



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Facultad de Biología

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

“Diversidad genética de bacterias endófitas cultivables en plantas de tomate (*Physalis ixocarpa* Brot.) con actividades antagónicas y promotoras de crecimiento vegetal”

TESIS DE MAESTRÍA

Como requisito para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta:

Biól. Claudia Esmeralda Hernández Pacheco

Director:

Doctor en Ciencias Gustavo Santoyo Pizano

Co Director:

Doctor en Ciencias Eduardo Valencia C

Morelia, Michoacán, Agosto 2015



ÍNDICE GENERAL

1. Resumen	1
2. Abstract	2
3. Introducción	3
4. Antecedentes	5
4.1. El cultivo de tomate en México	5
4.2. Las bacterias endófitas	8
4.3. Colonización de las bacterias endófitas	9
4.3.1. <i>Colonización de la rizósfera y del rizoplaneo</i>	11
4.3.2. <i>Colonización del córtex de la planta</i>	12
4.3.3. <i>Colonización del xilema</i>	12
4.3.4. <i>Colonización de la filósfera</i>	12
4.3.5. <i>Colonización de los órganos reproductivos</i>	13
4.4. Las bacterias endófitas y su efecto en la planta	13
4.4.1. <i>Mecanismos directos de promoción de crecimiento vegetal</i>	14
4.4.2. <i>Mecanismos indirectos de promoción de crecimiento vegetal</i>	16
5. Justificación	18
6. Objetivos	19
6.1. Objetivo general	19
6.2. Objetivos particulares	19
7. Metodología	20

7.1. Muestra de plantas	20
7.2. Aislamiento de las bacterias endófitas en los diferentes tejidos de las plantas (raíz, tallo, hoja)	20
7.3. Caracterización de las cepas endófitas	20
7.4. Determinación del mecanismo de antagonismo en cepas endófitas seleccionadas	21
7.5. Producción de sideróforos	22
7.6. Producción de proteasas	22
7.7. Determinación de indoles totales	22
7.8. Determinación del mecanismo promotor del crecimiento vegetal en bacterias endófitas seleccionadas	23
7.9. Análisis estadístico	23
8. Resultados	24
8.1. Caracterización de los aislados endófitos de tomate	24
8.2. Diversidad de bacterias endófitas en la raíz, tallo y hoja de plantas de tomate	31
8.3. Actividad antagónica sobre hongos fitopatógenos	32
8.3.1. <i>Botrytis cinerea</i>	32
8.3.2. <i>Fusarium oxysporum</i>	33
8.3.3. <i>Fusarium solani</i>	36
8.3.4. <i>Rhizoctonia solani</i>	38
8.4. Producción de sideróforos secretados por bacterias endófitas	40

8.5. Producción de proteasas	43
8.6. Producción de indoles totales	43
8.7. Las bacterias endófitas promueven el crecimiento en plantas de tomate	49
9. Discusión	52
10. Conclusiones	59
11. Referencias bibliográficas	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales enfermedades ocasionadas por hongos patógenos de plantas de tomate.	7
Tabla 2. Organismos más cercanos a los aislados endófitos, localizados en la base de datos NCBI	25
Tabla 3 Organismos más cercanos a los aislados endófitos, localizados en la base de datos NCBI.	26
Tabla 4. Organismos más cercanos a los aislados endófitos, localizados en la base de datos NCBI	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fotos representativas de la especie <i>P. ixocarpa</i> . a) Fruto, b) Flor	5
Figura 2. Enfermedades producidas por hongos patógenos de tomate verde. a) Frutos con daños producidos por <i>B. cinerea</i> b) Plantas de tomate verde con marchitamiento causado por <i>F. oxysporum</i> .	6
Figura 3. Sitios de colonización de bacterias endófitas.	13
Figura 4. Principales mecanismos de biocontrol y promoción de crecimiento mediados por las bacterias endófitas.	17
Figura 5. Curva de rarefacción del total de aislados endófitos identificados.	32
Figura 6. a), b), c), Porcentaje de inhibición de bacterias endófitas contra el fitopatógeno <i>B. cinerea</i> . d) Imágenes representativas. 1) Control (sin inocular), 2) <i>P. fluorescens</i> UM270, 3) <i>M. oxydans</i> CR13, 4) <i>S. maltophilia</i> CR70.	34
Figura 7. a), b), c), d) Porcentaje de inhibición de bacterias endófitas contra <i>F. oxysporum</i> .	35
Figura 8. Imágenes representativas de la inhibición de las bacterias endófitas contra <i>F. oxysporum</i> 1) Control (sin inocular), 2) <i>P. fluorescens</i> UM240, 3) <i>M. phyllosphaerae</i> CT3, 4) <i>L. shinshuensis</i> CH11	36

Figura 9. a), b), c), d) Porcentaje de inhibición de bacterias endófitas contra <i>F. solani</i> .	37
Figura 10. Imágenes representativas de la inhibición de las bacterias endófitas contra <i>F. solani</i> 1) Control (sin inocular), 2) <i>P. fluorescens</i> UM256, 3) <i>B. toyonensis</i> CH24, 4) <i>B. thuringiensis</i> CR99	38
Figura 11. a), b), c), d) Porcentaje de inhibición de bacterias endófitas contra <i>R. solani</i> .	39
Figura 12. Imágenes representativas de la inhibición de las bacterias endófitas contra <i>R. solani</i> 1) Control (sin inocular), 2) <i>P. fluorescens</i> UM256, 3) <i>B. thuringiensis</i> CR11, 4) <i>S. maltophilia</i> CR12.	40
Figura 13. a), b), c), d), e) Producción de sideróforos (halo de cambio de coloración mm). f) Imágenes representativas	41
Figura 14. a), b), c), d), e), f), g) Producción de proteasas (halo de degradación mm). h) Imágenes representativas	44
Figura 15. a), b), c), d), e), f), g), h), i), Producción de índoles totales en bacterias endófitas de tomate (mg/mL).	46
Figura 16. Efecto de las bacterias endófitas en el crecimiento de plántulas de tomate a) Clorofila (Unidades Arbitrarias), b) Longitud de la parte aérea (mm), c) Peso de la parte aérea (g), d) Longitud de la raíz (mm), e) Peso de la raíz (g), f) Número de raíces laterales, g) Longitud de raíces laterales (mm), h) Imágenes representativas 1) Control (plántulas sin inocular), 2) Plántulas inoculadas con <i>P. fluorescens</i> UM270, 3) Plántulas inoculadas con <i>B. vireti</i> CH21, 4) Plántulas inoculadas con <i>B. drentensis</i> CH23.	50

1. RESUMEN

Actualmente existe una creciente demanda del uso de agentes biológicos promotores del crecimiento vegetal y controladores de plagas en la agricultura, debido a los daños que causan los agroquímicos en el ambiente y la salud humana. Así, se ha propuesto el empleo de bacterias benéficas para las plantas como bioinoculantes. En particular, han llamado la atención las bacterias endófitas, las cuales tienen la capacidad de colonizar el interior de la planta sin causarle algún daño. Se han encontrado endófitos bacterianos prácticamente en todos los tejidos de la planta, teniendo un efecto positivo en las plantas ya que pueden promover el crecimiento o llegar a ser buenos agentes de biocontrol.

En este trabajo se obtuvieron 161 aislados de la raíz, tallo y hoja de plantas de tomate (*Physalis ixocarpa*). Se estimó la diversidad por medio de la amplificación y secuenciación de los genes 16S ribosomales, 145 cepas fueron analizadas, 22 de tallo, 24 de hoja y 99 de raíz. La hoja fue el tejido que presentó mayor diversidad, abundancia de 3.063 de acuerdo al índice de Shannon y dominancia de 0.9514 de acuerdo al índice de Simpson. En los tres tejidos se encontraron los phyla Actinobacteria, Firmicutes y Proteobacteria. El género predominante en los tres tejidos fue *Bacillus*. En el tallo la especie predominante fue *Leifsonia shinshuensis* con 7 aislados, en la hoja *Microbacterium phyllosphaerae* y *Paenibacillus pabuli* con 2 aislados, en la raíz, predominaron *Bacillus thuringiensis* con 31 aislados, *Microbacterium oxydans* y *Stenotrophomonas maltophilia* con 13 y 12 aislados respectivamente. Sin embargo, se encontraron especies compartidas entre los diferentes tejidos.

Las bacterias endófitas de tomate presentan características promotoras del crecimiento vegetal, el 86.9% de los aislados tienen la capacidad de producir indoles, 67.6% producen proteasas, 33.8% sideróforos; así como también poseen características antagonicas, 21.37% de los aislados presentaron un fuerte antagonismo contra *B. cinerea*, 35.9% contra *F. oxysporum* y 25.5% y 20% hacia *F. solani* y *R. solani* respectivamente; la especie *B. thuringiensis* se encontró en

Finalmente se determinó el efecto promotor del crecimiento vegetal en plantas de tomate *in vitro*. Las especies *B. drentensis* y *B. vireti* promueven el crecimiento en plántulas de tomate y son asociadas con la producción de sideróforos e indoles totales.

Palabras clave: Agroquímicos, bacterias endófitas, *Physalis ixocarpa*, promoción de crecimiento, antagonismo.

2. ABSTRACT

At the present there is an increasing demand for use of biological agents which can be plant growth promoters and pest control in agriculture, due to damage caused by chemicals in the environment and human health. Thus, it has been proposed the use of beneficial bacteria for plants as bioinoculants. In particular, the endophytic bacteria had taken a lot of attention, which are able to colonize plant internally without negatively affecting the host. Bacterial endophytes can be found at many sites in the plant, having a positive effect on plants because they can promote growth and become good biocontrol agents.

In this work we obtained 161 isolated from the root, stem and leaf of husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*). Endophytic bacterial diversity was estimated through amplification and sequencing of 16S ribosomal gene, 145 strains was analyzed, 22 of stem, leaf 24 and root 99. Leaf tissue presented the most diversity, abundance of 3,063 according to the Shannon index and dominance of 0.9514 according to Simpson index. In the three tissues the Actinobacteria, Firmicutes and Proteobacteria phyla were found. The predominant genera in the three tissues was *Bacillus*. In the stem the predominant species was *Leifsonia shinshuensis* with 7 isolated, in sheet was *Microbacterium phyllosphaerae* and *Paenibacillus pabuli* with 2 isolated, at the root, *Bacillus thuringiensis*, *Microbacterium oxydans* and *Stenotrophomonas maltophilia* was the predominant species with 31, 13 and 12 isolates respectively. However, species shared between different tissues were found.

The husk tomato endophytic bacteria present characteristics plant growth promotion, 86.9% of isolates were capable of produced indoles, 67.6%, produced proteases, 33.8% siderophores; they also have other antagonistic characteristics, 21.37% of the isolates showed a strong antagonism against *B. cinerea*, 35.9% versus *F. oxysporum* and 25.5% and 20% against *F. solani* and *R. solani*, respectively.

Finally, the plant growth promoting effect on husk tomato plants was determined *in vitro*. The species *B. drentensis* and *B. vireti* promoted husk tomato seedling growth and are associated with the production of siderophores and total indoles.

Key words: Agrochemicals, endophytic bacteria, *Physalis ixocarpa*, promote growth, antagonism.

3. INTRODUCCIÓN

La mayoría de las grandes pérdidas económicas de la industria agroalimentaria son causadas por patógenos de plantas, los cuales incluyen virus, bacterias, hongos, insectos, nematodos, entre otros. Para combatir este problema se han utilizado agroquímicos que pueden controlar o eliminar de manera eficiente dichos patógenos; así como también ayudan al crecimiento y desarrollo de la planta. Se calcula que solamente el 40% de éstos agroquímicos son utilizados por los cultivos, y el 60% restante se desecha al ambiente (Adesemoye y Kloepper, 2009), causando daños en la salud humana, contaminando suelos, fuentes de agua, disminuyendo la diversidad biológica, además, de los altos costos que representan durante la producción agrícola.

Es por ello que el uso de agroquímicos no representa una herramienta apropiada como agentes de biocontrol y promoción del crecimiento vegetal, por lo que es de gran interés la búsqueda de alternativas que no ocasionen daños; como es el caso del uso de organismos endófitos, los cuáles son definidos como aquellas bacterias que colonizan el tejido interno de la planta, sin presentar signos de infección o efectos negativos (Schulz y Boyle 2006). Estas bacterias colonizan los tejidos internos de la planta por medio de aperturas naturales como son estomas y lenticelas, y las zonas de surgimiento de las raíces laterales, o por medio de enzimas hidrolíticas capaces de romper la pared celular vegetal; dentro de los tejidos, las bacterias endófitas se pueden transportarse a través de la planta por medio del xilema (Schulz y Boyle 2006).

En cada una de las especies vegetales que se ha analizado, se han descubierto endófitos. Las bacterias endófitas tienen la capacidad de colonizar nichos similares a los patógenos, por lo que las hace adecuadas como agentes de biocontrol (Berg y col., 2005). También son capaces de promover el crecimiento vegetal ya que producen reguladores de crecimiento, sintetizan enzimas líticas, producen sideróforos, solubilizan fosfatos, entre otros. Solamente pocas plantas se han estudiado en relación con sus endófitos, comparado con el total de cerca

de 300 000 especies que habitan el planeta. Por ello la importancia de encontrar nuevos y benéficos organismos endófitos en la diversidad de las plantas en diferentes ecosistemas es considerable.

El tomate verde es de gran importancia económica, ya que forma parte de la alimentación de los mexicanos y de otros países, así como también provee de nutrientes y vitaminas esenciales para el desarrollo. Es una planta endémica de México, y se encuentra entre uno de los principales cultivos de hortalizas. Sin embargo, este cultivo es afectado por hongos, entre los que se encuentran principalmente *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium* sp., *Macrophomina phaseolina* y *Sclerotium rolfsii*, entre otros (Apodaca- Sánchez 2007) provocando en ocasiones grandes pérdidas del producto en los cultivos.

Los estudios acerca de organismos benéficos para las plantas brindan una importante contribución tanto para el conocimiento como para futuros desarrollos de estrategias biotecnológicas, teniendo como objetivo la reducción de pérdidas económicas causadas por patógenos, así como el beneficio de promover el crecimiento y desarrollo de las plantas sin causar daños.

En este trabajo de Tesis pretendemos analizar y caracterizar la diversidad endófitas cultivables de plantas de tomate verde (*Physalis ixocarpa*), las cuáles habitan no sólo las raíces de la planta, sino también otros tejidos como tallo y hojas; así como determinar sus capacidades de promoción del crecimiento vegetal y antagonismo hacia hongos fitopatógenos.

4. ANTECEDENTES

4.1. El cultivo de tomate en México

El tomate de cáscara o tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot.) es una especie anual, de 0.9 a 1.2 m de altura, el tallo es glabro, herbáceo o ligeramente leñoso en la base. Las hojas son delgadas compuestas, ovalas, lanceoladas, entre 5 y 7.5 cm de largo, dentadas y con peciolos largos de textura suave. Las flores son perfectas y hermafroditas, abiertas de 1.8 cm de diámetro, con bordes amarillos brillantes, monopétalas con corola, presentan cinco manchas de color pardo negruzco, las anteras son púrpuras; por lo general las flores están sobre pedicelos axilares, el cáliz es pentadentado, tiene cinco estambres; el estilo es delgado; el estigma casi bilobulado. El fruto es una baya amarilla o verdosa, mide de 1 a 5 cm de diámetro, de forma globosa, es liso y cubierto por el cáliz avejigado (Taboada y Oliver, 2004). El tomate verde es una fuente principal de alimentación en México y presenta un gran valor nutricional ya que contiene fósforo, calcio, hierro, sales minerales así como diversas vitaminas.



Figura 1. Fotos representativas de la especie *P. ixocarpa*, de su fruto (Izq.) y flor (Der.)

La clasificación taxonómica del tomate verde es la siguiente:

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Physalis*

Especie: *P. ixocarpa*

El género *Physalis* comprende más de 80 especies distribuidas principalmente en América, siendo México el principal centro de distribución del género con aproximadamente 70 especies.

La especie *P. ixocarpa* es originaria de México, asociada a la vertiente del Pacífico, donde aún se encuentra en forma silvestre, en una franja que va desde Centroamérica (Guatemala) hasta California (Pérez y col., 1995). SAGARPA en el 2013 reporta que el cultivo de tomate verde en México se encuentra entre una de las principales hortalizas a nivel nacional, ocupando el 6º lugar, con una producción de 248,328 toneladas anuales después del jitomate, papa, chile verde, cebolla y pepino. Entre los principales estados productores se encuentran Nayarit con una producción de 64,998 ton, Sinaloa 62,880 ton, Sonora 18,856 ton, Michoacán 17,324 ton y Jalisco 12,209 ton.

Sin embargo, existen grandes pérdidas económicas causadas por los patógenos de la planta, entre los cuales destacan virus, bacterias, nematodos, insectos y principalmente hongos. Apodaca-Sánchez y col., (2007) mencionan las enfermedades causadas por hongos que atacan la planta del tomate, siendo las mayores limitantes en la productividad, el moho gris o podredumbre causada principalmente por el hongo *Botrytis cinerea* y secadera o marchitez causada por diferentes microorganismos como son *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* entre otros (Tabla 1).

Bacterias endófitas en tomate (*Physalis ixocarpa*)

Tabla 1. Principales enfermedades ocasionadas por hongos patógenos de plantas de tomate. Apodaca y col., 2007

Hongo patógeno	Enfermedad causante	Sintomatología	Pérdidas
<i>Botrytis cinerea</i>	Moho gris pudrición	Pudrición que ataca hojas, tallos y ocasiona tizones, daños frecuentes en el pedúnculo y fruto donde se nota una esporulación abundante color café o gris. Produce "damping off"	> de 50%
<i>Fusarium solani</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Pythium</i> sp, <i>Macrophomina phaseolina</i> y <i>Sclerotium rolfsii</i>	Secadera, marchitez	Falta de germinación y pudrición de las semillas, si alcanzan a germinar las semillas, las plántulas no alcanzan a emerger o cuando emergen las plántulas muestran desarrollo raquíptico y mueren prematuramente.	> de 50%
<i>Entyloma australe</i>	Carbón blanco	Manchas redondeadas de color blanco-cremoso o amarillo pálido. Cuando la humedad es alta se aprecia una velocidad fina de color blanco-cremoso (esporas del hongo).	> de 50%
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Moho blanco	Pudrición blanda y acuosa, color pardo a café, provoca ahorcamiento de la base de los tallos y muerte de la planta completa.	> de 50%
<i>Oidium</i> sp.	Cenicilla	Hojas, tallos, peciolo y cáscara de los frutos. Pequeñas manchas color verde pálido, posteriormente presentan una capa polvorienta color blanco.	50%
<i>Cercospora physalidis</i>	Mancha de la hoja	Hojas y frutos. Manchas circulares u ovoides de color café, en forma de anillos.	20-30%

a)



b)



Figura 2. Enfermedades producidas por hongos patógenos de tomate verde. a) Frutos con daños producidos por *B. cinerea* b) Plantas de tomate verde con marchitamiento causado por *F. oxysporum*.

Para combatir estas enfermedades se han utilizado los agroquímicos, los cuales pueden controlar o eliminar de manera eficiente dichos patógenos, no obstante, causan resistencia en los patógenos, daños ambientales y a la salud humana, ya que no se toman las medidas necesarias para su aplicación y ocasionan también una disminución de la diversidad biológica. El control biológico ha sido considerado como una alternativa o una vía para reducir el uso de químicos en la agricultura. Estudios recientes han mostrado que el uso de microorganismos “benéficos” puede reducir el uso de fertilizantes químicos en una forma significativa (Adesemoye y Kloepper, 2009).

4.2. Las bacterias endófitas

La rizósfera es la porción del suelo influenciada por las raíces de las plantas, y es un ambiente altamente competitivo (Bacon y Hinton 1994), ya que alberga una gran cantidad de microorganismos (10^7 - 10^9 UFC/gr de suelo), los cuáles se encuentran en constante competencia por nutrientes y espacios.

Para adquirir ventaja sobre otros organismos de la rizósfera, algunas de las bacterias se introducen en los órganos de las plantas (ambiente protector) y llevan a cabo un estilo de vida endófito. Las bacterias endófitas son definidas como aquellas bacterias que colonizan el tejido interno de las plantas sin provocar infección o algún efecto negativo en la planta hospedera (Schulz & Boyle 2005). Pueden ser clasificadas como obligadas o facultativas; los endófitos obligados son estrictamente dependientes de la planta y su crecimiento y transmisión a otras plantas ocurre verticalmente o vía vectores; las endófitas facultativas tienen un ciclo de vida bifásico alternando entre la planta y el ambiente externo (generalmente el suelo). Las plantas constituyen una vasta diversidad de nichos para los organismos endófitos. Las bacterias endófitas han sido aisladas de una gran diversidad de plantas (Rosenblueth y Martínez-Romero 2006), y algunos autores proponen, que éstas obtienen un mayor beneficio de los endófitos que de las bacterias rizosféricas. Sin embargo, estas poblaciones endófitas son alteradas

por los diferentes tipos de suelo, dependiendo de la especie bacteriana, del estado de desarrollo del hospedero, densidad del inóculo y de las condiciones ambientales (Pillay y Nowak 1997; Tan y col., 2003).

El microbioma endófito parece ser un subconjunto del microbioma rizosférico, indicando una mayor selección de la planta para el ambiente interno (Compant y col., 2010). Más de 200 géneros bacterianos pertenecientes a 16 phyla han sido reportados como endófitas, estos incluyen tanto bacterias cultivables como no cultivables pertenecientes a Actinobacteria, Acidobacteria, Aquificae, Bacteroidetes, Chlorobi, Chloroflexi, Cyanobacteria, Deinococcus-Thermus, Firmicutes, Fusobacteria, Gemmatimonadetes, Nitrospira, Planctomycetes, Proteobacteria, Spirochaetes y Verrucomicrobiae (Sun y col., 2008; Berg y Hallman 2006; Mengoni y col., 2009; Manter y col., 2010; Sessitsch y col., 2012). Los phyla más predominantes son Actinobacteria, Proteobacteria y Firmicutes e incluyen géneros como *Azoarcus*, *Acetobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, entre otros. Los géneros endófitos más comunes son *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter* y *Pseudomonas*.

4.3. Colonización de las bacterias endófitas

Algunas especies bacterianas pueden colonizar la raíz de la planta, pero debe primeramente haber un reconocimiento por medio de compuestos específicos (como los factores nod), exudados por la raíces (De Weert 2002). Otras bacterias interactúan con las plantas para producir metabolitos secundarios como agentes necesarios para la disponibilidad de nutrientes, pueden estar implicados en la adquisición de hierro, actúan como agentes en la formación de biofilm, como toxinas, factores de virulencia (Raaijmakers 2012) o pueden intervenir en la señalización de los reguladores de crecimiento en las plantas (Glick 2012, López 2008).

Los metabolitos actúan como señales para la interacción (comunicación) entre la planta y el endófito. Estos metabolitos pueden derivarse tanto de los endófitos

debido a la interacción con la planta o bien por la planta debido a la inducción endófito o bien por síntesis bilateral (por medio de ambos). La función de los endófitos asociados a los metabolitos son: defensa y competencia, comunicación bacteriana, señalización (interacción específicas con la planta) y adquisición de nutrientes (Brader 2014)

Para la colonización de espacios en los tejidos de las plantas, las bacterias producen enzimas celulolíticas requeridas para hidrolizar las paredes exodermales, como son endoglucanasas y endopoligalacturonidasas (Mitter y col., 2013). Además, deben presentar diversas características de reconocimiento como son: la quimiotaxis, quorum sensing, síntesis de aminoácidos, flagelos, pili tipo IV requerido para el “twitching” (movimiento del microorganismo provocado por la extensión del pili), secreción de antibióticos, producción de sideróforos, lipopolisacáridos, entre otras.

Cuando las bacterias se internalizan en los tejidos vegetales, residen principalmente en el apoplasto intercelular (nicho donde la competencia con otros organismos es muy baja), incluyendo los espacios intercelulares de la pared celular, así como los vasos del xilema (sólo unas pocas tienen la capacidad de cruzar la barrera endodermal), dentro del cual pueden ser transportadas de las raíces a la parte aérea). Los endófitos usualmente no entran a las células vegetales, y sus mecanismos de colonización pueden ser variados, logrando llegar a flores, semillas y frutos. (Hallman y col., 1997; Sturz y col., 1997).

La densidad de población de los endófitos es más alta en las raíces que en otros órganos de las plantas. En las raíces, la densidad promedio es de 10^5 UFC por gramo de peso fresco, mientras que el promedio en el tallo y en las hojas es de 10^4 y 10^3 respectivamente (Hallmann y Berg 2006)

4.3.1. Colonización de la rizósfera y del rizoplano

La principal ruta de colonización usada por los endófitos es por medio de la rizósfera, sin embargo, no todas las bacterias rizosféricas tienen la capacidad de colonizar el interior de la planta, la habilidad de competir depende de la capacidad de tomar ventaja del ambiente específico o de adaptación al cambio de las condiciones. Las bacterias que logran colonizar cambian su metabolismo y se adaptan al ambiente interno de la planta (Monteiro y col., 2012, Sessitsch y col., 2012, Ferrara y col., 2012).

La habilidad de las bacterias del suelo de entrar a través de las raíces de las plantas vía motilidad induciendo la quimiotaxis y la efectiva colonización son los factores que determinan el éxito de las bacterias que llegan a ser endófitas (Bacilio-Jimenez y col., 2003). Los sitios preferenciales de entrada de las bacterias son la zona de las raíces apicales, la zona de elongación y de los pelos radiculares (zona de la colonización activa) y la zona radicular basal con pequeñas fisuras causadas por la emergencia de las raíces laterales (zona de colonización pasiva), heridas, fisuras. Después de la colonización de las raíces, las bacterias colonizan el rizoplano.

Cuando las bacterias entran en las raíces se incrementan las poblaciones por múltiples divisiones celulares, resultando en el establecimiento de una micro colonia (Hardoim 2008). La densidad de población de las bacterias cultivables rizosféricas es de 10^7 - 10^9 UFC (Benizri y col., 2001), mientras que las bacterias del rizoplano se encuentran entre 10^5 - 10^7 UFC g^{-1} de peso fresco (Benizri y col., 2001; Bais y col., 2006). Sin embargo, las poblaciones de endófitos en plantas dependen de diversos factores bióticos y abióticos.

4.3.2. Colonización del córtex de la planta

Algunas células bacterianas tienen la capacidad de cruzar la barrera exodermal, ellas pueden permanecer en el sitio de entrada o pueden ocupar espacios intercelulares del córtex (Compant y col., 2005; Gasser y col., 2011)

4.3.3. Colonización del xilema

Sólo unas pocas bacterias pueden colonizar la barrera endodermal e invadir los vasos del xilema (Compant y col., 2005; Gasser y col., 2011). En el xilema se lleva a cabo el transporte del agua, iones y compuestos orgánicos de bajo peso molecular, como son los azúcares y aminoácidos (Sattelmacher 2011).

4.3.4. Colonización de la filósfera

La filósfera o parte aérea superficial de la planta, es considerada pobre en nutrientes comparada con la rizósfera, ya que las poblaciones bacterianas se encuentran sujetas a cambios ambientales bruscos (temperatura, humedad y radiación ultravioleta); la precipitación y el viento contribuyen a la variabilidad de los microorganismos que residen en la filósfera (Lindow 1996). La superficie de las hojas es colonizada por más de 10^7 UFC/cm² (Lindow y Brandl 2003), sin embargo esta colonización es afectada por la estructura de la hoja (venas, pelos y estomas): y por lo general, la diversidad de endófitos es menor en la filósfera que en la raíz (Monteiro y col., 2012).

Algunas bacterias son capaces de entrar a la planta a través de estomas. La producción de enzimas degradadoras no específicas pueden tener la facilidad de colonizar la superficie de las hojas y el subsecuente establecimiento del microorganismo. Las bacterias pueden residir y colonizar la planta a través de flores, frutos y semillas. El phylum Proteobacteria (las clases α y β) es predominante, aunque también los Bacteroidetes y Actinobacteria son comúnmente encontrados en estas partes de la planta (Vorholt 2012).

4.3.5. Colonización de los órganos reproductivos

Si una de las células reproductivas acarrea un microorganismo endófito, el resultado es la colonización del embrión y del endospermo. Esto puede explicar la transferencia de endófitos de las plantas a las semillas.

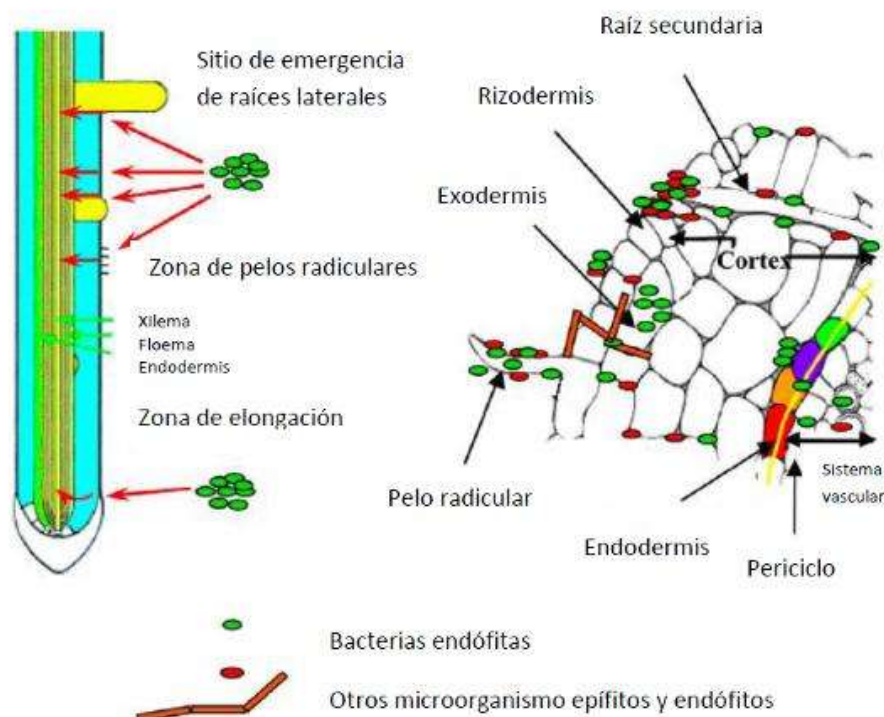


Figura 3. Sitios de colonización de bacterias endófitas (Reinhold-Hurek 1998; Compant 2007, modificado por Compant 2009).

4.4. Las bacterias endófitas y su efecto en la planta

Después del establecimiento en la planta, los endófitos pueden influenciar positivamente el crecimiento de la planta, proveer resistencia a diferentes tipos de estrés, así como biocontrol contra patógenos.

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR (por sus siglas en inglés, **Plant Growth-Promoting Rhizobacteria**) se caracterizan por su capacidad de estimular el crecimiento de las plantas a través de mecanismos de tipo directo o indirecto. La estimulación directa puede incluir fijación de nitrógeno, producción de hormonas, reducción de los niveles de etileno en el suelo, solubilización de

fosfatos y secreción de sideróforos. La estimulación indirecta incluye la competencia por nicho ecológico o sustratos, producción de antibióticos, inducción de resistencia sistémica (ISR) a un amplio espectro de patógenos y la producción de sideróforos como un mecanismo de secuestrar el hierro disponible en el medio y con esto limitar el crecimiento de microorganismos fitopatógenos. La promoción de crecimiento indirecta puede ocurrir en la presencia de patógenos, contaminantes u otros tipos de estrés.

La promoción directa de crecimiento mediada por endófitos es mayormente basada en proveer nutrientes esenciales a las plantas y/o regulación de fitohormonas.

4.4.1. Mecanismos directos de promoción de crecimiento vegetal

Los microorganismos pueden contribuir a la salud de la planta por medio de varios mecanismos directos como: fitoestimulación (producción de reguladores de crecimiento), biofertilización (fijación de nitrógeno atmosférico, solubilización de minerales como fósforo y producción de sideróforos).

Los reguladores de crecimiento vegetal o fitohormonas son compuestos orgánicos de bajo peso molecular, que actúan a bajas concentraciones e intervienen en diversos procesos biológicos como es el desarrollo de tejidos, crecimiento del tallo, senescencia de las hojas, entre otras (Purves y col., 2012; Salisbury 1994). Han sido ampliamente utilizados en la agricultura, horticultura y biotecnología para modificar y controlar el desarrollo y crecimiento de las plantas. Existen siete clases principales de reguladores de crecimiento vegetal, entre los cuáles se encuentran auxinas, giberelinas, citoquininas, brasinosteroides, ácido absísico, etileno y ácido jasmónico.

Las auxinas incluyen la formación de raíces laterales, división celular de la planta, extensión, diferenciación, estimula las semillas y el tubo germinativo, incrementa el radio del xilema y el desarrollo de las raíces, controla el crecimiento vegetativo, inicia la formación de raíces laterales y adventicias, actúa en la

fotosíntesis, formación de pigmentos, biosíntesis de varios metabolitos y resistencia a las condiciones de estrés, muchas bacterias utilizan el triptófano como precursor de auxinas. La principal auxina es el ácido indol acético (AIA).

Muchos endófitos producen AIA, así como otros reguladores incluyendo ABA (ácido abscísico), citoquininas y GBs (giberelinas); éstas últimas están involucradas en la división celular, germinación de las semillas; también poseen actividad ACC-deaminasa, la cual está relacionada en disminuir los niveles de etileno de la planta (Long y col., 2008). Los niveles elevados de etileno son causados por algunos tipos de estrés, y por lo tanto inhibe la elongación radicular y la emergencia de las raíces laterales (Ivanchenko y col., 2008).

Cuando un microorganismo ingresa a un organismo hospedero, ya sea en forma patógena o simbiótica, encuentra un ambiente favorable con acceso a prácticamente todos los nutrientes necesarios para su crecimiento a excepción del hierro. El hierro a diferencia de otras fuentes elementales para la nutrición, como el nitrógeno, fósforo, potasio y demás macro- y micronutrientes, no se encuentra de forma libre o disponible en los hospederos vegetales.

Las bacterias endófitas tienen la capacidad de producir sideróforos (del griego *sideros phoros* “portadores o acarreadores de hierro”), los cuales son moléculas de bajo peso molecular de 0.5 a 1.0 kDa, solubles en soluciones acuosas a pH neutro (Dybas y col., 1995). Son sintetizados, excretados y finalmente reabsorbidos por bacterias, principalmente Gram negativas (Drechsel y Jung 1998). Las plantas son capaces de utilizar los complejos Fe^{3+} - sideróforos bacterianos como fuente de hierro al ser internalizados en los tejidos (Wang y col., 1993).

Los factores ambientales pueden modular la síntesis de sideróforos, incluyendo el pH, el nivel de hierro y la forma de los iones de hierro, la presencia de otros elementos traza y un adecuado suministro de carbono, nitrógeno y fósforo (Duffy y Défago, 1999).

4.4.2. Mecanismos indirectos de *promoción de crecimiento vegetal*

Dentro de los mecanismos indirectos de promoción de crecimiento se encuentra la capacidad de producción de sideróforos (promueve la resistencia sistémica inducida (ISR) por lo tanto, participan en la supresión de la enfermedad por privación de hierro a los patógenos y por inducción de resistencia en la planta (Hofte y Bakker 2007), antibióticos como el 2,4 diacetilfluoroglucinol (DAPG), enzimas líticas, tales como quitinasas, celulasas, β -1,3 glucanasas, proteasas y lipasas, las cuáles lisan una porción de las paredes celulares de muchos hongos patógenos (Glick 2012).

Cuando la planta es atacada por patógenos, las bacterias endófitas desencadenan una reacción en la planta, que da un aumento a la señal de alerta y la difunde sistemáticamente, mejorando la capacidad defensiva de tejidos y evitando la subsecuente infección de algunos patógenos. Por lo que las bacterias endófitas son consideradas como antagonistas (organismos con potencial para interferir en la infección, crecimiento y supervivencia de los patógenos). Los mecanismos responsables de la actividad antagónica se encuentran: inhibición de los patógenos por antibiosis, toxinas y biosurfactantes, competencia por los sitios de colonización, nutrientes y minerales; parasitismo que incluye la producción de enzimas degradadoras de la pared celular.

La colonización de las plantas por endófitos con capacidad de biocontrol induce varias modificaciones en la pared celular, como son deposición de compuestos fenólicos, celulosa y pectina conllevando a la formación de una barrera estructural en el sitio de ataque de fitopatógenos (Benhamou y col., 1998, Benhamou y col., 2000). Otra respuesta de las plantas con bacterias endófitas es la inducción de proteínas relacionadas con la defensa como son peroxidasas, quitinasas y β -1,3- glucanasas (Fishal y col., 2010). Estas reacciones resultan en una reducción del patógeno en la planta.

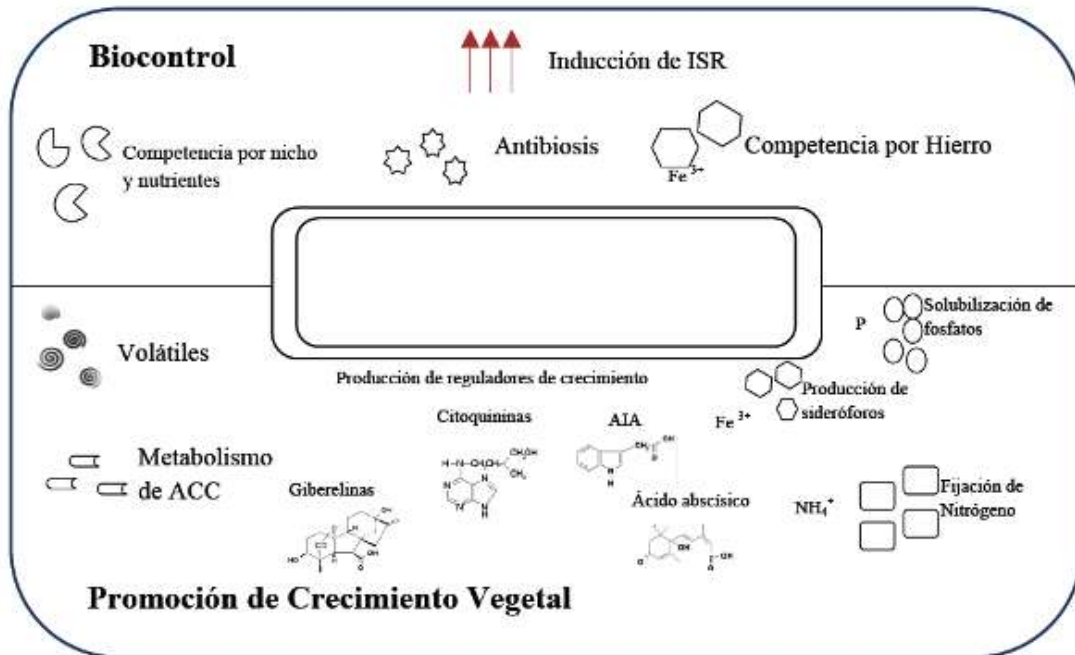


Figura 4. Principales mecanismos de biocontrol y promoción de crecimiento mediados por las bacterias endófitas (Malfanova 2013)

5. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de tomate en México es de gran importancia comercial, sin embargo se ve afectado por diferentes organismos patógenos, lo cual provoca una reducción de su productividad. Se han utilizado herramientas como son los agroquímicos para controlar los fitopatógenos, los cuáles ocasionan resistencia, efectos ambientales nocivos, así como también daños a la salud humana por su uso inadecuado. Por lo tanto, existe la necesidad de encontrar nuevos agentes capaces de controlar este tipo de organismos. Una alternativa es el uso de organismos endófitos, como son las bacterias, las cuáles promueven el crecimiento de la planta y poseen actividades antagónicas sobre fitopatógenos, sin causar daños colaterales al ambiente y la salud humana.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Determinar la diversidad de bacterias endófitas cultivables en plantas de tomate (*Physalis ixocarpa*) así como sus actividades antagónicas y de promoción de crecimiento vegetal.

6.2. Objetivos particulares

- Analizar la diversidad bacteriana en los diferentes tejidos raíz, tallo y hoja de plantas de tomate.
- Evaluar las actividades proteolíticas y antagónicas contra los fitopatógenos *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani* en los aislados de tomate.
- Determinar la producción de indoles totales y sideróforos en los aislados endófitos, así como la promoción de crecimiento.

7. METODOLOGÍA

7.1. Muestra de plantas

Las plantas de *P. ixocarpa* fueron colectadas en cultivos agrícolas de Zamora, Michoacán. Las muestras se llevaron inmediatamente al laboratorio para su análisis.

7.2. Aislamiento de las bacterias endófitas de los diferentes tejidos de las plantas (raíz, tallo y hoja)

Es importante esterilizar el tejido vegetal ya que existen bacterias que habitan en la parte superficial de los tejidos, con el fin de tener únicamente aisladas las bacterias endófitas. Para tal objetivo, se separó la raíz, el tallo y las hojas y cada uno de estos tejidos se lavaron con agua destilada, se sumergieron en 90% de etanol por 3 minutos, y se agregó una solución de hipoclorito de sodio (2.5% libre de Cl-) por 5 min y finalmente se lavaron 5 veces con agua destilada estéril. Para confirmar que el proceso de esterilización fue exitoso, del último enjuague se plaquearon 100 µL y se colocaron en caja petri con medio AN (Agar Nutritivo). Cada uno de los tejidos de las plantas fue triturado en un mortero estéril para romper la pared celular vegetal. Posteriormente, en un vial se colocó el material triturado con 1mL de agua estéril y se plaquearon 100 µL en cajas de petri con medio AN y se incubaron a 30 °C por 48-72 horas. Se realizó este experimento por triplicado.

7.3. Caracterización de las cepas endófitas

Las cepas bacterianas fueron caracterizadas molecularmente para poder determinar su posición taxonómica y filogenética por medio de la amplificación y secuenciación de los genes 16S ribosomales. Para el aislamiento y secuenciación de los genes 16S rDNA se utilizaron los oligos universales Fd1 (5'-CAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y Rd1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') correspondientes a la posición 8 a 28 y 1526 a 1542 del gen 16S rDNA de *Escherichia coli* respectivamente (Weisburg y col., 1991). Las condiciones de PCR

fueron las siguientes: 95°C 3min, 30 ciclos de 1 min a 95°C para la desnaturalización, 1 min a 53°C para alineamiento y 2 min a 72°C de extensión y un paso final de extensión a 72°C por 5 min. Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados en Langebio, Cinvestav, Unidad Irapuato. Se realizaron búsquedas por homología de las secuencias utilizando la búsqueda tipo Blast en la base de datos del GenBank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Posteriormente se realizó un Blast utilizando las bases de datos del NCBI para observar la mayor similitud con la especie a la que pertenecen. Cada secuencia analizada tuvo un mínimo de 1200 nucleótidos. Con el fin de analizar la diversidad presente en cada uno de los tejidos y observar si el muestreo fue representativo, se utilizó el programa PAST.

7.4. Determinación del mecanismo de antagonismo en cepas endófitas seleccionadas

Para determinar las actividades de antagonismo contra fitopatógenos fúngicos se utilizó la técnica de Filippi y col., 1984, y modificada por Santoyo y col., 2012. Se emplearon patógenos de tomate como *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani* in vitro. Se inoculó una porción circular de 4 mm de diámetro del micelio, de cada hongo por separado, en el centro de la caja Petri, se dejaron en crecimiento por 4 días y posteriormente se inocularon las bacterias endófitas alrededor de la caja petri y se dejaron en crecimiento por 5 días; las bacterias que presentaron halo de inhibición del crecimiento del hongo se seleccionaron y se realizó un ensayo adicional, el cual consistió nuevamente en inocular simultáneamente a forma de cruz las cepas seleccionadas y en cada cuadrante se inoculó una porción circular de 4 mm de diámetro del patógeno crecido previamente (Martínez-Absalón y col., 2012). Se dejaron por 6-9 días y se midió el crecimiento del micelio versus el crecimiento de los experimentos control sin la presencia de bacterianas.

7.5. Producción de sideróforos

Para detectar la producción de sideróforos se utilizó el medio de cultivo descrito por Alexander y Zuberer (1991). Este medio contiene CAS (Cromo Azurol S), al cual se encuentra unido el hierro formando parte del complejo Fe-CAS, de color azul, las bacterias capaces de producir sideróforos, separan el hierro del complejo produciendo un halo de cambio de coloración (anaranjado) alrededor de la zona de crecimiento de la bacteria.

Se inocularon 10 cepas en cada caja petri y se dejaron en crecimiento por 7 días; la producción de sideróforos se estima por el halo de cambio de coloración que se produce alrededor de la bacteria, el cual fue medido. Los experimentos se realizaron por triplicado.

7.6. Producción de proteasas

La actividad proteolítica es indicada por la degradación de la caseína. Para determinar la producción de proteasas de los aislados endófitos se utilizó el medio Skim-Milk y se dejaron incubando las cajas petri por 24h a 30°C, posteriormente se midió el halo de degradación de las proteasas el cuál es un halo transparente (Kamensky y col., 2003). Los experimentos se realizaron por triplicado.

7.7. Determinación de indoles totales

Los indoles totales fueron medidos utilizando el reactivo de Salkowsky. Las cepas se incubaron en 3 mL de medio caldo nutritivo (CN) adicionado con triptófano (Trp) 0.1% a 30°C, hasta alcanzar valores de densidad óptica de 1 (48h). Posteriormente, se centrifugaron las células y se conservó el sobrenadante, al cual se le agregaron 2mL de reactivo colorimétrico PC: FeCl₃ 12g/L y H₂SO₄ 7.9 M a 1 mL de sobrenadante (Glikman y Dessaux 1995). Se incubó durante 30 minutos en la oscuridad y se midió la absorbancia a 540 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado. Se realizó una curva estándar a partir de IAA (Sigma) y se calculó la cantidad de indoles producido como mg de IAA/mL DO de cultivo.

7.8. Determinación del mecanismo promotor del crecimiento vegetal en bacterias endófitas seleccionadas

Para determinar si las cepas endófitas presentan actividades promotoras del crecimiento vegetal se siguió el protocolo de Velázquez-Becerra y col., 2011 y Valencia-Cantero y col., 2007. Primeramente se esterilizaron semillas de tomate, las cuáles se pusieron a germinar en caja petri con medio MS (Murashine Skoog) 0.2x. Posteriormente se seleccionaron cinco plántulas homogéneas y de 5 días de crecimiento, se trasplantaron a caja petri con medio MS + 10% CN y se inocularon al final de la caja 10 μ L de las bacterias endófitas seleccionadas con una densidad óptica de 0.05. Se incubaron las cajas a 16 hr luz en una cámara de crecimiento Percival. Después de 7 días se aislaron las plantas y se midió el peso fresco total, la longitud y peso de la parte aérea, contenido de clorofila, longitud y peso de las raíces y también el número de raíces laterales y su longitud. Cabe mencionar que la selección de aislados se realizó de acuerdo a las diferentes capacidades que mostraron cada uno de los aislados. Para este ensayo se utilizó una n = 25 por tratamiento.

7.9. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado; los datos fueron analizados por un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía y se utilizó la prueba de Tukey usando el software STATISTICA v. 7.0.

8. RESULTADOS

8.1. Caracterización de los aislados endófitos de tomate

En el presente trabajo se determinó la diversidad de bacterias endófitas cultivables, aisladas de los tejidos de hoja, tallo y raíz de plantas de tomate. Los resultados mostraron que la mayor abundancia de aislados fue en la raíz con 884 UFC g⁻¹ de peso fresco, seguido por 435 UFC g⁻¹ de peso fresco en el tallo y finalmente la hoja con 159 UFC g⁻¹ de peso fresco. Se aislaron y seleccionaron un total de 161 cepas bacterianas, de las cuales 25 se encontraron el tejido de tallo, 28 en hoja y 108 en raíz.

Sin embargo, de este total se logró secuenciar el gen 16S ribosomal de 145 cepas, 22 de tallo (2 cepas no determinadas), 24 de hoja y 99 de raíz (5 cepas no determinadas), esto debido a la pérdida de los aislados en cada resiembra. De los 22 aislados caracterizados en el tallo, el 50% pertenecen al phylum Actinobacteria, siendo la especie *Leifsonia shinshuensis* la más abundante, con 7 aislados; también se encontraron Firmicutes y Proteobacterias con un 40% y 10% respectivamente. El género *Bacillus* fue el más predominante en el tallo (Tabla 2).

La caracterización de los aislados de hoja muestran una gran variabilidad de especies, las especies más abundantes son *Microbacterium phyllosphaerae* y *Paenibacillus pabuli* ambas cuentan con tan sólo dos aislados encontrados. 13 especies pertenecen al phylum Firmicutes, 10 son Actinobacteria y 1 especie pertenece al phylum Proteobacteria. El género *Bacillus* sigue siendo el más abundante (Tabla 3).

Bacterias endófitas en tomate (*Physalis ixocarpa*)

Tabla 2. Organismos más cercanos a los aislados endófitos, localizados en la base de datos NCBI

Nombre del aislado	Identidad	% de identidad	No. de acceso NCBI
CT1	<i>Bacillus toyonensis</i> strain BCT-7112	87%	NR_121761.1
CT1b	<i>Bacillus toyonensis</i> strain BCT-7112	93%	NR_121761.1
CT2	<i>Rhizobium nepotum</i> strain 39/7	99%	NR_117203.1
CT3	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> strain P 369/06	94%	NR_025405.1
CT3b	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> strain P 369/06	93%	NR_025405.1
CT4	<i>Leifsonia shinshuensis</i> strain DB 102	99%	NR_043663.1
CT4b	<i>Bacillus anthracis</i> str. Ames strain Ames	93%	NR_074453.1
CT5	nd		
CT6	<i>Leifsonia shinshuensis</i> strain DB 102	95%	NR_043663.1
CT7	<i>Leifsonia shinshuensis</i> strain DB 102	95%	NR_043663.1
CT8	<i>Leifsonia shinshuensis</i> strain DB 102	93%	NR_043663.1
CT9	<i>Pseudomonas poae</i> strain P 527/13	90%	NR_028986.1
CT10	<i>Microbacterium foliorum</i> strain P 333/02	94%	NR_025368.1
CT11	<i>Leifsonia shinshuensis</i> strain DB 102	89%	NR_043663.1
CT12	<i>Leifsonia shinshuensis</i> strain DB 102	92%	NR_043663.1
CT13	<i>Leifsonia shinshuensis</i> strain DB 102	88%	NR_043663.1
CT14	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain ATCC 10792	92%	NR_114581.1
CT15	nd		
CT16	<i>Bacillus circulans</i> strain ATCC 4513	97%	NR_104566.1
CT17	<i>Bacillus deserti</i> strain ZLD-8	88%	NR_117383.1
CT18	<i>Paenibacillus castaneae</i> strain Ch-32	86%	NR_044403.1
CT19	<i>Sporosarcina aquimarina</i> strain SW28	94%	NR_025049.1

Bacterias endófitas en tomate (*Physalis ixocarpa*)

Tabla 3 Organismos más cercanos a los aislados endófitos, localizados en la base de datos NCBI.

Nombre del aislado	Identidad	% de identidad	No. de acceso NCBI
CH1	<i>Rhizobium pusense strain NRCPB10</i>	99%	NR_116874.1
CH1b	<i>Bacillus safensis strain NBRC 100820</i>	95%	NR_113945.1
CH3	<i>Curtobacterium oceanosedimentum strain ATCC 31317</i>	99%	NR_104839.1
CH5	<i>Microbacterium phyllosphaerae strain P 369/06</i>	99%	NR_025405.1
CH5b	<i>Bacillus thuringiensis strain IAM 12077</i>	91%	NR_043403.1
CH6	<i>Microbacterium phyllosphaerae strain P 369/06</i>	99%	NR_025405.1
CH7	<i>Microbacterium testaceum strain DSM 20166</i>	91%	NR_026163.1
CH8	<i>Bosea robiniae strain R-46070</i>	99%	NR_108516.1
CH11	<i>Leifsonia shinshuensis strain DB 102</i>	94%	NR_043663.1
CH12	<i>Oceanobacillus polygoni strain SA9</i>	92%	NR_114348.1
CH13	<i>Bacillus firmus strain NBRC 15306</i>	93%	NR_112635.1
CH14	<i>Paenibacillus pabuli strain JCM 9074</i>	91%	NR_112164.1
CH15	<i>Paenibacillus pabuli strain HSCC 492</i>	91%	NR_040853.1
CH16	<i>Micromonospora inositola strain DSM 43819</i>	86%	NR_026280.1
CH17	<i>Micromonospora citrea strain DSM 43903</i>	94%	NR_044886.1
CH18	<i>Paenibacillus turicensis strain MOL722</i>	92%	NR_114625.1
CH19	<i>Micromonospora echinospora strain DSM 43816</i>	86%	NR_044883.1
CH20	<i>Cohnella ginsengisoli strain GR21-5</i>	93%	NR_115998.1
CH21	<i>Bacillus vireti strain R-15447</i>	94%	NR_025590.1
CH22	<i>Sporosarcina koreensis strain F73</i>	88%	NR_043526.1
CH23	<i>Bacillus drentensis strain NBRC 102427</i>	85%	NR_114085.1
CH24	<i>Bacillus toyonensis strain BCT-7112</i>	92%	NR_121761.1
CH25	<i>Brevibacterium frigoritolerans strain DSM 8801</i>	90%	NR_117474.1
CH26	<i>Streptomyces flavogriseus strain ATCC 33331</i>	93%	NR_074559.1

Bacterias endófitas en tomate (*Physalis ixocarpa*)

En el tejido de la raíz se aislaron la mayor cantidad de aislados endófitos por gramo de tejido. Se encontró que 57 aislados pertenecen al phylum Firmicutes, seguido de Actinobacteria y Proteobacteria, con 20 y 17 aislados encontrados respectivamente. El género *Bacillus* es el más predominante, seguido por *Pseudomonas*, *Microbacterium* y *Arthrobacter*. Entre las especies más abundantes se encuentran *Bacillus thuringiensis* con 31 aislados, *Microbacterium oxydans* con 13 y *Stenotrophomonas maltophilia* con 12 aislados.

Tabla 4. Organismos más cercanos a los aislados endófitos, localizados en la base de datos NCBI

Nombre del aislado	Identidad	% de identidad	No. de acceso NCBI
CR1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3 strain R551-3	95%	NR_074875.1
CR2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3 strain R551-3	94%	NR_074875.1
CR3	<i>Pseudomonas gessardii</i> strain CIP 105469	95%	NR_024928.1
CR4	<i>Pseudomonas gessardii</i> strain CIP 105469	95%	NR_024928.1
CR4b	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> strain NBRC15717	89%	NR_112569.1
CR5	<i>Pseudomonas libanensis</i> strain CIP 105460	94%	NR_024901.1
CR6	<i>Paenibacillus lautus</i> strain JCM 9073	93%	NR_040882.1
CR7	<i>Bacillus thuringiensis</i> Bt407	92%	NR_102506.1
CR10	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	87%	NR_074540.1
CR11	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain IAM 12077	90%	NR_043403.1
CR12	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain IAM 12077	90%	NR_043403.1
CR13	<i>Microbacterium oxydans</i> strain DSM 20578	95%	NR_044931.1
CR14	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain IAM 12077	93%	NR_043403.1
CR15	<i>Bacillus toyonensis</i> strain BCT-7112	83%	NR_121761.1
CR16	<i>Microbacterium oxydans</i> strain DSM 20578	95%	NR_044931.1
CR17	<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> strain A6	94%	NR_074518.1

Bacterias endófitas en tomate (*Physalis ixocarpa*)

Tabla 4. Organismos más cercanos a los aislados endófitos, localizados en la base de datos NCBI. Continuación.

Nombre del aislado	Identidad	% de identidad	No. de acceso NCBI
CR18	<i>Corynebacterium doosanense strain CAU</i>	93%	NR_116525.1
CR19	<i>Microbacterium oxydans strain DSM 20578</i>	95%	NR_044931.1
CR20	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans strain Sphe3</i>	95%	NR_074770.1
CR22	<i>Agrobacterium tumefaciens strain IAM 12048</i>	100%	NR_041396.1
CR23	<i>Lysinibacillus fusiformis strain NBRC15717</i>	90%	NR_112569.1
CR24	<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3 strain R551-3</i>	99%	NR_074875.1
CR25	<i>Bacillus thuringiensis strain ATCC 10792</i>	93%	NR_114581.1
CR26	<i>Microbacterium oxydans strain DSM 20578</i>	95%	NR_044931.1
CR27	<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3 strain R551-3</i>	99%	NR_074875.1
CR28	<i>Bacillus thuringiensis strain ATCC 10792 1</i>	95%	NR_114581.1
CR29	<i>Bacillus thuringiensis strain ATCC 10792</i>	95%	NR_114581.1
CR30	<i>Bacillus toyonensis strain BCT-7112</i>	99%	NR_121761.1
CR31	<i>Bacillus thuringiensis strain IAM 12077</i>	94%	NR_043403.1
CR32	<i>Bacillus thuringiensis strain ATCC 10792</i>	96%	NR_114581.1
CR33	<i>Bacillus thuringiensis strain ATCC 10792</i>	95%	NR_114581.1
CR34	<i>Bacillus thuringiensis strain ATCC 10792</i>	95%	NR_114581.1
CR35	<i>Bacillus thuringiensis strain ATCC 10792</i>	94%	NR_114581.1
CR36	<i>Bacillus safensis strain NBRC 100820</i>	91%	NR_113945.1
CR37	<i>Bacillus trypoxylicola strain NBRC 102646</i>	77%	NR_114174.1
CR38	<i>Bacillus thuringiensis strain ATCC 10792</i>	94%	NR_114581.1
CR39	<i>Paenibacillus lautus strain NBRC 15380</i>	94%	NR_112724.1
CR40	<i>Bacillus thuringiensis strain ATCC 10792</i>	93%	NR_114581.1
CR42	<i>Sporosarcina contaminans strain CCUG 53915</i>	75%	NR_116955.1
CR44	<i>Curtobacterium oceanosedimentum strain ATCC 31317</i>	99%	NR_116064.1

Bacterias endófitas en tomate (*Physalis ixocarpa*)

Tabla 4. Organismos más cercanos a los aislados endófitos, localizados en la base de datos NCBI. Continuación.

Nombre del aislado	Identidad	% de identidad	No. de acceso NCBI
CR45	nd		
CR45b	nd		
CR47	<i>Bacillus thuringiensis strain ATCC 10792</i>	94%	NR_114581.1
CR48	<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3 strain R551-3</i>	94%	NR_074875.1
CR49	<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3 strain R551-3</i>	93%	NR_074875.1
CR50	<i>Lysinibacillus fusiformis strain NBRC15717</i>	90%	NR_112569.1
CR50b	<i>Bacillus thuringiensis strain IAM 12077</i>	95%	NR_043403.1
CR51	<i>Bacillus anthracis str. Ames strain Ames</i>	94%	NR_074453.1
CR52	<i>Microbacterium oxydans strain DSM 20578</i>	93%	NR_044931.1
CR53	<i>Arthrobacter niigatensis strain LC4</i>	96%	NR_041400.1
CR53b	nd		
CR54	<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3 strain R551-3</i>	99%	NR_074875.1
CR55	<i>Agrobacterium tumefaciens strain IAM 12048</i>	93%	NR_041396.1
CR56	<i>Bacillus anthracis str. Ames strain Ames</i>	96%	NR_074453.1
CR57	nd		
CR58	<i>Bacillus thuringiensis strain ATCC 10792</i>	94%	NR_114581.1
CR59	nd		
CR60	<i>Arthrobacter niigatensis strain LC4</i>	94%	NR_041400.1
CR61	<i>Bacillus thuringiensis strain ATCC 10792</i>	94%	NR_114581.1
CR62	<i>Microbacterium oxydans strain DSM 20578</i>	96%	NR_044931.1
CR63	<i>Bacillus thuringiensis strain IAM 12077</i>	92%	NR_043403.1
CR64	<i>Bacillus thuringiensis strain ATCC 10792</i>	94%	NR_114581.1
CR65	<i>Bacillus thuringiensis strain IAM 12077</i>	94%	NR_043403.1
CR66	<i>Bacillus toyonensis strain BCT-7112</i>	95%	NR_121761.1

Bacterias endófitas en tomate (*Physalis ixocarpa*)

Tabla 4. Organismos más cercanos a los aislados endófitos, localizados en la base de datos NCBI. Continuación.

Nombre del aislado	Identidad	% de identidad	No. de acceso NCBI
CR67	<i>Bacillus thuringiensis strain ATCC 10792</i>	95%	NR_114581.1
CR68	<i>Bacillus thuringiensis strain IAM 12077</i>	95%	NR_043403.1
CR69	<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3 strain R551-3</i>	94%	NR_074875.1
CR70	<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3 strain R551-3</i>	93%	NR_074875.1
CR71	<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3 strain R551-3</i>	94%	NR_074875.1
CR71b	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans strain Sphe3</i>	93%	NR_074770.1
CR72	<i>Paenibacillus lautus strain NBRC 15380</i>	98%	NR_112724.1
CR73	<i>Bacillus toyonensis strain BCT-7112</i>	91%	NR_121761.1
CR74	<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3 strain R551-3</i>	95%	NR_074875.1
CR75	<i>Stenotrophomonas maltophilia R551-3 strain R551-3</i>	95%	NR_074875.1
CR76	<i>Bacillus anthracis str. Ames strain Ames</i>	95%	NR_074453.1
CR77	<i>Bacillus anthracis str. Ames strain Ames</i>	96%	NR_074453.1
CR79	<i>Bacillus thuringiensis strain ATCC 10792</i>	94%	NR_114581.1
CR80	<i>Microbacterium oxydans strain DSM 20578</i>	93%	NR_044931.1
CR81	<i>Bacillus thuringiensis strain IAM 12077</i>	94%	NR_043403.1
CR82	<i>Bacillus toyonensis strain BCT-7112</i>	93%	NR_121761.1
CR83	<i>Bacillus thuringiensis strain IAM 12077</i>	95%	NR_043403.1
CR84	<i>Bacillus thuringiensis strain IAM 12077</i>	93%	NR_043403.1
CR85	<i>Paenibacillus lautus strain JCM 9073</i>	96%	NR_040882.1
CR86	<i>Microbacterium oxydans strain DSM 20578</i>	93%	NR_044931.1
CR87	<i>Bacillus toyonensis strain BCT-7112</i>	82%	NR_121761.1
CR88	<i>Microbacterium oxydans strain DSM 20578</i>	95%	NR_044931.1
CR89	<i>Microbacterium oxydans strain DSM 20578</i>	95%	NR_044931.1
CR90	<i>Microbacterium oxydans strain DSM 20578</i>	93%	NR_044931.1

Tabla 4. Organismos más cercanos a los aislados endófitos, localizados en la base de datos NCBI
Continuación.

Nombre del aislado	Identidad	% de identidad	No. de acceso NCBI
CR91	<i>Bacillus thuringiensis strain IAM 12077</i>	95%	NR_043403.1
CR92	<i>Microbacterium oxydans strain DSM 20578</i>	94%	NR_044931.1
CR93	<i>Bacillus thuringiensis strain IAM 12077</i>	91%	NR_043403.1
CR94	<i>Bacillus anthracis str. Ames strain Ames</i>	92%	NR_074453.1
CR95	<i>Bacillus thuringiensis strain IAM 12077</i>	91%	NR_043403.1
CR96	<i>Microbacterium paraoxydans strain CF36</i>	95%	NR_025548.1
CR97	<i>Bacillus anthracis str. Ames strain Ames</i>	96%	NR_074453.1
CR98	<i>Microbacterium oxydans strain DSM 20578</i>	95%	NR_044931.1
CR99	<i>Bacillus thuringiensis strain IAM 12077</i>	93%	NR_043403.1
CR100	<i>Bacillus safensis strain NBRC 100820</i>	95%	NR_113945.1
CR101	<i>Bacillus cereus strain CCM 2010</i>	90%	NR_115714.1

8.2. Diversidad de bacterias endófitas en la raíz, tallo y hoja de plantas de tomate

De acuerdo a la curva de rarefacción realizada para este estudio, el análisis sugiere que el muestreo total de aislados en los tres tejidos exhibe valores significativos. Con respecto al análisis de diversidad (índice de Shannon), nuestros resultados muestran que fue de 2.176 (tallo) y 3.06 (hoja), mientras que de acuerdo al Índice de Simpson se observaron valores de 0.835 (tallo) y 0.951 (hoja). En el caso de la raíz, el índice de Shannon es de 2.328 y 0.8413 índice de Simpson. De acuerdo al valor de los índices, el tejido con mayor diversidad es la hoja, y la mayor dominancia de especies se encuentra también en este tejido.

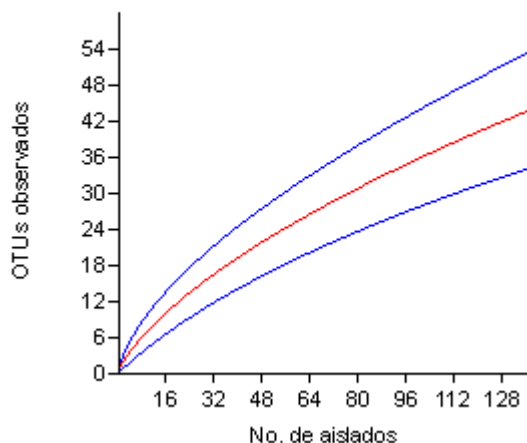


Figura 5. Curva de rarefacción del total de aislados endófitos identificados.

8.3. Actividad antagonica sobre hongos fitopatogénos

Para observar el porcentaje de inhibición contra los hongos fitopatogénos, se realizó la siguiente fórmula (Schmidt y col., 2009):

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Crecimiento control} - \text{Crecimiento del hongo en interacción con la cepa}}{\text{Crecimiento control}}$$

8.3.1. *Botrytis cinerea*

De los 145 aislados, 31 de ellos presentaron un porcentaje de inhibición del 100% contra el hongo *B. cinerea*, lo cual representa el 21.4% del total de los aislados; de estos 20 aislados pertenecen a la raíz, 8 al tallo y 3 a la hoja; entre los géneros responsables de esta inhibición, se encuentran *Stenotrophomonas*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Curtobacterium*, *Leifsonia*, *Microbacterium* y principalmente *Bacillus*, siendo la especie predominante *Bacillus thuringiensis*. Las especies control *P. fluorescens* UM256 y *P. fluorescens* UM240 al igual que los

géneros antes mencionados representan el 100% de inhibición, no obstante, la especie *P. fluorescens* UM270 se encuentra por debajo del 65% (Figura 6).

8.3.2. *Fusarium oxysporum*

Del total de los aislados, 52 especies (35.9%) tuvieron más del 50% de actividad antagonica/inhibitoria sobre el crecimiento de *F. oxysporum*. El mayor porcentaje de inhibición contra el hongo *F. oxysporum* fue de 85% y lo obtuvieron las especies *B. thuringiensis*, *B. toyonensis* y *M. oxydans*, sólo dos de los controles presentaron actividad antagonica, siendo *P. fluorescens* UM270 y UM256 con porcentajes de 44% y 79% de inhibición, respectivamente (Figuras 7 y 8).

Bacterias endófitas en tomate (*Physalis ixocarpa*)

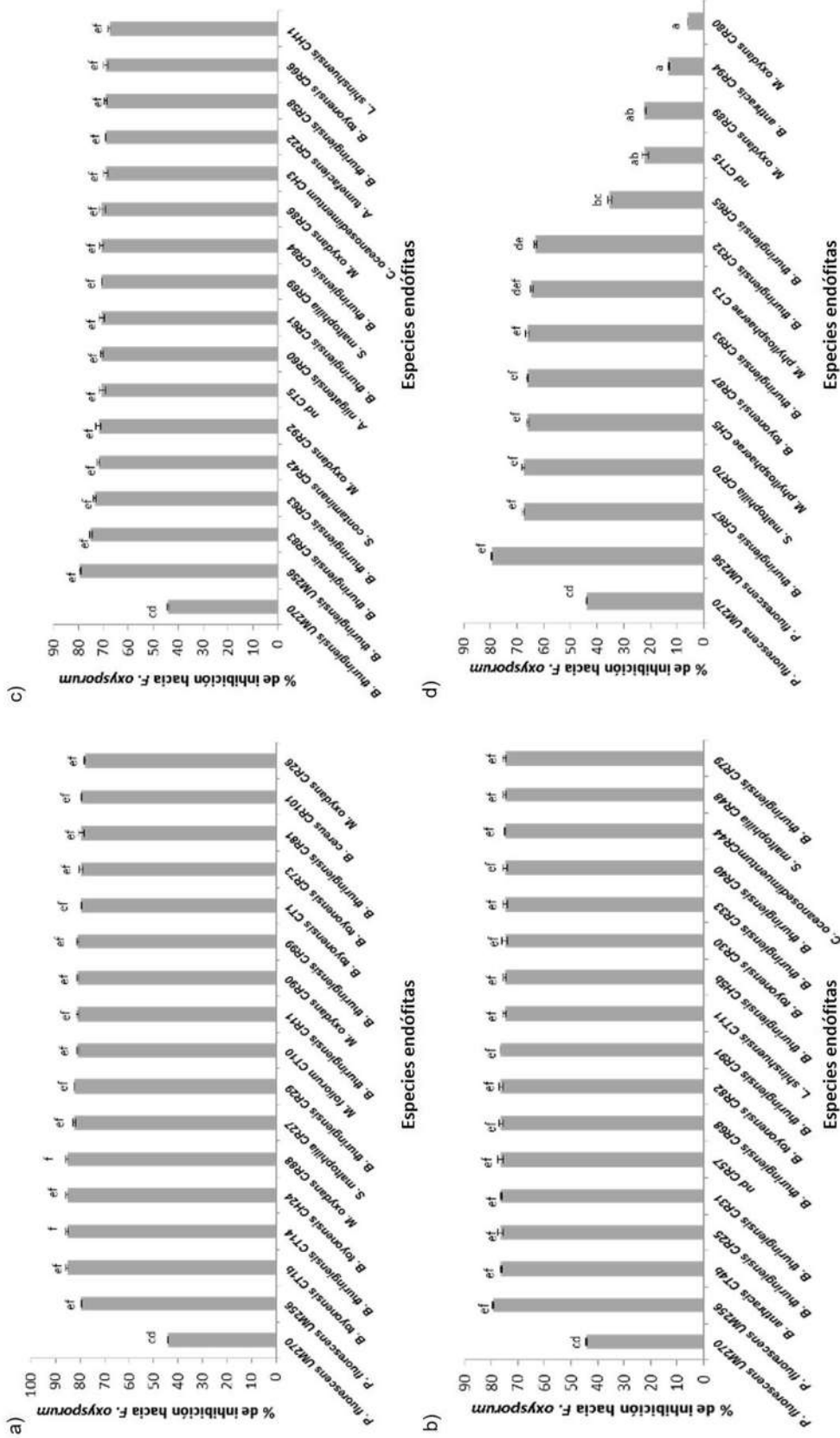


Figura 7. a), b), c), d) Porcentaje de inhibición de bacterias endófitas contra *F. oxysporum*

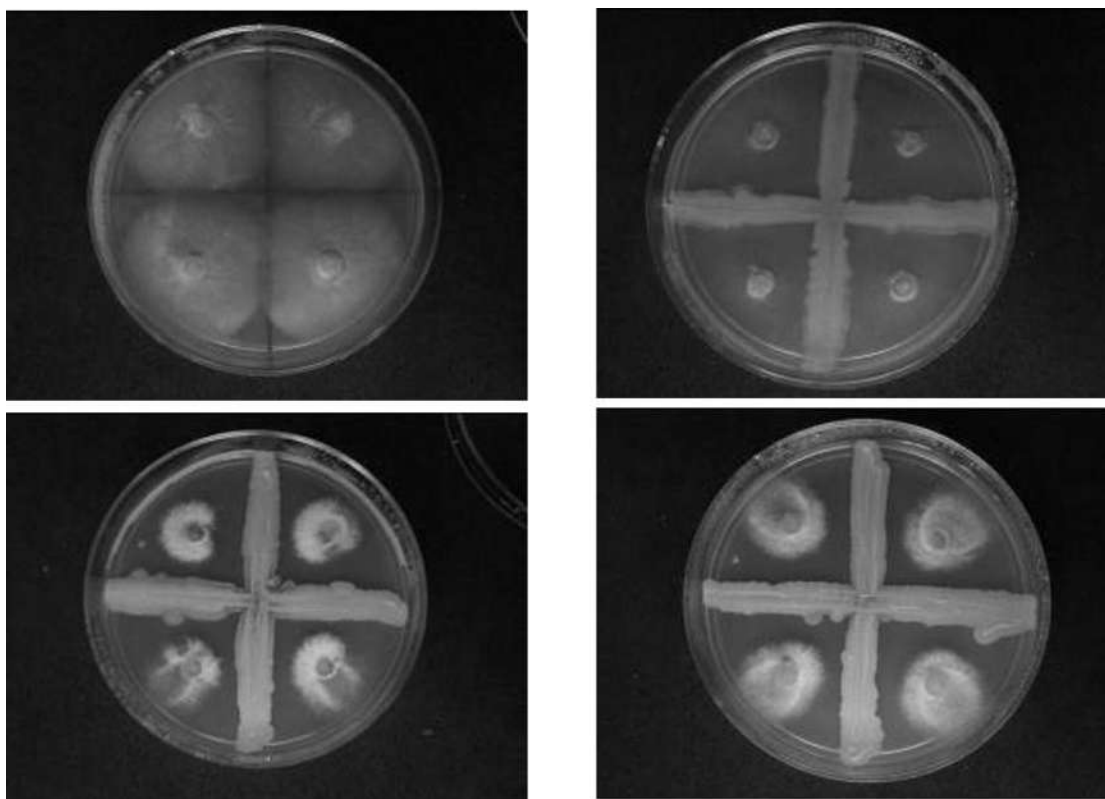


Figura 8. Imágenes representativas de la inhibición de bacterias endófitas contra *F. oxysporum*. 1) Control (sin inocular), 2) *P. fluorescens* UM240, 3) *M. phyllosphaerae* CT3, 4) *L. shinshuensis* CH11.

8.3.3. *Fusarium solani*

La inhibición mayor de 50% es observada por 37 especies, de estas, la más predominante es *B. thuringiensis* (CR11, CR83, CR47, CR93, CH5b, CT14, CR7, CR29, CR73, CR81, CR95, CR58, CR99), *S. maltophilia* (CR27, CR49, CR48, CR69, CR70); *B. toyonensis* (CR15, CH24, CT1b, CR87); *M. oxydans* (CR88, CR90, CR92); *B. cereus* (CR10, CR101), *P. gessardii* (CR4, CR3), *C. oceanosedimentum* CH3, *M. phyllosphaerae* CT3, *P. libanensis* CR5, *M. foliorum* CT10 y *L. shinshuensis* CT11. La especie *B. thuringiensis* CR11 es el que presentó la mayor inhibición del micelio del fitopatógeno (89.7%) (Figuras 9 y 10).

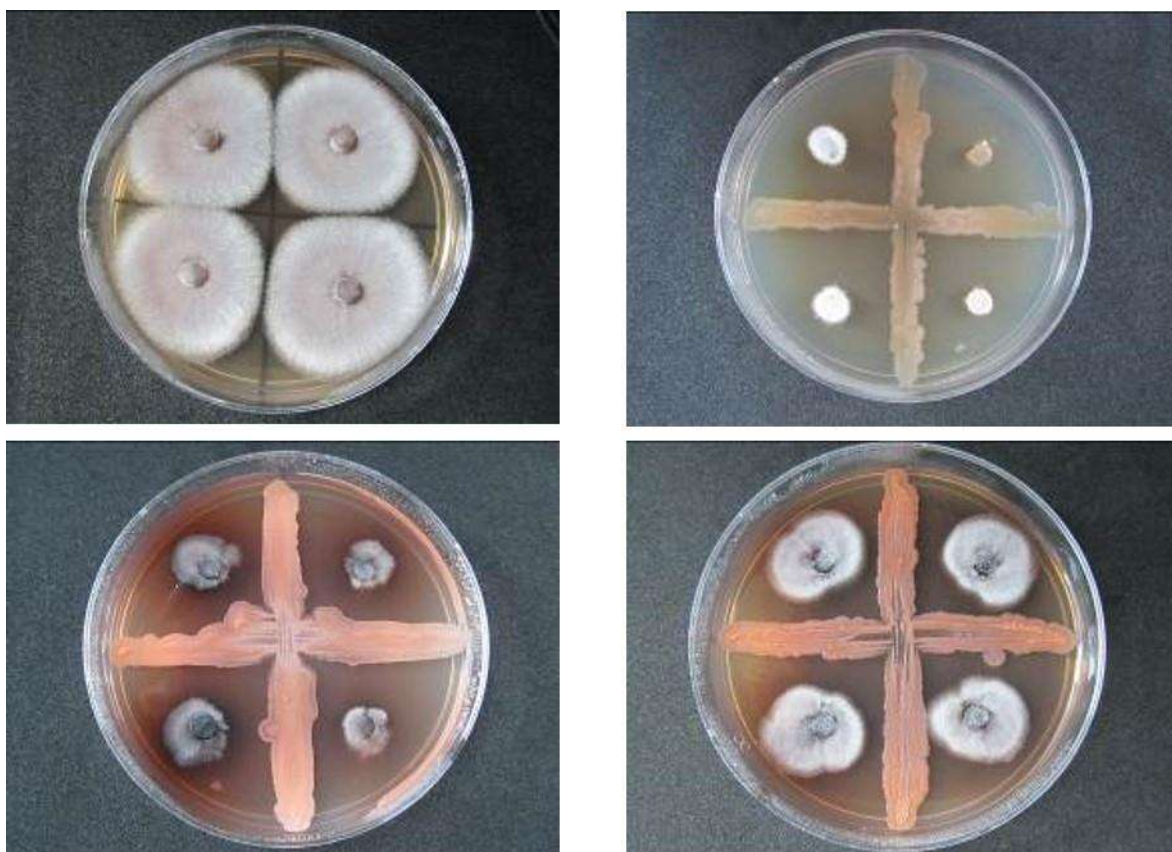


Figura 10. Imágenes representativas de la inhibición de bacterias endófitas contra *F. solani*. 1) Control (sin inocular), 2) *P. fluorescens* UM256, 3) *B. toyonensis* CH24, 4) *B. thuringiensis* CR99.

8.3.4. *Rhizoctonia solani*

El 20% de los aislados presentaron actividad antagónica mayor o igual al 50%, de estos, 13 aislados pertenecen a la especie *B. thuringiensis* (CR11, CR83, CR33, CR31, CR47, CR79, CR14, CR25, CR34, CR7, CR12, CR91, CR99); 4 pertenecen a la especie *B. toyonensis* (CR15, CR87, CR30, CR82) y *S. maltophilia* (CR48, CR27, CR69, CR49); 2 *M. oxydans* (CR88, CR26), *B. cereus* (CR10), *M. foliorum* (CT10), *P. gessardii* (CR3), *B. anthracis* (CT4b), *M. phyllosphaerae* (CT3) y el aislado CR45b no determinado (Figuras 11 y 12).

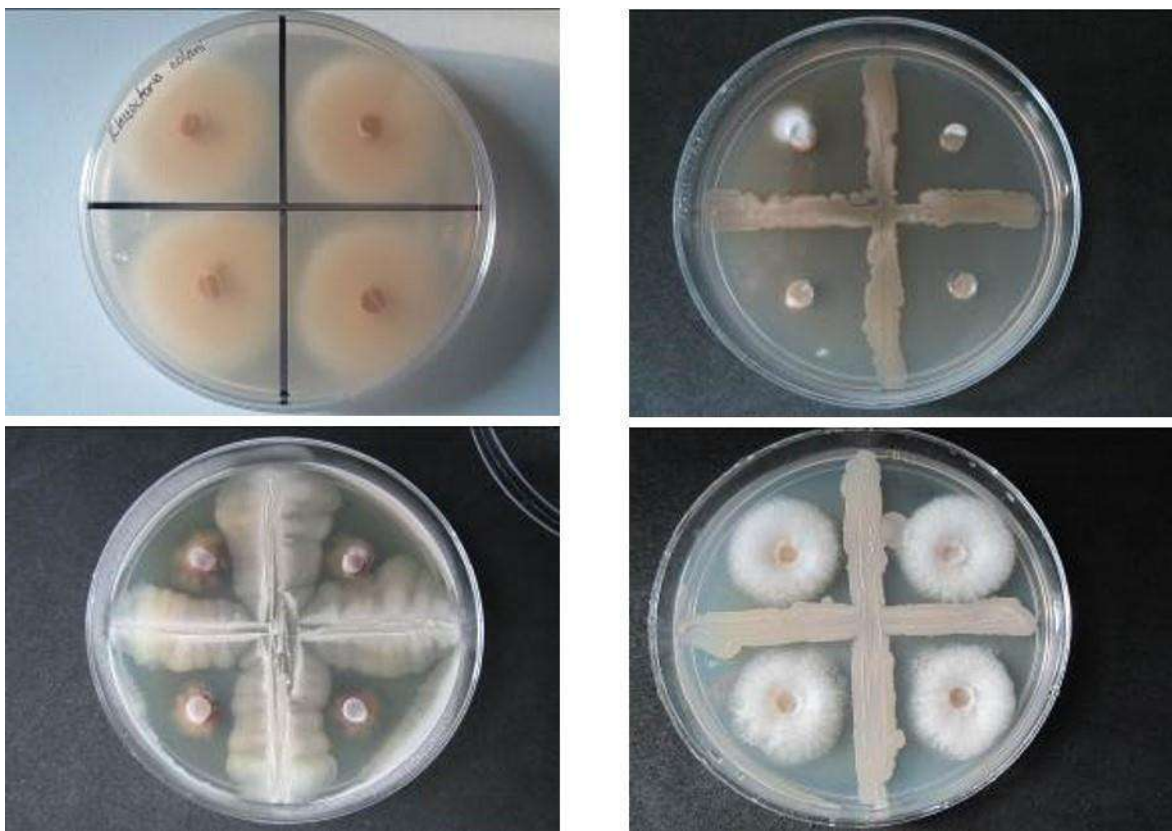


Figura 12. Imágenes representativas de la inhibición de bacterias endófitas contra *R. solani*. 1) Control (sin inocular), 2) *P. fluorescens* UM256, 3) *B. thuringiensis* CR11, 4) *S. maltophilia* CR2.

8.4. Producción de sideróforos secretados por bacterias endófitas

Del total de los aislados endófitos, 49 produjeron sideróforos (representando un 33.8% del total de aislados). Las especies con un halo con mayor diámetro fueron *B. vireti* CH21 y *S. flavogriseus* CH26, con un radio de 6.66 y 6 mm respectivamente, los cuáles fueron similares a las cepas controles *P. fluorescens* UM256, UM270 y UM16 (Figura 13).

Bacterias endófitas en tomate (*Physalis ixocarpa*)

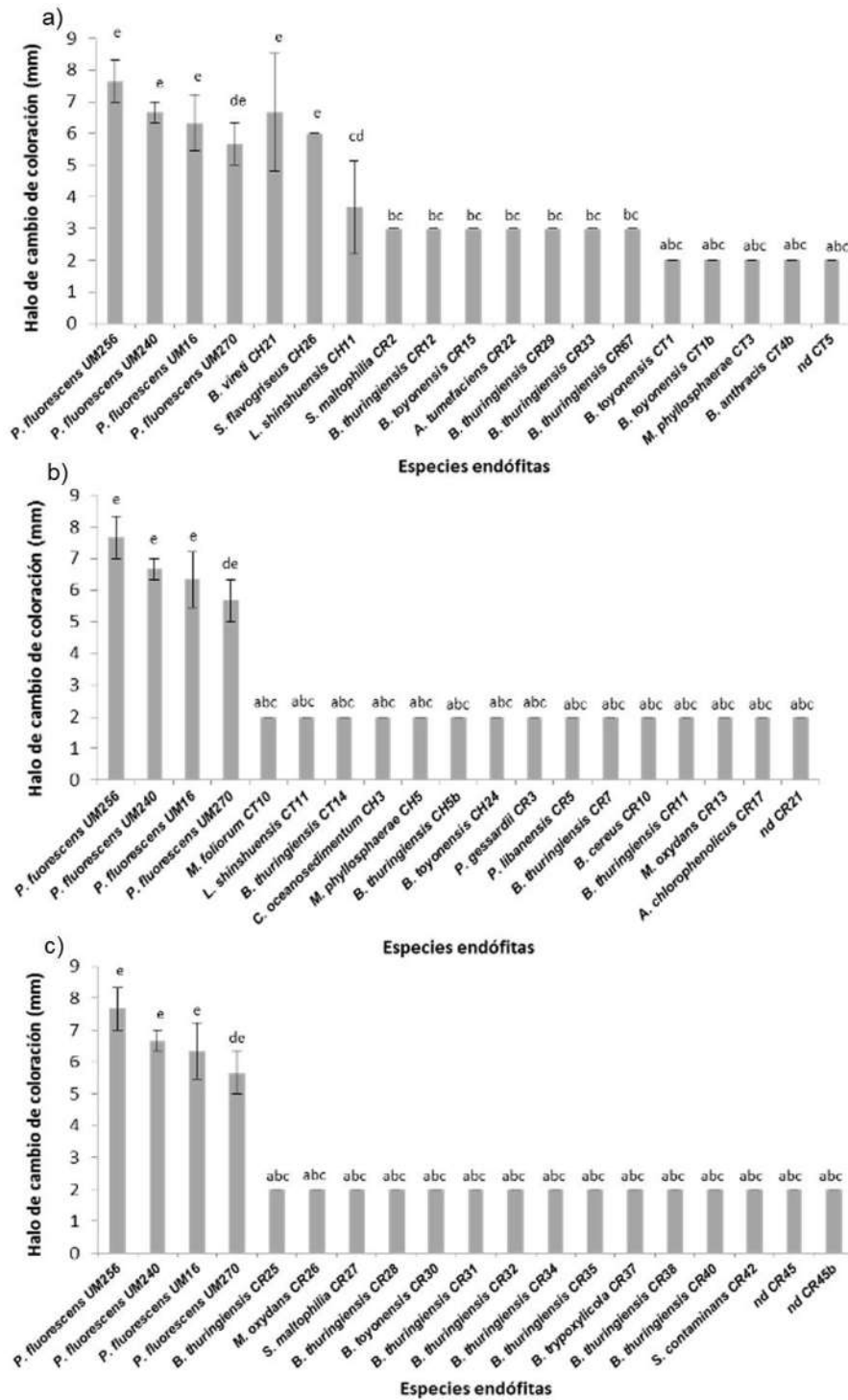


Figura 13. a), b), c), d), e), Producción de sideróforos (halo de cambio de coloración mm). f) Imágenes representativas

Bacterias endófitas en tomate (*Physalis ixocarpa*)

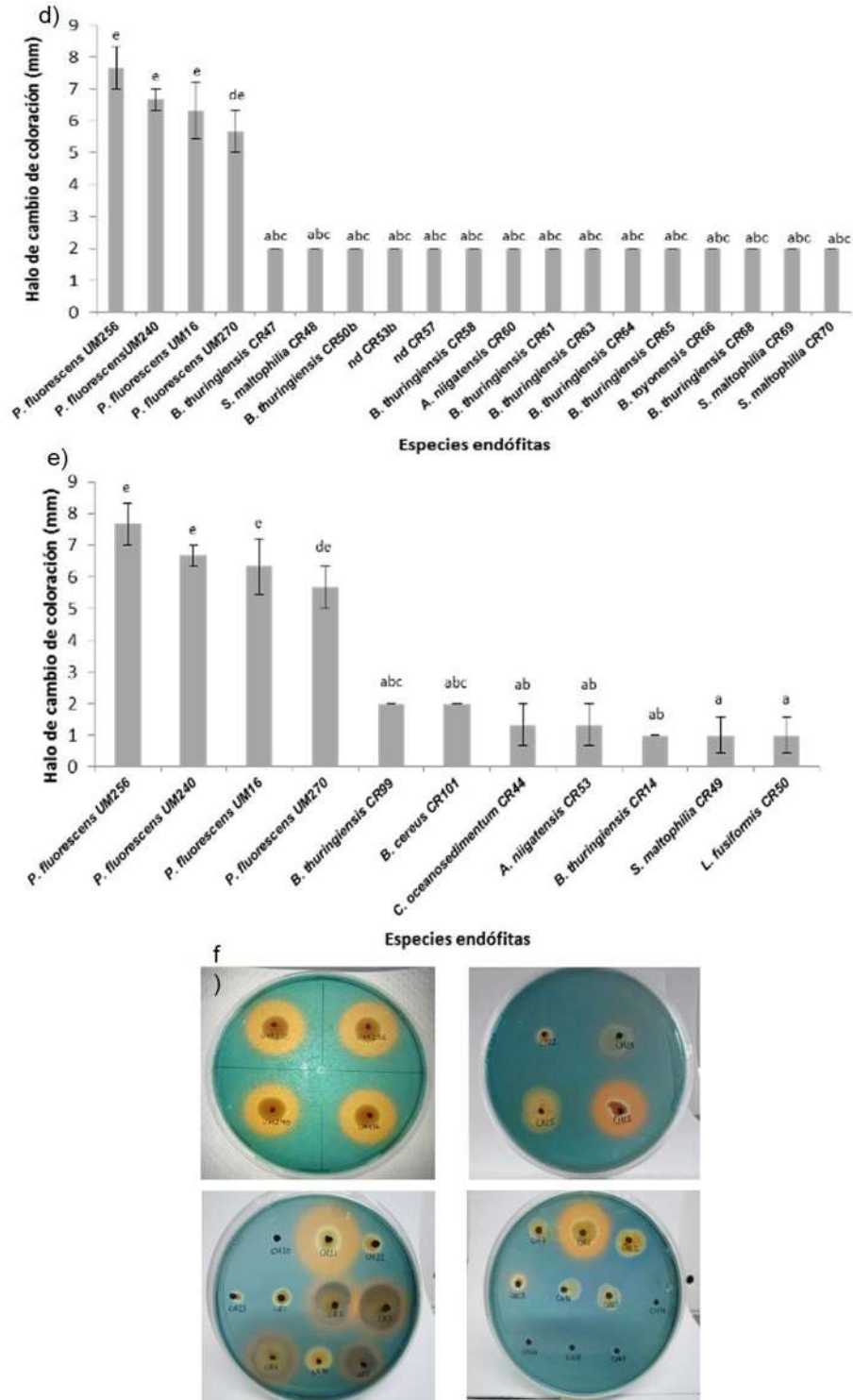


Figura 13. a), b), c), d), e), Producción de sideróforos (halo de cambio de coloración mm). f) Imágenes representativas.

8.5. Producción de proteasas

La mayoría de las bacterias endófitas produjeron proteasas, es decir, 98 aislados correspondiendo a un 67.6% del total. Mientras que nueve exhibieron un halo igual a 3 mm de diámetro, perteneciendo a las especies *P. gessardii* CR4, *S. contaminans* CR42, *A. niigatensis* CR60, *B. thuringiensis* CR68, *S. maltophilia* CR70, *B. anthracis* CR77, *M. oxydans* CR86 y CR89 y *B. cereus* CR101 (figura 14).

8.6. Producción de indoles totales

La mayoría de los aislados (86.9%) fueron capaces de sintetizar indoles totales teniendo como precursor el triptófano. *S. maltophilia* CR71 presentó la mayor concentración (9.62µg/mL) no presentando diferencias con el control *P. fluorescens* UM16 (9.92 µg/mL), el cual es un buen productor de ácido indolacético. Por otra parte, la especie *B. thuringiensis* CR91, CR57 y *B. thuringiensis* CR61 también presentaron concentraciones mayores a 7 µg/mL, coincidiendo con el control *P. fluorescens* UM256 (Figura 15).

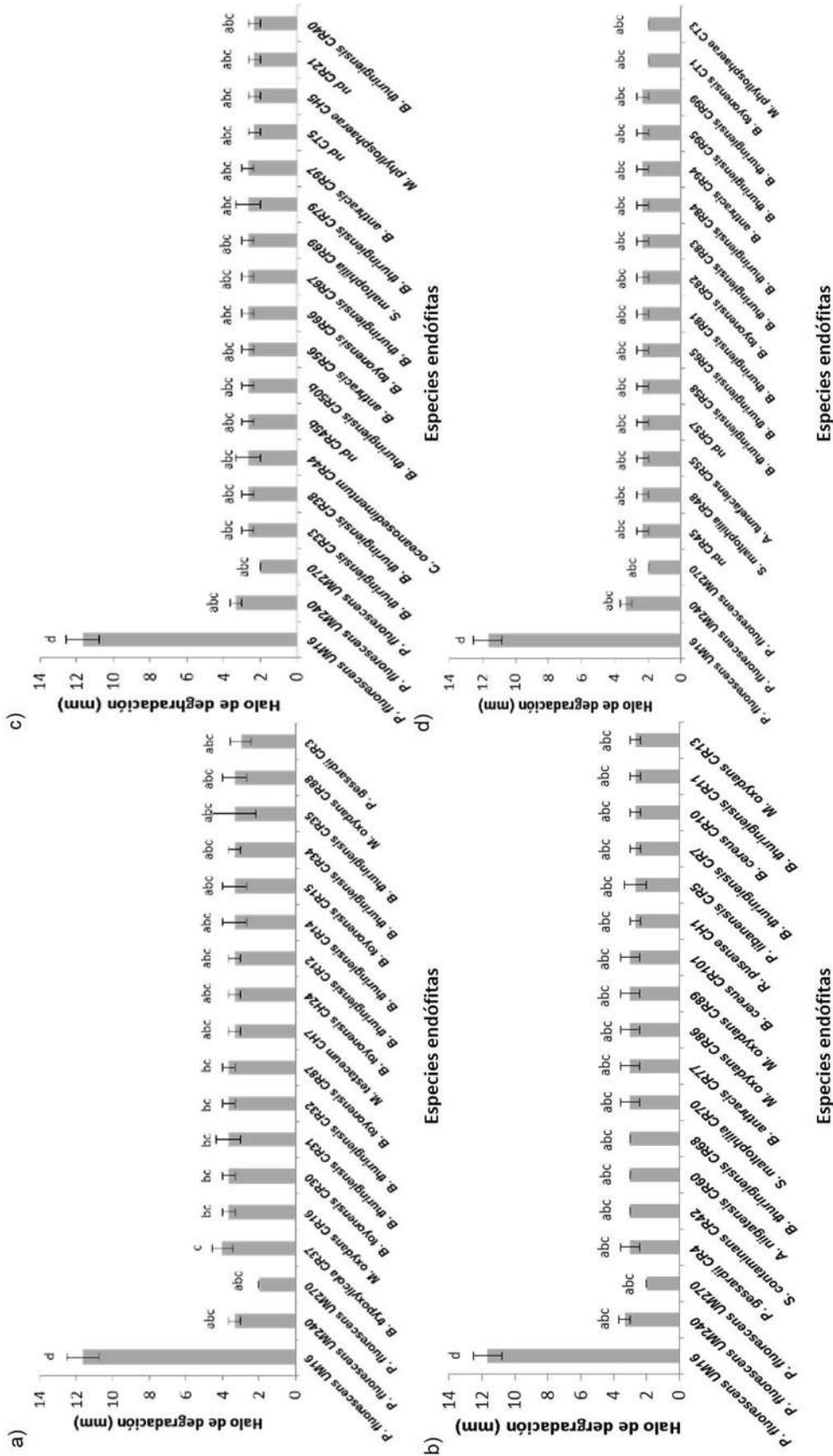


Figura 14. a), b), c), d), e), f), g) Producción de proteasas (halo de degradación mm). h) Imágenes representativas

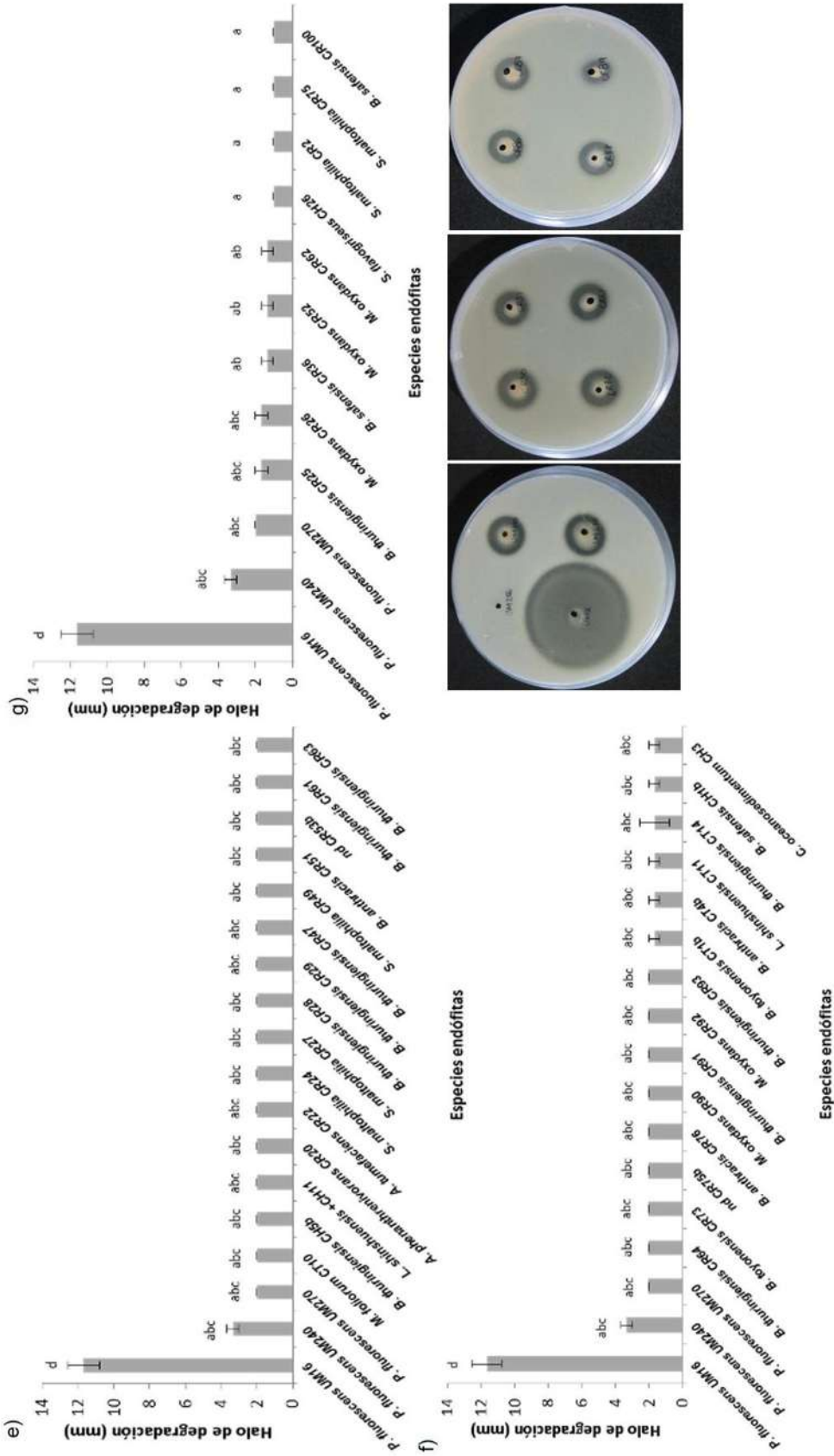


Figura 14. a), b), c), d), e), f), g) Producción de proteasas (halo de degradación mm). h) Imágenes representativas

Bacterias endófitas en tomate (*Physalis ixocarpa*)

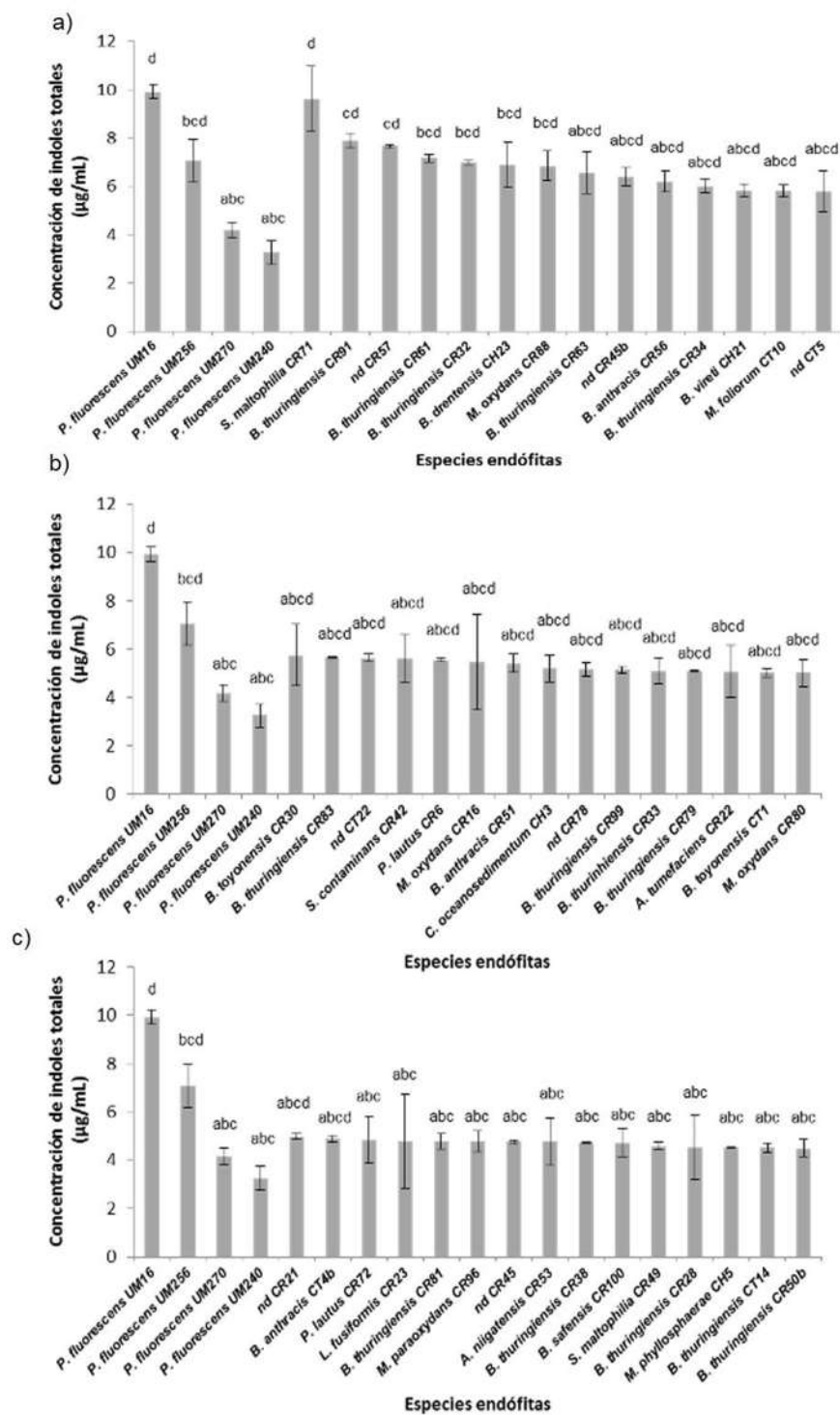


Figura 15. a), b), c), d), e), f), g), h), i) Producción de indoles totales en bacterias endófitas de tomate (µg/mL).

Bacterias endófitas en tomate (*Physalis ixocarpa*)

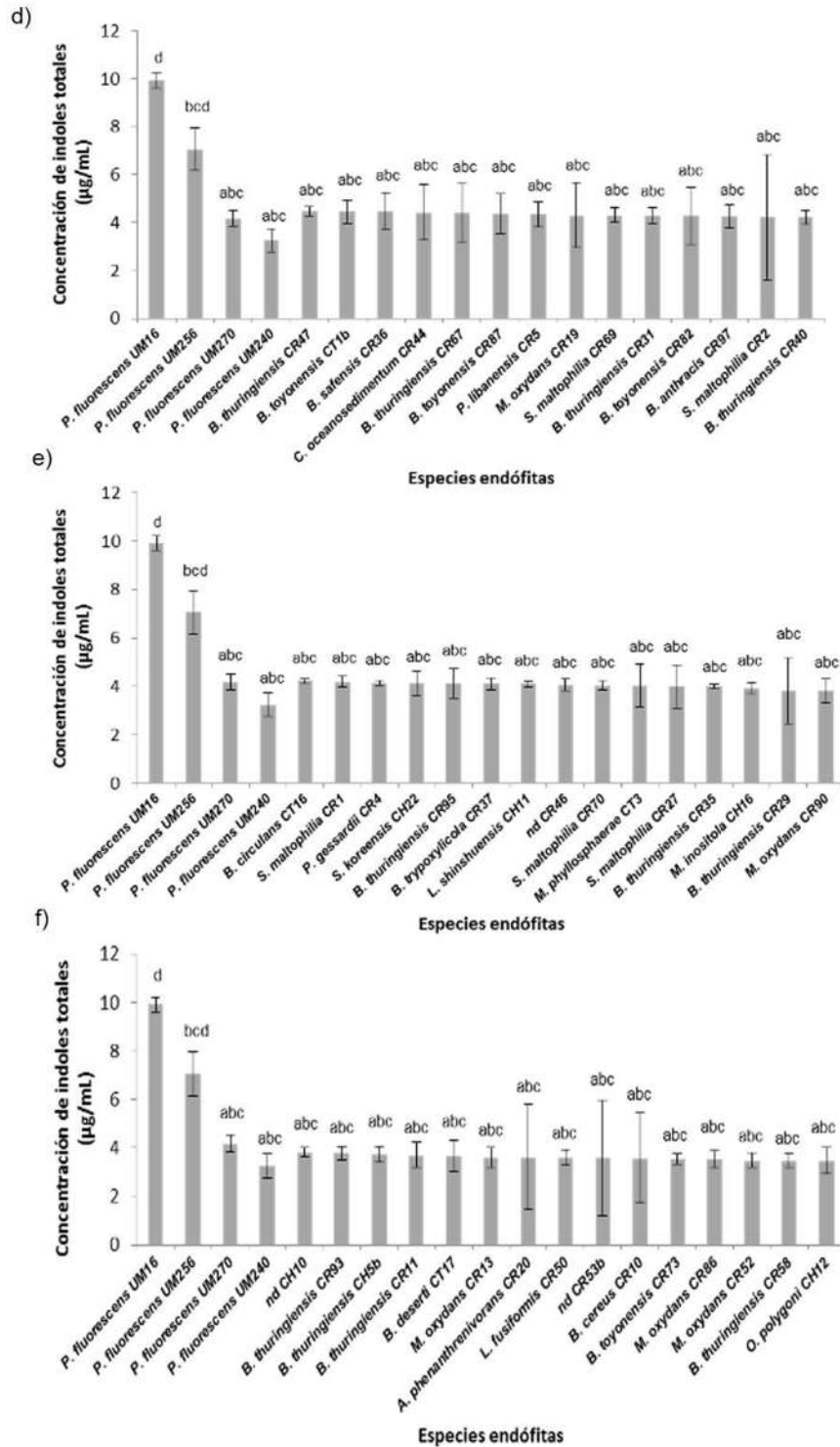


Figura 15. a), b), c), d), e), f), g), h), i) Producción de indoles totales en bacterias endófitas de tomate (µg/mL).

Bacterias endófitas en tomate (*Physalis ixocarpa*)

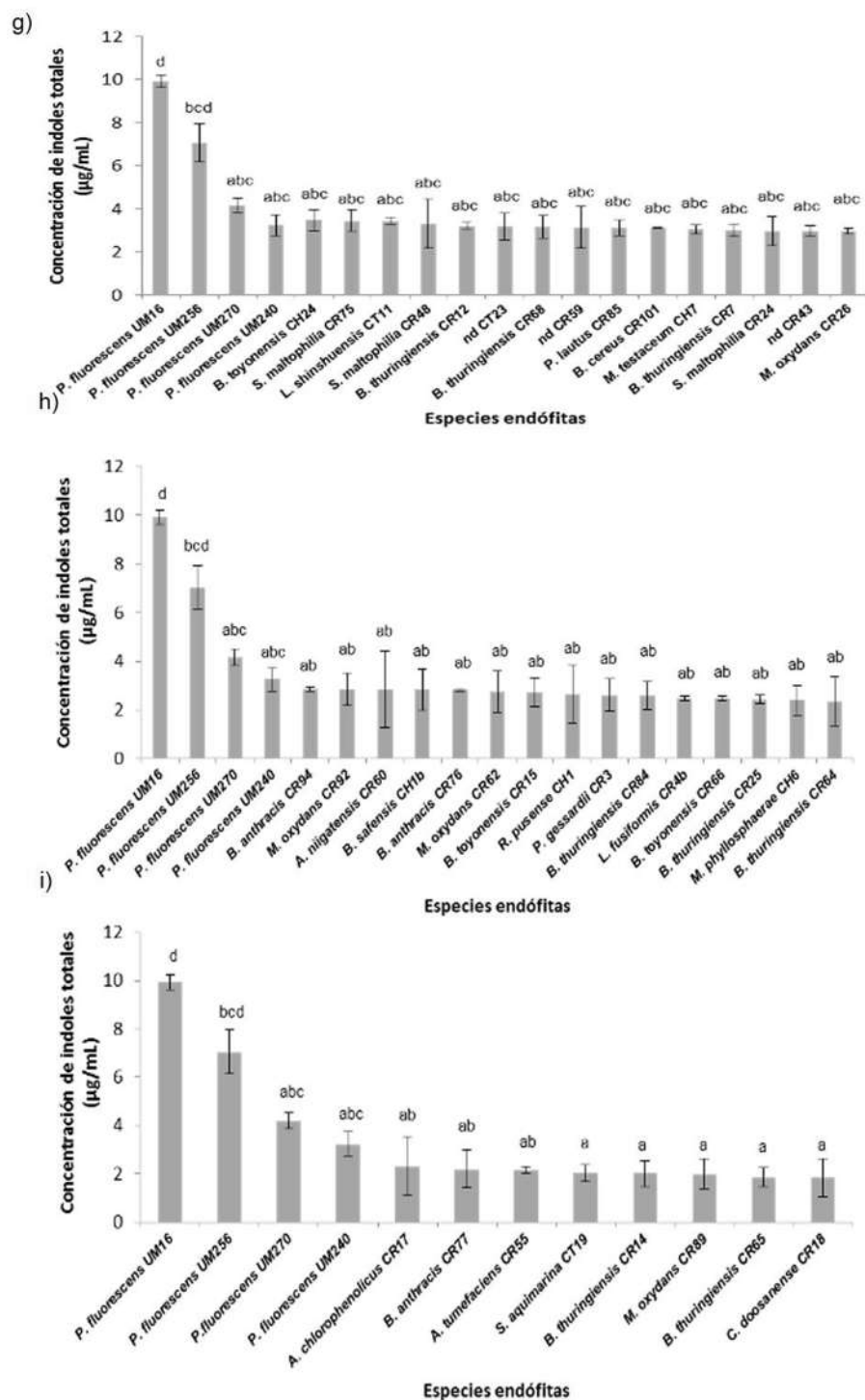


Figura 15. a), b), c), d), e), f), g), h), i) Producción de indoles totales en bacterias endófitas de tomate (µg/mL).

8.7. Las bacterias endófitas promueven el crecimiento en plantas de tomate

Se seleccionaron especies con cada una de las capacidades o mecanismos promotores del crecimiento vegetal para este ensayo. Por ejemplo, *B. drentensis* CH23 y *S. maltophilia* CR71 son las cepas que obtuvieron mayor concentración de indoles totales, *M. oxydans* CR16, proteasas, *B. vireti* CH21 sideróforos, *B. toyonensis* CT1b buena inhibidora, nd CR57, *M. foliorum* CT10 competentes en todas las actividades, *L. shinshuensis* CT13 capacidades bajas, el control negativo no se inoculó, mientras que las cepas *P. fluorescens* UM270 y 256 se utilizaron también como control positivo, ya que se han reportado como promotoras de crecimiento vegetal (Hernández-León y col., 2015).

Respecto al resultado de peso fresco, las plántulas no muestran diferencia significativa entre las inoculadas y los controles. El nivel de clorofila mayor (3.75 Unidades arbitrarias) fue presentado por el aislado CR57, mientras que *B. vireti* produjo una mayor longitud de parte aérea (20.63) y de raíz (29.9 mm). Las plántulas inoculadas con *B. drentensis* CH23 presentaron un mayor peso tanto de parte aérea (0.017g) como de raíz (0.0077g), así como número mayor de raíces laterales (5.875) y mayor longitud de éstas (9.3mm).

Bacterias endófitas en tomate (*Physalis ixocarpa*)

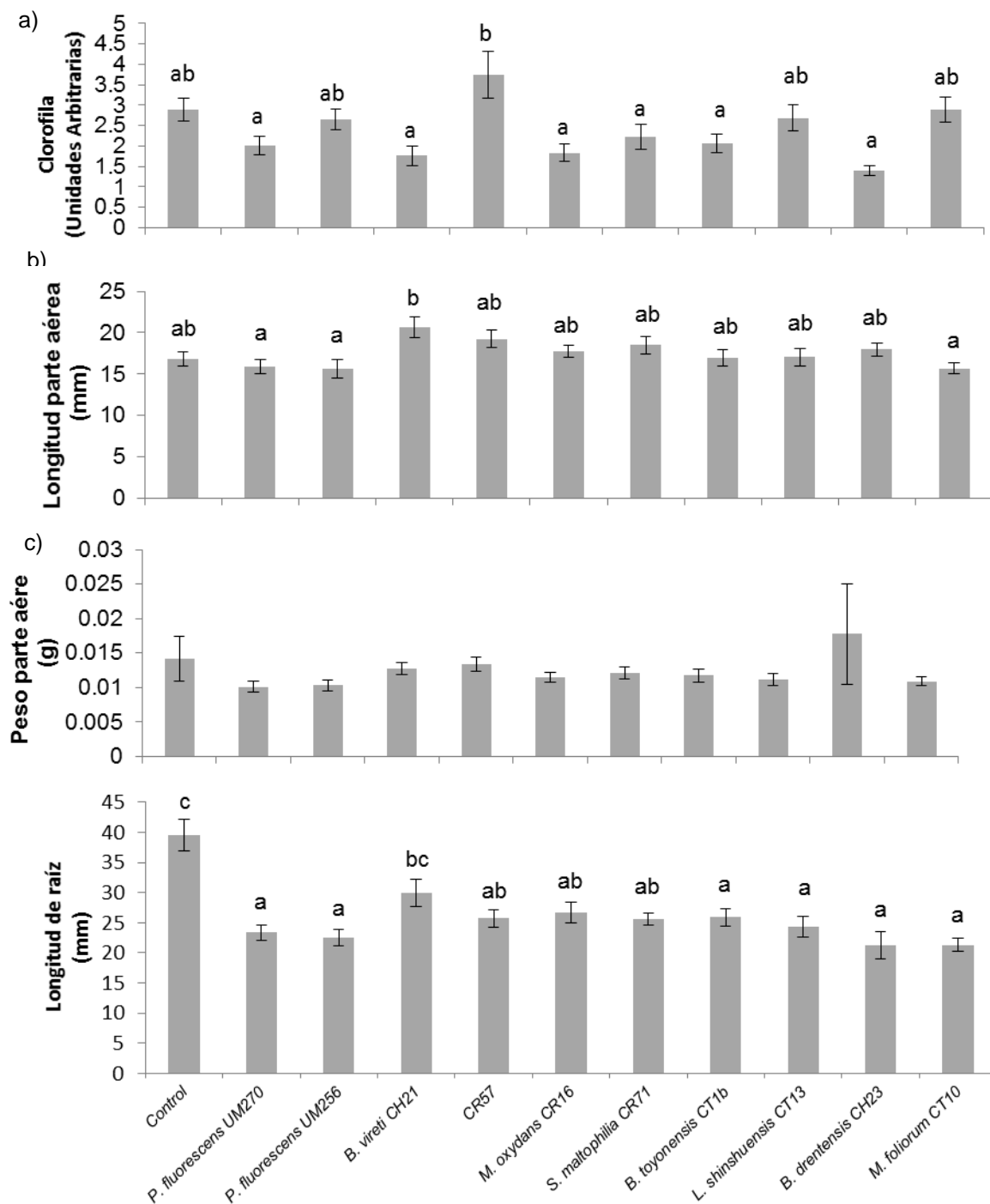


Figura 16. Efecto de las bacterias endófitas en el crecimiento de plántulas de tomate a) Clorofila (Unidades Arbitrarias), b) Longitud de la parte aérea (mm), c) Peso de la parte aérea (g), d) Longitud de la raíz (mm), e) Peso de la raíz (g), f) Número de raíces laterales, g) Longitud de raíces laterales (mm), h) Imágenes representativas 1) Control (plántulas sin inocular), 2) Plántulas inoculadas con *P. fluorescens* UM270, 3) Plántulas inoculadas con *B. vireti* CH21, 4) Plántulas inoculadas con *B. drentensis* CH23.

Bacterias endófitas en tomate (*Physalis ixocarpa*)

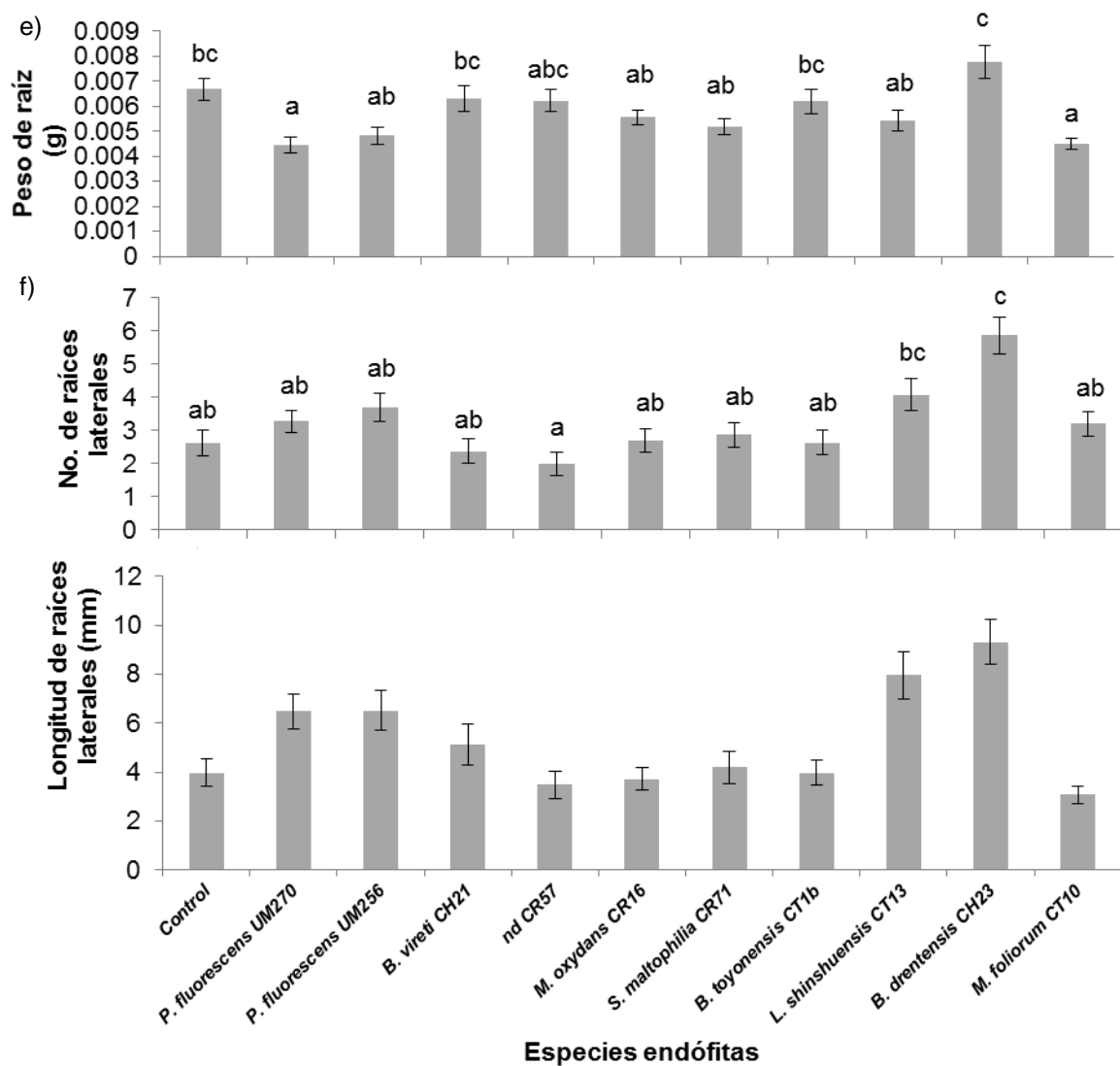


Figura 16. Efecto de las bacterias endófitas en el crecimiento de plántulas de tomate a) Clorofila (Unidades Arbitrarias), b) Longitud de la parte aérea (mm), c) Peso de la parte aérea (g), d) Longitud de la raíz (mm), e) Peso de la raíz (g), f) Número de raíces laterales, g) Longitud de raíces laterales (mm), h) Imágenes representativas 1) Control (plántulas sin inocular), 2) Plántulas inoculadas con *P. fluorescens* UM270, 3) Plántulas inoculadas con *B. vireti* CH21, 4) Plántulas inoculadas con *B. drentensis* CH23.

9. DISCUSIÓN

El tomate es una hortaliza de gran importancia comercial, además de ser un cultivo endémico de México. El estudio acerca de los mecanismos implicados en la promoción de crecimiento y el biocontrol son de especial interés para mejorar la calidad de los cultivos. En particular, la búsqueda de bacterias endófitas en este cultivo sólo se ha realizado a través de métodos independientes de cultivo (Márquez-Santacruz y col., 2010), limitando el potencial uso de agentes bacterianos para el desarrollo de nuevos bioinoculantes. Por tal motivo en este estudio se analizó la diversidad de bacterias cultivables aisladas de los diferentes tejidos de tomate (*P. ixocarpa*), incluyendo raíz, tallo y hojas.

El estudio de diversidad en plantas de tomate realizado por Márquez-Santacruz y colaboradores (2010) tuvo un enfoque no cultivable, se identificaron 146 clonas de la raíz, pertenecientes a 16 OTUs (por sus siglas en inglés Operational Taxonomic Units), donde los géneros predominantes fueron *Stenotrophomonas* (21.9%), *Microbacterium* (17.1), *Burkholderia* (14.3%), *Bacillus* (14.3%) y *Pseudomonas* (10.5%); mientras que en la rizósfera se analizaron 146 clonas pertenecientes a 86 OTUs diferentes, Se concluye que las especies de las raíces de plantas de tomate son un subgrupo de la comunidad bacteriana rizosférica.

En el presente trabajo se encontraron géneros muy abundantes, como *Bacillus*, *Rhizobium*, *Microbacterium*, *Leifsonia*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*, mientras que otros fueron poco abundantes, incluyendo: *Sporosarcina*, *Curtobacterium*, *Bosea*, *Oceanobacillus*, *Streptomyces*, *Agrobacterium*. Resultados similares han sido reportados en otros estudios, donde géneros como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Erwinia*, *Corynebacterium*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Enterobacter* están presentes en la raíz; *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Bacillus* se encuentran en el tallo, mientras que *Erwinia*, *Bacillus*, *Clavibacter* y *Xhantomonas* están presentes en la raíz y tallo (Hallmann y col., 1997); en la parte aérea los géneros *Pseudomonas* y *Curtobacterium* fueron los más abundantes en *Populus* spp (Ulrich y col., 2008).

En este estudio se encontraron que se comparte especies en los diferentes tejidos de las plantas, las especies *B. toyonensis* y *B. thuringiensis* se encontraron en raíz, tallo y hoja, *B. anthracis* se encontró en raíz y tallo, *M. phyllosphaerae* y *L. shinshuensis* se encontraron en tallo y hoja, mientras que *B. safensis* y *C. oceanosedimentum* se encontraron en hoja y raíz; se puede observar que existe una migración de ciertas especies a diferentes tejidos vegetales, no obstante es necesario corroborar por medio de microscopía confocal.

Trabajos llevados a cabo sobre la colonización de las bacterias endófitas, son los publicados por Germaine y col., (2004), reportando una re inoculación de tres cepas endófitas (VM1449, VM1453, VM1450) de *Populus trichocarpa* pertenecientes a la especie *Pseudomonas putida*, y concluyendo que las tres cepas son colonizadoras eficientes de la rizósfera; otro estudio, es el realizado por Johnston-Monje y Raizada (2011), en el cuál once especies endófitas de maíz fueron inyectadas en el tallo de plántulas de maíz y después de cinco días se observa una migración de sólo 6 especies (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter asburiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea agglomerans* y *Xanthomonas campestris*) a las raíces y al sistema vascular. Sería interesante ahondar en este tema respecto a las cepas que aislamos de plantas de tomate para corroborar si dichas cepas pueden lograr la colonización y sobrevivencia e tejidos.

Más de 200 géneros bacterianos pertenecientes a 16 phyla han sido reportados como endófitos, incluyendo bacterias cultivables y no cultivables, siendo las clases más predominantes Actinobacteria (incluye géneros como *Arthrobacter*, *Curtobacterium*, *Microbacterium*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*, entre otras), Proteobacteria (α -Proteobacteria, incluyendo *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*; β -Proteobacterias, *Azoarcus*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*; y γ -Proteobacteria, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*) y Firmicutes (destacando el género *Bacillus*, *Clostridium*, *Paenibacillus* y *Staphylococcus*), aisladas de una gran diversidad de especies vegetales (Rosenblueth y Martínez-Romero 2006).

Los géneros ubicados en este trabajo fueron *Bacillus* reportada como endófito de cítricos, maíz, zanahoria; *Rhizobium* endófito de arroz y zanahoria; *Microbacterium* endófito de maíz; *Pseudomonas* endófito de zanahoria y soya; *Paenibacillus* endófito de camote; *Stenotrophomonas* endófito de arroz; *Curtobacterium* endófito de plantas de cítricos; *Arthrobacter* endófito de maíz; sin embargo, de los géneros *Leifsonia*, *Sporosarcina*, *Bosea*, *Cohnella*, *Micromonospora* en nuestro mejor conocimiento no existe ningún reporte.

De acuerdo con los índices de diversidad, la hoja es el tejido con mayor dominancia por ciertas especies (Shannon 3.063, Simpson 0.9514), seguido por la raíz (Shannon 2.328, Simpson 0.8413) y el tallo (Shannon 2.176, Simpson 0.835). Berg y col., 2005 realizaron un estudio de las comunidades bacterianas de papa presentes en cuatro microambientes, la rizósfera, filósfera, endoriza y endósfera y reportaron que el tejido más abundante de acuerdo con el índice de Shannon fue la rizósfera (2.7), seguido por la endósfera (2.0), endoriza (1.9) y filósfera (1.7). Nuestros resultados sugieren que algunas especies de bacterias endófitas presentes en la parte aérea de la planta de tomate, son parte de la comunidad bacteriana que logró colonizar la raíz a través de la rizósfera. Dichas cepas fueron capaces de colonizar los tejidos aéreos a través de los haces vasculares, aunque las comunidades bacterianas son menores.

Muchos estudios afirman que la efectiva colonización por bacterias antagonicas contribuye a una exitosa supresión de patógenos. Clases como Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacterias son asociados con la supresión de la enfermedad causada por el patógeno *R. solani*, este hongo es causante de infectar las raíces (Schenk 2012). Berg y col., (2005) reportaron la diversidad de organismos antagonicos de papa en diferentes microambientes (rizósfera, filósfera, endoriza y endosfera) contra *Verticillium dahliae* y *R. solani*, observando que la más baja proporción de antagonistas se obtuvo de la filósfera, mientras que la más alta proporción de bacterias antagonicas fue detecta en la endoriza. Esto debido a que estos patógenos son rizosféricos y por lo tanto atacan primero las raíces. Además que los factores abióticos como la sequía, precipitación y

radiación UV causan enorme estrés en las bacterias de la filósfera. Géneros como *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* y *Serratia* fueron buenos candidatos como agentes de biocontrol.

Muchos de los géneros como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Curtobacterium* de son reportados por su capacidad antagónica. *Bacillus* y *Pseudomonas* han sido ampliamente estudiadas por su amplia producción de metabolitos secundarios, incluyendo antibióticos, compuestos orgánicos volátiles, antifúngicos, antivirales y agentes insecticidas así como otros compuestos (Lodewckh y col., 2001). Pan y col., (2015), realizaron un estudio en el cultivo de trigo, sobre de la actividad antagónica de especies endófitas: *Bacillus subtilis* (BS43, BSM0 y BSM2), y *Bacillus megaterium* (BM1) contra *Fusarium graminearum* (patógeno de trigo), demostrando que estas bacterias reducen la incidencia de la enfermedad en un 93%.

Se ha documentado que el género *Bacillus* es potencialmente capaz de sintetizar un amplio rango de metabolitos con actividad antifúngica como son iturinas, surfactinas, fengicina y bacilomicina (Shun-Bin y col., 2012) y estos lipopéptidos son secretados por *Bacillus* endófitos de maíz dentro de los tejidos de las plantas o en la superficie para protegerla de patógenos fúngicos (Gond y col., 2014)

El halo de inhibición de los patógenos producido por la confrontación con las bacterias endófitas puede ser atribuido por compuestos antifúngicos difusibles producidos por estas bacterias. La producción de sideróforos es importante para la promoción de crecimiento y para el biocontrol hacia patógenos. En el presente estudio, se obtuvieron tres cepas aisladas de la hoja de tomate, dos de ellas CH21 y CH26 pertenecientes a las especies *B. vireti* y *S. flavogriseus* con mayor producción de sideróforos (halo de 6.6. y 6 respectivamente), y no tuvieron diferencias significativas con tres de las cepas control (*P. fluorescens* 256, 240 y 216) y la cepa CH11 (*L. shinshuensis*) obtuvo un halo de 3.6 mm y no tuvo diferencias significativas con respecto a la cepa control UM270 (*P. fluorescens*).

Se tienen reportes de bacterias productoras de sideróforos como el trabajo presentado por Owen y Ackerley (2011) donde analizaron a la especie *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola, agente causal de la plaga del frijol, esta bacteria ocupa diversos nichos y en condiciones limitadas de hierro produce sideróforos como son la pioverdina, acromobactina y yersiniabactina los cuáles son importantes para el buen funcionamiento de ésta. En este mismo sentido, existe otro reporte de sideróforos son los producidos por *Burkholderia cepacia* XXVI, fue aislada de la rizósfera de mango, y produce sideróforos de tipo hidroxamato, los cuáles son utilizados como agentes de biocontrol contra el agente causal de la antracnosis *Colletotrichum gloesporioides* (De los Santos-Villalobos y col., 2012). Algunos autores reportan la importancia de los sideróforos en el biocontrol de una amplia diversidad de géneros como son *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Ochrobacterium*, *Rhizobium* y *Burkholderia* contra *Pyricularia*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Macrophomina*, *Slerotium* y *Phytophthora* (Arora y col., 2001, Díaz de Villegas y col., 2002; Ezziyyani y col., 2004; Chaiharn y col., 2009)

Se han realizado pocos estudios acerca de los sideróforos producidos por bacterias endófitas, uno de ellos es el trabajo realizado por Rosconi y col. (2013), en el cuál identificaron y caracterizaron un sideróforo producido por *Herbaspirillum seropedicae* Z67 el cuál es un endófito de arroz, trigo, maíz y sorgo y encontraron que los sideróforos producidos por esta endófito pertenecen a las serobactinas A, B y C, las cuales son fuente de hierro para *H. seropedicae*. Las bacterias endófitas pertenecientes al género *Pseudomonas* han sido reportas por producir sideróforos. Mercado-Blanco y col., (2004) observaron que el endófito de raíz de olivo *P. fluorescens* PICF7 produce pioverdina en condiciones limitadas de hierro in vitro. Loaces y col., (2010) analizaron la producción de sideróforos en bacterias endófitas de arroz, resaltando la presencia de un aislado de *Pseudomonas* con actividad antimicrobiana. En el presente trabajo se observaron bacterias endófitas productoras de sideróforos, es importante resaltar que no existen reportes de las bacterias *B. vireti*, *S. flavogriseus* y *L. shinshuensis* como productoras de

sideróforos, no obstante, es necesario realizar el estudio de qué tipo de sideróforos se encuentran en cada una de las bacterias.

Algunas bacterias endófitas producen enzimas líticas capaces de lisar las paredes celulares de hongos. Entre las cuáles se encuentran celulasas, quitinasas, glucanasas y proteasas. Se observó que 6 de las 96 endófitas que producen proteasas, poseen mayor producción (halo mayor a 3.5mm), las especies responsables son *B. trypoxylicola*, *M. oxydans*, *B. thuringiensis* (2) y *B. toyonensis* (2); todas aisladas de la raíz. Pleban y col., (1997) reportaron que una quitinasa de la bacteria endófito *Bacillus cereus* protege a las plántulas de algodón de la putrefacción de la raíz, enfermedad causada por el hongo *Rhizoctonia solani*. Jia-Hong y col., 2013 reportan que la bacteria endófito *Bacillus pumilus* JK-SX001 posee capacidad antagónica sobre hongos causantes de la enfermedad del chancro, (*Cytospora chrysosperma*, *Phomopsis macrospora* y *Fusicoccum aesculi*) principalmente *Cytospora chrysosperma* en *Populus* sp., esto debido a la producción de enzimas extracelulares como son las celulasas y proteasas. Por lo anterior, se observa que el género *Bacillus* ha sido ampliamente reportado por su capacidad para producir enzimas líticas, no así, el género *Micobacterium* el cuál hasta donde sabemos es el primer reporte.

El AIA es producido por bacterias endófitas como *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp., y *Azospirillum* spp (Spaepen y col., 2007). Long y col (2008) realizaron un estudio de la promoción de crecimiento en plantas de *Solanum nigrum* y *Nicotiana attenuata* por medio de bacterias endófitas de *S. nigrum*, observaron el género *Pseudomonas* más predominante, también encontraron géneros como *Enterobacter*, *Pantoea*, *Agrobacterium* y *Acinetobacter*, todas productoras de AIA teniendo como precursor el triptófano y el crecimiento de las raíces está correlacionado con la producción de AIA. Sin embargo, estos endófitos de *S. nigrum* no mostraron efectos predecibles y generales en el crecimiento de *N. attenuata*, ya que los endófitos fueron reconocidos como patógenos.

Géneros como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Arthrobacter*, *Xanthomonas*, entre otras han sido reportadas como promotoras del crecimiento vegetal; la especie *Bacillus* coincide con el presente trabajo ya que aquí se encontró que promueve la longitud de la parte aérea y de la raíz (el caso de *B. vireti* CH21), mientras que *B. drentensis* CH23 promueve el peso tanto de parte aérea como de raíz, así como también produce mayor cantidad y longitud de raíces laterales en plantas de tomate verde. La inoculación bacteriana fue encontrada como un incremento significativo de la producción de biomasa, y actividad fotosintética. Los aislados *B. drentensis* CH23 y *B. vireti* CH21 (mayor productor de indoles totales y sideróforos) indican una relación entre la promoción de crecimiento y la producción de indoles/sideróforos. Por lo que representan excelentes candidatos para futuros trabajos como agentes de biocontrol y promotores del crecimiento vegetal.

10. CONCLUSIONES

La abundancia (UFC/gr de tejido) de aislados bacterianos fue mayor en la raíz respecto a los tejidos de la parte aérea de planta (tallo y hojas).

Las especies bacterianas más abundantes como endófitas de tallo fueron *L. shinshuensis*, *M. phyllosphaerae*, la especie *P. pabuli* lo fue en hoja y *B. thuringiensis* fue la más comúnmente aislada de los tejidos radiculares.

Las especies *B. toyonensis* y *B. thuringiensis* se encontraron en los tres tejidos analizados.

La gran mayoría de los aislados exhibieron mecanismos promotores del crecimiento vegetal, el 89.9% produjo indoles totales, 67.6% proteasas, 33.8% sideróforos, actividad antagónica contra *B. cinerea* 21.37%, 35.9% contra *F. oxysporum*, 25.5% y 20% contra *F. solani* y *R. solani* respectivamente.

Los aislados *B. drentensis* CH23 y *B. vireti* CH21 fueron los únicos que presentaron la capacidad de promover el crecimiento vegetal en tomate verde en condiciones *in vitro*.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adesemoye AO, Kloepper JW (2009) Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied Microbiology Biotechnology*. 85:1-12.
2. Apodaca-Sánchez MA, Barreras Soto MA, Cortez-Mondaca E, Quintero-Benítez JA (2007) Enfermedades del tomate de cáscara en Sinaloa. INIFAP.
3. Arora NK, Kang SC, Mheshwari DK (2001) isolation of siderophores producing Strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potencial against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal root of groundnut *Current Science* 81: 673-677.
4. Bacilio-Jiménez M, Aguilar-Flores S, Ventura-Zapata E, Pérez-Campos E, Bouquelet S, Zenteno E (2003) Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria *Plant Soil* 249:79-110.
5. Bacon CW, Hinton DM(1994). Bacterial endophytes: the endophytic Niche, its occupants, and its utility. In *Plant-Associated Bacteria*, SS Gnanamanickam (Ed), Springer, The Netherlands 155-94.
6. Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms *Annual Review of Plant Biology* 57:233-266.
7. Benhamou N, Gagné S, Quéré DL, Dehbi L (2000) Bacterial mediated induced resistance in cucumber: beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia phymuthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum* *Biochemistry Cell Biology* 90:45-56.
8. Benizri E, Baudoin E, Guckert A (2001) Root colonization by inoculated plant growth rhizobacteria. *Biocontrol Science and Technology* 11: 557-574.
9. Berg G, Hallmann J (2006) Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes. In: *Microbial root endophytes*. Schulz B, Boyle C, Sieber TN, eds Springer, Berlin pp 53-67.

10. Berg G, Krechel A, Ditz M, Sikora RA, Ulrich A, Hallmann J (2005) Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi *FEMS (Fed Eur Microbiol Soc) Microbiology Ecology* 51:215-229.
11. Bodenhausen N, Horton MW, Bergelson J (2013). Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 8:e56329.
12. Brader G, Compant S, Mitter B, Trognitz F, Sessitsch A (2014) Metabolic potential of endophytic bacteria *Current Opinion in Biotechnology* 27:30-37.
13. Chaiharn M, Chunnaleuchanon S, Lumyong S (2009) Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand *World Journal Microbiology Biotechnology* 25:1919-1928.
14. Compant S (2007) Interaction between grapevine, *Vitis vinifera* L, and the endophytic bacterium *Burkholderia phytofirmans* strain pajn: colonization, induced defense responses and systemic resistance towards *Botrytis cinerea*, URCA, Remis 210pp.
15. Compant S, Clément C, Sessitsch A (2009) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization *Soil Biology & Biochemistry* 42: 669-678.
16. Compant S, Clement C, Sessitsch A (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization *Soil Biology & Biochemistry* 42:669-678.
17. Compant S., B. Duffy, J. Nowak, C. Clément, E. Barka (2005). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied Environmental Microbiology*. 71 (9):4951-4959.
18. De los Santos-Villalobos S, Barrera-Galicia GC, Miranda-Salcedo MA, Peña-Cabriaes JJ (2012) *Burkholderia cepacia* XXVI siderophore with

- biocontrol capacity against *Colletotrichum gloeosporioides* *World Journal Microbiology Biotechnology* 28:2615-2623.
19. De Weert S, Vermeiren H, Mulders IHM, Kuiper I, Hendrickx N, Bloemberg GV, Vanderleyden J, De Mot R, Lugtenberg BJJ (2002) Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens* *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15: 1173-1180.
20. Díaz de Villegas ME, Villa P, Frías A (2002) Evaluation of the siderophores production by *Pseudomonas aeruginosa* PSS. *Revista Latinoamericana Microbiología* 44: 112-117.
21. Drechsel H., G. Jung (1998). Peptide siderophores J. Peptide Sci. 4:417-181.
22. Duffy B., G. Défago (1999). Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Applied Environmental Microbiology* 65:2429-2438.
23. Dyvas M., G. Tataru, C. S. Criddle (1995). Localization of carbon tetrachloride transformation activity of *Pseudomonas* sp. Strain KC. *Applied Environmental Microbiology*. 61:758-762.
24. Ezziyyani M, Pérez C, Requena M, Ahmed A, Candela M (2004) Evaluación del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.) por tratamiento con *Burkholderia cepacia* *Anales de Biología* 26:61-68.
25. Ferrara FID, Oliveira ZM, Gonzales HHS, Floh EIS, Barbosa HR (2012). Endophytic and rhizospheric enterobacteria isolated from sugar cane have different potentials for producing plant growth-promoting substances *Plant Soil* 353:409-417.
26. Gasser I, Cardinale M, Muller H, Hellen S, Eberl L, Lindenkamp N, Kaddor C, Steinbuchel A, Berg G (2011) Analysis of the endophytic lifestyle and plant growth promotion of *Burkholderia terricola* ZR2-12 *Plant and Soil* 347:125-136.
27. Germaine K, Keogh E, García-Cabellos G, Borremans B, Van der Lelie D, Barac T, Oeyen L, Vangronsveld J, Porteous F, Moore ER, Campbell CD,

- Ryan D, Dowling D (2004) Colonisation of poplar trees by gfp expressing bacterial endophytes. *FEMS Microbiology Ecology* 48:109-118.
28. Glick B (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica* 1-15.
29. Gond SK, Bergen MS, Torres MS, White Jr JF (2015) Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defense gene expression in maize *Microbiological Research* 172:79-87.
30. Hallman J, Berg G (2006). Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes.
31. Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, Kloepper JW (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal Microbiology* 43:895-914.
32. Hardoim PR, van Overbeek LS, van Elsas JD (2008) Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Cell* 463-471.
33. Ivanchenko MG, Muday GK, Dubrovsky JG (2008) Ethylene-auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in *Arabidopsis thaliana* *Plant Journal Cell Molecular Biology* 55:335-347.
34. Jia-Hong R, Hao L, Yan-Fang W, Jian-Ren Y, Ai-Qin Y, Xian-Quin W (2012) biocontrol potential of an endophytic *Bacillus pumilus* JK-SK001 against poplar canker *Biological Control* 67: 421-430.
35. Johnson-Monje D, Raizada MN (2011) Conservation and Diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, ethnography and ecology *PLoS One* 6(6): e 20396.
36. Lindow SE (1996). Role of immigration and other processes in determining epiphytic bacterial populations-implications for disease Management. In *Aerial Plant Surface Microbiology*. New-York:Plenum 155-168.
37. Lindow SE, Barndl MT (2003). Microbiology of the phyllosphere. *Applied Environmental Microbiology* 69:1875-1883.
38. Loaces I, Ferrando L, Scavino AF (2010) Dynamics, diversity and function of endophytic siderophore-producing bacteria in rice *Microbial Ecology* 61: 606-618.

39. Lodewyckz C, Vangronsveld J, Porteous F (2001) Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews Plant Sciences* 21:583-606.
40. Long HH, Schmidt DD, Baldwin IT (2008) Native bacterial endophytes promote host growth in a species-specific manner; phytohormone manipulations do not result in common growth responses *PLoS One* 3:e2702.
41. Lopez MA, Bannenberg G, Castresana C (2008) Controlling hormone signaling is a plant and pathogen Challenger for growth and survival *Current Opinion Plant Biology* 15:92-96.
42. Malfanova N, Lugtenberg B, Berg G (2013) Bacterial endophytes: who and where, and what are they doing there? *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere* Frans J de Bruijn (ed), Wiley-Blackwell.
43. Manter DK, Delgado J, Holm DG, Strong R (2010) Pyrosequencing reveals a highly diverse and cultivar-specific bacterial endophyte community in potato roots *Microbial Ecology* 60:157-166.
44. Márquez-Santacruz H, Hernández León, Orozco-Mosqueda MC, Velázquez-Sepúlveda I, Santoyo G (2010). Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*) and their detection in the rhizosphere. *Genetics and Molecular Research* 9(4):2372-2380.
45. Mengoni A, Pini F, Huang L-N, Shu W-S, Brazzicalpu M (2009) Plant by plant variations of bacterial communities associated with leaves of the nickel hyperaccumulator *Alyssum bertolonii* Desv *Microbial Ecology* 58:660-667.
46. Mercado-Blanco J, Rodríguez-Jurado D, Hervás A, Jiménez-Díaz RM (2004) Suppression of Verticillium wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. *Biological Control* 30:474-86.
47. Mitter B, Petric A, Shin MW, Chain PS, Hauberg-Lotte L, Reinhold-Hurek B, Nowak J, Sessitsch A (2013) Comparative genome analysis of *Burkholderia phytodimans* PSjn reveals a wide spectrum of endophytic lifestyles based on interaction strategies with host plants *Front Plant Science* 4:120.

48. Monteiro RA, Balsanelli E, Wassem R, Marin AM, Brusamarello-Santos LCC, Schmidt MA, Tadra-Sfeir MZ, Pankiewicz VCS, Cruz LM, Chubatsu LS, Pedrosa FO, Souza EM (2012). *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects *Plant Soil* 356:175-196.
49. Owen JG, Ackerley D (2011) Characterization of pioverdine and achromobactin in *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola 1448a. *BMC Microbiology* 11:218.
50. Pan D, Mionetto A, Tiscornia S, Bettucci L (2015) Endophytic bacteria from wheat grain as biocontrol agents of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol production in wheat *Mycotoxin Research* doi 10.1007/s12550-015-0224-8.
51. Pérez J, Hurtado G, Aparicio V, Argueta Q, Larín M. (1995) Cultivo de tomate CENTA Guía técnica 47p.
52. Pillary V K, Nowak J (1997). Inoculum density, temperature, and genotype effects on in Vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium *Canadian Journal Microbiology* 43:354-361.
53. Pleban S, Chermin L, Chet I (1997) Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus* *Letters Applied Microbiology* 25: 284-288.
54. Purves W, Sadova D, Orians G, Heller C (2002) Vida La ciencia de la vida 6a. Edición, Editorial Medica Panamericana New York pp 1133.
55. Raaijmakers JM, Mazzola M (2012) Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annual Review Phytopathology* 50:403-424.
56. Reinhold-Hurek B, Hurek T (1998) Life in grasses: diazotrophic endophytes *Trends in Microbiology* 6:139-144.
57. Rosconi F, Davyt D, Martínez V, Martínez M, Abin-Carriquiry JA, Zane H, Butler A, de Souza E, Fabiano E (2013) Identification and structural characterization of serobactins, a suite of lipopeptide siderophores produced

- by the grass endophyte *Herbaspirillum seropedicae* *Environmental Microbiology* 15(3) 916-927.
58. Rosenblueth M, Martínez-Romero E (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19:827-837.
59. Salisbury F (1994) Fisiología vegetal Editorial Iberoamericana México pp 759.
60. Sattelmacher B (2001) the apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytologist* 22:167-192
61. Schulz B, Boyle C (2005) The endophytic continuum *Mycological Research* 109:661-686.
62. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) (2013). Resumen nacional de la producción agrícola por cultivo. www.siap.sagarpa.gob.mx
63. Sessitsch A, Hardoim P, Doring J, Weilharter A, Krause A, Woyke T, Mitter B, Hauberg-Lotte L, Friedrich F, Rahalkar M, Hurek T, Sarkar A, Bodrossy L, Van Overbeek L, Brar D, Van Elsas JD, Reinhold-Hurek B (2012). Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomics analysis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25:28-36.
64. Shu-Bin L, Mao F, Ren-Chao Z, Juan H (2012) Characterization and evaluation of the endophyte *Bacillus* B014 as a potential biocontrol agent for the control of *Xanthomonas axonopodis* pv *dieffenbachiae* induced blight of *Anthurium* *Biological Control* 63:9-16.
65. Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R (2007) Indole -3-acetic acid in microbial and microorganisms-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews* 31:425-448.
66. Sturz AV, Christie BR, Matheson BG Nowak J (1997). Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth *Biology Fertility Soils* 25:13-19.

67. Sun L, Qiu F, Zhang X, Dai X (2008) Endophytic bacterial Diversity in rice (*Oryza sativa* L) roots estimated by 16SrDNA sequence análisis *Microbial Ecology* 55:415-424.
68. Taboada M.S. y R. Oliver G. (2004). Cultivos alternativos en México. Primera edición. Editorial AGT Editor, S.A. México, D.F. p. 169.
69. Tan Z, Hurek T, Reinhold-Hurek B. (2003). Effect of N-fertilization, plant genotype and environmental conditions on nifH gene pools in roots of rice. *Environmental Microbiology* 5:1009-1015.
70. Ulrich K, Ulrich A, Ewald D (2008) Diversity of endophytic bacterial communities in poplar growth under field conditions. *FEMS Microbiology Ecology* 63: 169-80.
71. Vorholt JA (2012). Microbial life en the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology* 10:828-840.
72. Wang Y., H. N. Brown, D. E. Crowley, P. J. Szaniszlo (1993). Evidence for directutilization of ferrioxamine B in axenically- grown cucumber. *Plant Cell Environment* 16:579-585.