pfeifer, U., Schwab, H., Sessitsch, A. 2002. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. Applied and Environmental Microbiology. 68(5):2261-2268.
- Rubio-Covarrubias, O., Almeida-León, I. H., Ireta-Moreno, J., Sánchez Salas, J. A., Fernández-Sosa, R., Borbón-Soto, J. T. 2006. Distribución de la punta morada y *Bactericera cockerelli* Sulc. en las principales zonas productoras de papa en México. Agricultura Técnica en México. 32(2):201-211.
- Scott, G.J., 2002. Maps, models and muddles: World trends and patterns in potatoes revisited. Potato Research 45: 45-77.
- Schleifer, K. H. and Kloos, W. E. 1975. Isolation and characterization of Staphylococci from human skin. International Journal of Systematic Bacteriology. 25(1):50-61.
- Secor, G. A. and Rivera-Varas, V. V. 2004. Emerging diseases of cultivated potato and their impact on Latin America. Suplemento Revista Latinoamericana de la Papa.

- Sessitsch, A., Reiter B., Berg, G. 2004. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. *Canadian Journal of Microbiology*. 50:239-249.
- Shen, W. C., and Lin, C. P. 1993. Production of monoclonal-antibodies against a mycoplasma-like organism associated with sweet-potato witches-broom. *Phytopathology*. 83:671-675.
- Stone, J. K., Bacon, C. W. and White, J. F. Jr. 2000. *Microbial endophytes*. New York. p 487.
- Singh, G. and Mukerji, K. G. 2006. Root Exudates as Determinant of Rhizospheric Microbial Biodiversity. In: *Microbial activity in the rhizosphere*. Ed. K. G. Mukerji, C. Manoharachary, J. Singh. Springer. Germany.
- Strange, R. N., Scott, P. R. 2005. Plant disease: a threat to global food security. *Annual Review of Phytopathology* 43:83–116
- Struik, P. C. 2006. Trends in agricultural science with special reference to research and development in the potato sector. *Potato Research*. 49:5-18.
- Sturz, A. V. 1995. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. *Plant and Soil*. 175: 257-263.
- Sturz, A. V., Christie, B. R. and Mathenson, B. G. 1998. Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. *Canadian Journal of Microbiology*. 44(2):1622-167.
- Sturz, A. V., Christie, B. R. and Nowak, J. 2000. Bacterial Endophytes: Potential Role in Developing Sustainable Systems of Crop Production. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 19(1):1-9.
- Sturz, A. V., Peters, R. D., Carter, M. R., Sanderson, J. B., Matheson, B. G. and Christie, B. R. 2005. Variation in antibiosis ability, against potato pathogens, of bacterial communities recovered from the endo- and exoroots of potato crops produced under conventional versus minimum tillage systems. *Canadian Journal of Microbiology*. 51:643-645.
- Sziderics, A. H., Rasche, F., Trognitz, F., Sessitsch, A, and Wilhelm, E. 2007. Bacterial endophytes contribute to abiotic stress adaptation in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Canadian Journal of Microbiology*. 53:1195-1202.
- V. Borges, M. de L. 1972. Mycoplasma and potato diseases. *Potato Research*. 15:187-199.
- Vessey, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*. 255:571-586.

Welliver, Ruth. 1999. Diseases caused by phytoplasmas. Regulatory Horticulture. Plant Pathology Circular No. 82. 25(1):17-22.

Yang, J., Klopper, J. W. and Ryu, C.-M. 2008. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. Trends in Plant Science.14(1):1-4.