

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

María Isabel Notario-Zacarías<sup>1</sup>, Alberto Flores-Olivas<sup>1\*</sup>, Gabriel Gallegos-Morales<sup>1</sup>, Oswaldo García-Martínez<sup>1</sup>, Víctor Olalde-Portugal<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro 1923. Col. Buenavista, 25315, Saltillo, Coah., México. Apdo. Postal 342. <sup>2</sup>Laboratorio de Bioquímica Ecológica, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Unidad Irapuato, 36500, Irapuato, Gto., México. E-mail: aflooli@uaaan.mx (\*Autor responsable)

## Abstract

*Isolation and Characterization of Endophytic Bacteria Associated with Purple Top Symptoms in Potato.* The potato (*Solanum tuberosum* L.) is a very important crop for mankind since, by its volume of production ranks fourth worldwide. It is severely attacked by the purple top disease (PTD), causing big economical losses and increasing production costs. It is considered that phytoplasmas are the main etiological agent of PTD. In a first attempt to isolate phytoplasmas using natural culture media, a lot of endophytic bacteria showed up, but there is not a known explanation of their nature. That's why the aim of this work is to do a general survey of endophytic bacteria in potato plants with PMP, and inquire about their role in them. Through the isolation and recognition of bacteria some genera were identified including: *Labrys*, *Shinella*, and *Ralstonia*. Among the performed tests were included promotion of growth, pathogenicity tests, and antagonism of some phytopathogenic fungi. The obtained results showed that these bacteria do not produce a harmful effect on the potato plants, yet some of them promote its growth and are antagonistic to some plant pathogens. It may also happen that endophytic bacteria help keeping the plant alive even when PTD symptoms are present, due to their antagonistic capacity and growth-promoting effect, since although the bacteria have only one of these capacities, the plant is enhanced with the combined benefits of them all.

**Key words:** Antagonism, bacterial niche, potato diseases, endophytic bacteria

## Resumen

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es un cultivo muy importante para la humanidad, ya que por su volumen de producción ocupa el cuarto lugar a nivel mundial, y es atacado severamente por la enfermedad punta morada (PMP), lo que ocasiona grandes pérdidas e incrementa los costos de producción. Se considera que los fitoplasmas son el principal agente etiológico de la misma. En un primer intento por aislar fitoplasmas mediante el uso de medios de cultivo naturales, se observó una gran cantidad de bacterias endófitas y, desconociéndose la explicación de su naturaleza, se propuso hacer, en este trabajo, un sondeo general de las bacterias endófitas en plantas de papa enfermas con PMP e indagar respecto a su función en ellas. A través del aislamiento y reconocimiento de las bacterias se identificaron algunos géneros, entre otros: *Labrys*, *Shinella*, y *Ralstonia*. Entre los ensayos realizados destacan la promoción de crecimiento, pruebas de patogenicidad, y antagonismo a algunos hongos fitopatógenos. Los resultados obtenidos demostraron que dichas bacterias no producen efecto perjudicial en las plantas de papa, algunas de ellas son promotoras de crecimiento y son antagónicas a algunos agentes fitopatógenos, asimismo, pudiera ser que las bacterias endófitas encontradas ayuden a mantener viva a la planta aún con la sintomatología de PMP, debido a su capacidad antagónica y al efecto promotor de crecimiento ya que, si bien las bacterias únicamente presentan alguna de estas capacidades, la planta se ve favorecida con los beneficios conjuntos.

**Palabras clave:** Antagonismo, nicho bacteriológico, enfermedades de la papa, bacterias endófitas

## Introducción

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los cultivos más importantes para la alimentación de gran parte de la población en todo el mundo, debido a que proporciona un valioso aporte de vitaminas, minerales, proteínas, aminoácidos esenciales y carbohidratos (Buckenhüskes, 2005; Van Gijssel, 2005); ocupa el cuarto lugar en la producción mundial de alimentos, después del trigo, maíz y arroz, y anualmente se producen más de 300 millones de toneladas en aproximadamente 18 millones de hectáreas. En México, también constituye uno de los cultivos más importantes, debido a su trascendencia económica y social (Estévez *et al.*, 2001) con una producción anual de aproximadamente 1 millón 480 mil toneladas, en 65 mil 700 hectáreas (SIAP, 2010).

El cultivo de la papa es susceptible a más de 300 plagas, aunque no todas ellas causan pérdidas significativas de rendimiento (Hooker, 1981). El tizón tardío, cuyo agente etiológico es *Phytophthora infestans*, es considerado actualmente como la enfermedad de mayor importancia a nivel mundial.

Sin embargo, recientemente se ha identificado en México y otros países, una sintomatología conocida como punta morada de la papa (PMP) (Lee *et al.*, 2006; Munyaneza *et al.*, 2007); inicialmente fue asociada a fitoplasmas (Martínez-Soriano *et al.*, 1999) que son el principal problema fitosanitario por combatir. La relevancia de esta enfermedad radica en el daño a la producción, así como a la calidad del tubérculo.

Debido a la importancia reviste, muchos investigadores se han dedicado a estudiar sus agentes etiológicos; es así como este trabajo se suma a la tarea de indagar más respecto a los microorganismos que se encuentran presentes en el torrente del floema de las plantas que presentan la sintomatología de PMP, 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 licuaron 50 g de tejido vegetal, incluyendo hojas, tallos, brotes terminales, raíces y tubérculos, usando como medio base sales Dubo, cuyos constituyentes son:  $K_2HPO_4$ , 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  $L^{-1}$  de agua destilada, a un pH de 6.7. El licuado se centrifugó dos veces a 10,000 rpm por 6 min. El sobrenadante se aforó a un litro, con el medio de sales y 18 g de agar; después se esterilizó en autoclave

por 20 min, y antes del vaciado en placa, se adicionaron 50  $\mu$ g L de ampicilina.

Se prepararon cuatro medios: los dos primeros incluyeron los jugos de tejidos aéreos de la planta; a uno de ellos se agregó aceite de aguacate al 1 %; los dos medios restantes contenían los jugos de tejidos subterráneos, y de los cuales uno tiene aceite de aguacate al 1 % como agente de tensión en el medio, agregado antes de esterilizar.

### Aislamiento y Purificación de Bacterias

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

### Selección de Aislados Bacterianos

Las cepas aisladas se traspasaron a cada uno de los medios de cultivo; se observó la morfología colonial en ellas y se seleccionaron las que mostraron morfología diferente. Después se sembraron en medio papa-dextrosa-agar (PDA) para observar su capacidad de crecimiento en medios convencionales para una posterior manipulación en ellos.

### Caracterización General e Identificación Molecular

**Morfología colonial, celular y prueba de Gram.** Los aislados bacterianos se sembraron en placas con PDA por el método de estría cruzada y se incubaron a 28 °C. La prueba de Gram y descripción de forma y tamaño celular se realizaron en aislados que crecieron durante 24 h. La morfología colonial se describió en aislados de 48 h de crecimiento; las variables consideradas fueron: tamaño, color, forma, bordes, elevación, superficie, aspecto, luz transmitida, consistencia y luz reflejada.

**Tiempo de generación.** Se inocularon matraces de Erlenmeyer de 250 mL, conteniendo 80 mL de caldo nutritivo preparado con 2.5 g de extracto de levadura; 5.0 g de peptona de caseína y 1.0 g  $L^{-1}$  de glucosa, con 1 mL de cultivo de cada aislado, crecido durante la noche; se incubaron a 28 °C y centrifugaron a 170 rpm. La siembra se hizo en placa con agar nutritivo en un contador de colonias Autoplate 4000 Automated Spiral Plater (Spiral

Biotech). El crecimiento poblacional bacteriano se midió con absorbancia a 640 nm; el conteo de unidades formadoras de colonia por mL (UFC mL<sup>-1</sup>) se realizó cada 3 h 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<sup>-1</sup> se hizo de acuerdo a las indicaciones del manual del Spiral Biotech. Los datos obtenidos se ajustaron de acuerdo al modelo logístico

$$\text{Verhulst-Pearl: } N = \frac{k}{1 + e^{-a \cdot (m^*t)}}$$

**Resistencia a antibióticos.** La susceptibilidad a los antibióticos se determinó utilizando multidiscos combinados BIO-RAD. Se sembraron 100 µL de cada aislado de una noche de cultivo, mediante extensión en placas de 190 mm, conteniendo agar nutritivo; se colocó un multidisco con 12 antibióticos y se incubó durante 1 h a 4 °C y posteriormente durante 24 h a 28 °C. 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 inocularon por duplicado 15 µL de cada aislado bacteriano, de una noche de crecimiento, en tubos de ensayo con 15 mL de medio de infusión de papa y seis concentraciones de dextrosa (1, 5, 10, 15, 20 y 25 %). El crecimiento se determinó con la medición de absorbancia a 640 nm en periodos de 24 h durante seis días.

**Pruebas de antagonismo ante agentes fitopatógenos.** Las pruebas se realizaron contra cepas de *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Rhizoctonia* sp. y *Pythium* sp., proporcionadas por el Laboratorio de Bioquímica Ecológica del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN). Para cada uno de los patógenos, se sembraron discos de 0.3 mm de diámetro en el centro de placas con infusión de PDA y se incubaron a 28 °C hasta alcanzar un crecimiento radial de 0.5 cm. Para confrontarlos con los aislamientos bacterianos, se trazaron dos líneas equidistantes del centro de crecimiento del hongo, en cada placa, con 15 µL 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). Los aislados bacterianos, el control negativo y *Pythium* sp. se sembraron al mismo tiempo debido al crecimiento rápido de esta alga, su medición se realizó después de 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.

**Secuenciación de la región 16S ADNr.** Se partió de la extracción de ADN cromosómico, para ello se empleó el método de Harwood y Cutting (1990) modificado. Se tomó una alícuota de cultivo bacteriano de una noche de crecimiento y se centrifugó a 14,000 rpm por 6 min. Se decantó el sobrenadante y se adicionaron a la pastilla 100 µL de buffer de lisis (NaCl, 0.1 M; EDTA, 50 mM, pH7.5) y se centrifugó por 4 min. El sobrenadante se decantó y se adicionaron 250 µL de buffer de lisis junto con 25 µL de N-sarcosina. Se mezcló con 5 µL de proteinasa K y se incubó por 10 min a temperatura ambiente; en seguida se incubó 30 min a 80 °C con agitación de 300 rpm. Posteriormente, se transfirió a hielo durante 5 min, se atemperó, se adicionaron 2 µL de RNasa y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Luego se añadieron 330 µL de una solución cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó por 10 min a 14,000 rpm.

Después se separó la fase acuosa y se agregaron 200 µL de solución cloroformo: alcohol isoamílico, se mezcló y centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min. Después de repetir este paso se agregaron 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 se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min. La pastilla se lavó con etanol al 70 %, se resuspendió en 25 µL de agua ultrapura y se almacenó a 4 °C.

La amplificación de la región del gen ADNr 16S se realizó con los iniciadores de secuencia generales Fd1 y rP2 (Weisburg *et al.*, 1991). La reacción de PCR constó de 1µL de preparación de ADN, amortiguador de Taq ADN polimerasa 1X, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, dNTPs 0.2 mM, iniciadores de secuencia 1pM, Taq ADN polimerasa 1 UDO (Invitrogen Technologies). La reacción se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones de amplificación: 5 min de desnaturalización inicial a 94 °C; 30 s de desnaturalización a 95 °C, 45 s de alineamiento a 60 °C, 1 min de extensión a 72 °C (28 ciclos) y 5 min de extensión final a 72 °C. El segmento amplificado se insertó en un vector TOPO 2.1, utilizando el Kit TOPO TA Cloning (Invitrogen) y se multiplicó en células quimiocompetentes. El vector con el inserto se aisló mediante una lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979). Se comprobó la integridad del ADN; se ajustó la concentración de ADN plasmídico a 2µg µL<sup>-1</sup> y se envió a secuenciar al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad del CINVESTAV-IPN. 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 1-aminocicloporpano-1-ácido carboxílico (ACC).** Se preparó un medio mínimo de sales DF (Dworkin y Foster, 1958) con el uso de ACC como fuente de nitrógeno (Penrose y Glick, 2003). Los aislados se sembraron mediante el depósito de 15 µL de cultivo bacteriano de una noche de crecimiento 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 3 días y se observó 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 y se incubaron a 28 °C durante 4 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 variedad Caloro BJ86 libre de residuos de productos biocidas, se desinfectó con hipoclorito de sodio al 2 % durante 2 min y se lavó dos veces con agua destilada estéril. Las semillas se colocaron en cámara húmeda para promover su germinación; posteriormente, las plántulas se trasplantaron en sustrato estéril en un invernadero. Al mismo tiempo, las plántulas se inocularon 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, cada una con 3 mL de cultivo crecido durante la noche. Las plantas se extrajeron del sustrato y se midieron las variables: volumen de raíz, número de raíces adventicias, longitud total y peso seco de raíz y vástago. Se utilizó un diseño estadístico completamente al azar y los datos se procesaron por separado mediante un análisis de varianza.

**Prueba de patogenicidad *in vitro*.** Se sub-cultivaron yemas axilares de papa variedad Fábula en tubos de crecimiento conteniendo medio de sales base Murashige y Skoog con 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) y pH ajustado a 5.7. Luego se colocaron en cámara de crecimiento con temperatura de 25 °C y fotoperiodo de 12 h. Después de tres semanas de crecimiento (aproximadamente 6 cm de altura), se inocularon con los aislados bacterianos (cultivo de una noche) y un control

negativo (infusión papa-dextrosa). Cada plántula se hirió por punción en una de sus hojas y en la parte media del tallo. Después de la inoculación, las plántulas se incubaron nuevamente durante tres semanas bajo las mismas condiciones de temperatura y fotoperiodo. Se evaluaron las siguientes variables: vigor de la plántula, síntomas de enfermedad, peso seco de plántula, longitudes del tallo y de raíz. Se utilizó un diseño completamente al azar. El vigor se estableció de acuerdo a los grupos observados en las plantas que constituyeron el experimento; en el grupo de vigor alto se consideraron plántulas con hojas grandes y tallos fuertes; en vigor medio, a plantas con hojas y tallos visiblemente menos fuertes que el grupo anterior; en medio se consideraron plantas con tallos visiblemente delgados y hojas relativamente pequeñas; las últimas dos categorías corresponden plantas etioladas (etiología media y alta), donde se consideró la longitud de la planta para integrarlo en los dos grupos: 4.6-5.6 y 6.1-11 cm, respectivamente.

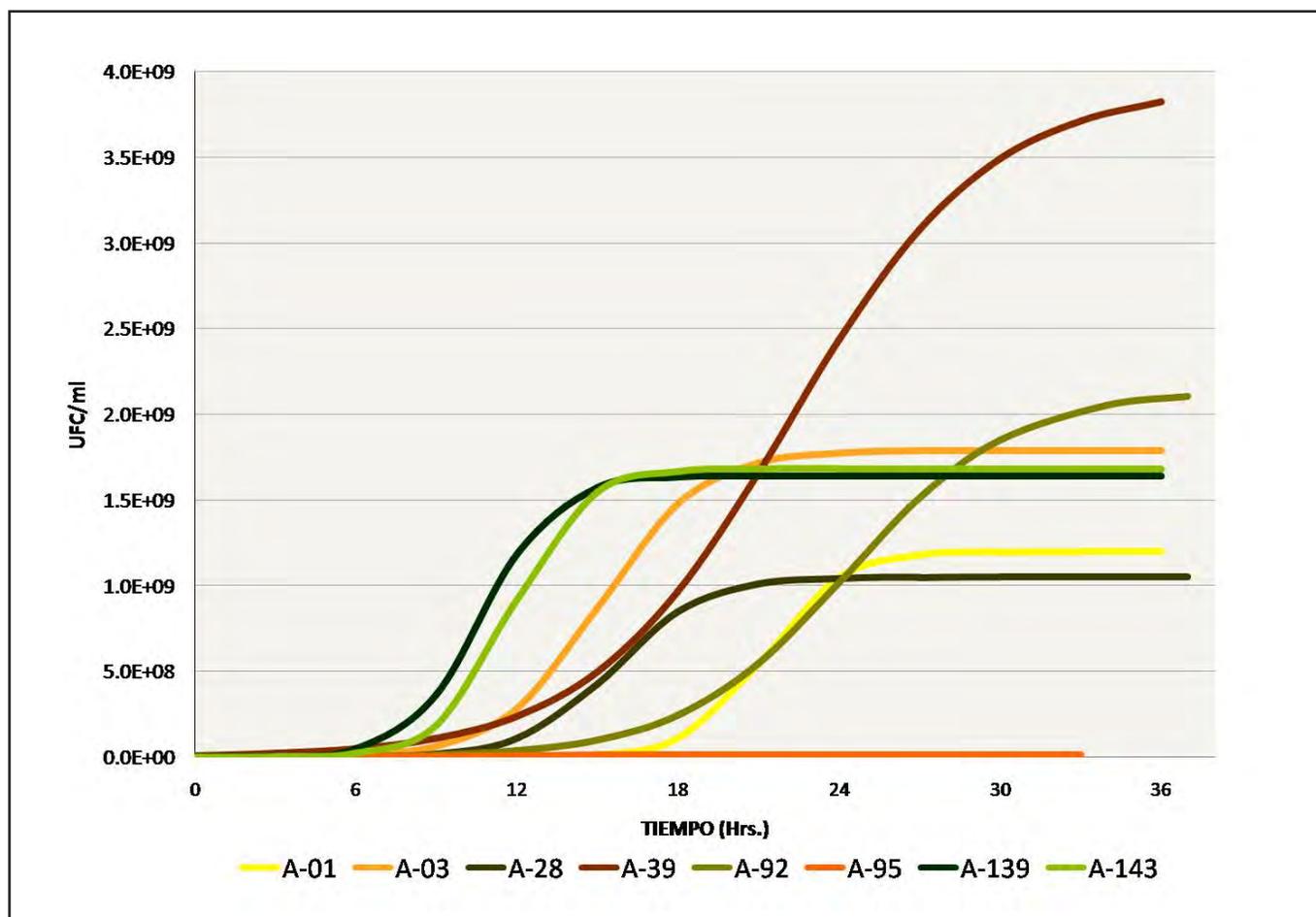
## Resultados

### Caracterización General e Identificación Molecular

Se obtuvieron ocho aislados bacterianos provenientes de plantas de papa con síntomas evidentes de PMP. En el reconocimiento molecular, se observó que los aislados tuvieron un alto parecido a *Labrys miyagiensis*, (No. de acceso AB236171); dos de ellos a *Shinella zoogloeoides* (No. de acceso EU373395); uno más fue similar a *Ralstonia metallidurans* (No. de acceso CP000353) y otros a *Bosea* sp. (No. de acceso EU373419). *Variovorax paradoxus* (No. de acceso DQ256487), *Curtobacterium flaccumfaciens*, (No. de acceso AJ310414) y *Curtobacterium* sp. (No. de acceso AJ784400).

Todos los aislados fueron Gram negativo; *L. miyagiensis* mostró una morfología de cocobacilos (1 x 1.5 µm); los aislados de *S. zoogloeoides* fueron bacilos (0.5 x 2.5-3 µm); *R. metallidurans* fue bacilo (0.5 x 2-2.5 µm), *Bosea* sp. fue cocobacilo (1 x 0.5-0.8 µm), *V. paradoxus* fue vibrio (1.5 x 0.5 µm) y *C. flaccumfaciens* y *Curtobacterium* sp. fueron cocobacilos (1 x 0.5 µm).

La morfología colonial de los aislados presentó pocas diferencias entre sí a las 48 h de crecimiento, ya que hasta ese momento en su mayoría fueron colonias extremadamente pequeñas. *L. miyagiensis* presentó un diámetro de 0.45 mm, color blanco, forma circular y borde entero; los aislados de *S. zoogloeoides* fueron de 0.69-0.88 mm de diámetro, color blanco, forma circular y borde entero; *R. metallidurans* tuvo 3.31 mm de diámetro, color beige-amarillo, forma circular y borde ondulado; *Bosea* sp. midió 0.22 mm de diámetro, presentó color blanco, forma circular y borde entero; *V. paradoxus* midió 0.24



**Figura 1.** Tiempos de generación de ocho aislados bacterianos endófitos de papa con sintomatología de punta morada de la papa. A-01 *L. miyagiensis*, A-03 *S. zoogloeoides*, A-28 *S. zoogloeoides*, A-39 *R. metallidurans*, A-92 *Bosea* sp., A-95 *V. paradoxus*, A-139 *C. flaccumfaciens*, A-143 *Curtobacterium* sp.

mm de diámetro y las demás características fueron iguales al aislado anterior; *C. flaccumfaciens* midió 2.03 mm de diámetro, de color beige-amarillo, forma circular y borde entero y *Curtobacterium* sp. midió 1.97 mm de diámetro y las demás características fueron iguales al aislado anterior.

**Tiempo de generación**

El crecimiento poblacional de los aislados se comportó de forma distinta en cada aislado. La correlación ( $R^2$ ) se

mantuvo dentro del límite 0.8-0.99. Los aislados mostraron diferencias marcadas en el número de células generado 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  $1.55 \times 10^7$  UFC  $mL^{-1}$ , en contraste con *R. metallidurans*, que alcanzó  $3.92 \times 10^9$  UFC  $mL^{-1}$  en 36 h. La Figura 1 muestra el comportamiento del crecimiento poblacional de los aislados en estudio; y el Cuadro 1 presenta las constantes para los

**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

$m = UFC mL^{-1}; k = h^{-1}$

aislados, generadas por el modelo logístico usado.

**Resistencia a antibióticos.** Todos los aislados mostraron resistencia a penicilina, ampicilina y dicloxacilina; *L. miyagiensis*, *Bosea* sp. y *V. paradoxus* fueron resistentes a enoxacina; *R. metallidurans* a netilmicina; *L. miyagiensis*, *R. metallidurans* y *V. paradoxus* a cefalotina; *L. miyagiensis*, *R. metallidurans*, *Bosea* sp. y *V. paradoxus* a gentamicina; *L. miyagiensis* y *V. paradoxus* a ceftriaxona, *S. zoogloeoides*, *C. flaccumfaciens* y *Curtobacterium* sp. presentaron resistencia intermedia a ceftriaxona; *L. miyagiensis* fue resistente a trimetoprim-sulfametoxazol, mientras que *Bosea* sp. manifestó resistencia intermedia al mismo antibiótico; *L. miyagiensis*, *S. zoogloeoides* y *V. paradoxus* fueron resistentes a eritromicina, *S. zoogloeoides* y *Bosea* sp. mostraron una resistencia intermedia a este antibiótico; *L. miyagiensis* y *R. metallidurans*, fueron resistentes a cloranfenicol y *V. paradoxus* mostró resistencia intermedia; finalmente, *R. metallidurans* presentó resistencia ante amikacina, mientras que *L. miyagiensis* y *Bosea* sp. solo mostraron resistencia intermedia. Los aislados fueron 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 dextrosa al 1 % se observó crecimiento de todos los aislados con diferentes ritmos de crecimiento. El segundo aislado de *S. zoogloeoides* fue el único que no creció en el medio con 5 % de dextrosa. En el medio con 10 y 15 % de dextrosa

crecieron *R. metallidurans*, *C. flaccumfaciens* y *Curtobacterium* sp. y en los medios con concentraciones mayores únicamente crecieron los últimos dos organismos. La capacidad de generación de células se vio disminuida en diferente grado en cada aislado a partir de la concentración de 5 % de dextrosa aplicada. En el Cuadro 2, se muestra el comportamiento en el crecimiento de los organismos ante las concentraciones de dextrosa.

Tiempo en 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.

**Pruebas de antagonismo ante agentes fitopatógenos.** La cepa de *L. miyagiensis* mostró mayor efecto antagónico contra *Pythium*, *Alternaria* y *Fusarium*; *S. zoogloeoides* contra *Alternaria*; *Bosea* sp. contra *Rhizoctonia*. Por su parte, *C. flaccumfaciens* mostró mejor capacidad antagónica contra *Pythium* y *Fusarium*; y *Curtobacterium* sp. contra *Fusarium*.

**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. zoogloeoides*, *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.

**Cuadro 2.** Desarrollo colonial de ocho 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>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)

**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 fue baja. Por otra parte, los demás aislados no lograron crecer en dicho medio.

**Efecto de estimulación de crecimiento.** Los resultados de las variables evaluadas no mostraron diferencia significativa, excepto la longitud total de raíz. Los datos analizados presentaron una dispersión de hasta un 44.39 %; *L. miyagiensis* estimuló el desarrollo de raíz en comparación con el control positivo *B. subtilis* (Kodiak), un aislado de *S. zoogloeoides*, *V. paradoxus*, *C. flaccumfaciens* y *Curtobacterium sp.*, los cuales también mostraron diferencia con respecto a *Bosea sp.*, *R. metallidurans* y el control negativo.

**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. No se encontró diferencia en peso seco de la plántula, longitud del tallo y de raíz, en su respuesta al estímulo de los aislados bacterianos. En el Cuadro 3, se presentan los grados de vigor de las plantas de papa después de 21 días de inocularles las cepas bacterianas.

## Discusión

Se trabajó con ocho aislados bacterianos debido a que en el proceso de aislamiento y purificación, muchos de ellos se tornaron incultivables. Por ello, se consideró 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 ocho 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 y Yokota, 2006); *R. metallidurans* es tolerante a altas concentraciones de metales pesados (Brenner *et al.*, 2005; Avoscan *et al.*, 2007; Scherer y 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 y Kertesz, 2007) y en aguas subterráneas (Alfreider *et al.*, 2009). *Bosea sp.* se identificó como endófito asociada a nódulos en raíces de leguminosas (Rincón *et al.*, 2008; Zakhia *et al.*, 2006), se encontró también en campos de cultivo 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 y 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, p. ej.: filósfera de malezas, pastos, caña de azúcar, cacahuate y trigo (Dworkin *et al.*, 2006). Sin embargo, en este trabajo no provocó ninguna 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, estos

**Cuadro 3.** Grados de vigor observados en plántulas de papa inoculadas con ocho bacterias endófitas, en condiciones *in vitro*.

Bacterias	Vigor alto	Vigor medio	Medio	Etiolación	Etiolación Alta
<i>L. miyagiensis</i>	*			**	*
<i>S. zoogloeoides</i>	*	**			*
<i>S. zoogloeoides</i>	*	*		**	
<i>R. metallidurans</i>	**	*			*
<i>Bosea sp.</i>	**			*	*
<i>V. paradoxus</i>	**	*		*	
<i>C. flaccumfaciens</i>	**	*			*
<i>Curtobacterium sp.</i>		*	*	**	
Control		**	*	*	

Cada asterisco representa una plántula de papa observada.

mostraron alta homología a bacterias fitopatógenas; tales como *C. flaccumfaciens* y *Erwinia amylovora*, no obstante, 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. Pero, 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 y Copeman, 1974), aunque en el presente trabajo se han encontrado otros géneros, los cuales a pesar de no haber provocado ningún síntoma de enfermedad, pudieran estar vinculados a 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 y Cole, 1974). Sin embargo, todos los aislados, mostraron actividad antagónica 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. miyagiensis* 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. miyagiensis*, 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. miyagiensis*, 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. No obstante, 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. Pero, 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 y patógenas en plantas.

## Conclusiones

Las bacterias endófitas estudiadas, tales como *L. miyagiensis*, *S. zoogloeoides*, *R. metallidurans* entre otros, 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 directa de crecimiento (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 de la papa, los productos y capacidades de las bacterias endófitas promueven que los síntomas de la enfermedad no sean tan devastadores, permitiéndole a la planta completar su ciclo de vida.

## Agradecimientos

Se agradece a CONACYT 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 en la aplicación de los métodos utilizados en este trabajo.

### Literatura Citada

- Alexander, D. B., Zuberer, D. A. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol. Fert. 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 RuBisCO genotypes. *System. Appl. Microbiol.* 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 Res.* 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, NY, USA. 1388p.
- Buckenhüskes, H. J. 2005. Nutritionally relevant aspects of potatoes and potato constituents. pp. 17-26. *In: 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  $\beta$ -proteobacterium, appearing where you least expect it. Mol, Belgium, April 21-23, 2008 (Abstract).
- Dandie, C. E., Burton, D. L., Zabarh, 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. *System. Appl. Microbiol.* 30(2):128-138.
- De Boer, S. H., Copeman, R. J. 1974. Endophytic bacterial flora in *Solanum tuberosum* and its significance in bacterial ring rot diagnosis. *Canadian J. Plant Sci.* 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, NY, USA. 1146p.
- Dworkin, M., Foster, J. W. 1958. Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. *J. Bacteriol.* 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. USA. 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. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 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. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 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. *Biotechnol. Apl.* 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. *Bull. Insectol.* 60(2): 181-182.
- Penrose, D. M., Glick B. R. 2003. Methods for isolation and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiol. Plant.* 118:10-15.
- Reiter, B., Pfeifer, U., Schwab, H., Sessitsch, A. 2002. Response of endophytic bacterial communities in po-

- tato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. Appl. Environ. Microbiol. 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., 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  $\alpha$ -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.
- Sessitsch, A., Reiter B., Berg, G. 2004. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth promoting and antagonistic abilities. Canadian J. Microbiol. 50: 239-249.
- SIAP (Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera). 2010. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola los Estado Unidos Mexicanos. Estadísticas por estado. 457 p. www.siap.gob.mx. (7 de septiembre de 2010).
- Sturdy, M. L., Cole, L. J. 1974. Studies on endogenous bacteria in potato tubers infected by *Phytophthora erythroseptica* Pethybr. Ann. Bot. 38: 121-127.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol. 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. In: 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. Int. J. System. Evol. Microbiol. 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.
-