

Diversidad de bacterias endófitas en raíces de tomate (*Physalis ixocarpa*) mediante el análisis de genes de la subunidad 16S de ARN ribosomal

Claudia E. Hernández Pacheco, Julie E. Hernández-Salmerón, Rocío Hernández-León, Cristina M. Prieto-Barajas, Sofía Martínez-Absalón, Eduardo Valencia-Cantero y Gustavo Santoyo

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, UMSNH

Resumen

La diversidad de bacterias endófitas fue estimada en raíces de plantas de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*) por medio de la amplificación y secuenciación de genes ribosomales 16S. Se identificaron 16 unidades taxonómicas operacionales (OTUs) en una biblioteca de clonas mediante el análisis tipo Blast, incluyendo las clases Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria, Actinobacteria, Bacilli y bacterias no cultivables. Los cinco géneros predominantes fueron *Stenotrophomonas*, *Microbacterium*, *Burkholderia*, *Bacillus* y *Pseudomonas*. Nuestros resultados sugieren que la diversidad bacteriana endófitas dentro de las raíces de plantas de tomate pertenecen a géneros bacterianos asociados a la rizósfera y con gran potencial para llevar a cabo funciones de promoción del crecimiento vegetal.

Palabras clave: Endófitos, diversidad bacteriana, *Physalis ixocarpa*, rRNA 16S.

Abstract

The endophytic bacterial diversity was estimated in Mexican husk tomato plant roots by sequence homology analysis of the 16S rDNA genes. 16 OTUs (Operational Taxonomic Units) from the 16S rDNA root library were identified based on sequence analysis, including the classes Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria, Actinobacteria, Bacilli and uncultured bacteria. The five predominant genera were *Stenotrophomonas*, *Microbacterium*, *Burkholderia*, *Bacillus* and *Pseudomonas*. Our results suggest that endophytic bacterial diversity in roots of tomato plants belong to bacterial genera associated to the rizhosphere with great potential to carry out the functions of plant growth promotion.

Keywords: Endophytes, bacterial diversity, *Physalis ixocarpa*, rRNA 16S.

Introducción

Existen diversas relaciones entre los microorganismos y las plantas. Puede haber asociaciones dañinas, neutrales y benéficas. Entre las asociaciones benéficas se pueden presentar aquellas donde las bacterias pueden colonizar el tejido interno de la planta. Es en este microambiente donde se da una estrecha relación bacteria-planta. Las bacterias endófitas pueden ser definidas como aquellas bacterias que colonizan los tejidos internos de la planta y no muestran signos externos de infección o efectos negativos en su hospedante (Schulz y Boyle 2006).

Las primeras evidencias de asociación entre microorganismos endófitos y plantas se originaron de observaciones en tejidos y hojas fosilizadas, lo que soporta la inferencia de que la asociación planta-endófito pudo haber ocurrido junto con la aparición de las primeras plantas en la tierra (Strobel 2004). El beneficio de las interacciones planta-bacteria que promueven la salud y desarrollo de la planta han sido objeto de estudio desde hace décadas. Algunos trabajos recientes también investigan su potencial para el mejoramiento de la biodegradación de contaminantes del suelo, síntesis de compuestos antibacterianos o antifúngicos, así como la producción de metabolitos o compuestos que promuevan el crecimiento vegetal (Rijavec et al., 2007; Berg et al., 2005; Brooks et al., 1994; Tan et al., 2006).

Distintos estudios han mostrado que la diversidad bacteriana endófito de plantas puede ser una subpoblación de los habitantes de la rizósfera (Germida et al., 1998). Así mismo, la gran mayoría de los estudios poblacionales bacterianos y de otros grupos se han enfocado en la rizósfera (Lindow y Brandl 2003; Kuiper et al., 2004; Berg et al., 2005). Se ha propuesto que de las aproximadamente 300,000 especies de plantas que existen en la tierra, cada planta individual es hospedera de diversas bacterias endófitas (Strobel et al., 2004).

Los endófitos bacterianos de plantas han sido estudiados en plantas de maíz, frijol, plátano, uva, trigo y papa, entre otras (Rosenblueth y Martínez-Romero 2006). La diversidad que se ha reportado depende en gran parte del tipo de especie vegetal que se ha analizado. Por ejemplo, se han reportado especies de las bacterias *Stenotrophomonas maltophilia* y

Microbacterium sp. en raíces de plantas de arroz, pastos y algodón (Sun 2008; Dalton et al., 2004; McInroy y Kloepper 1995). Así mismo, estos géneros han sido ampliamente estudiados por promover el crecimiento vegetal. Especies de otros géneros como *Pantoea* y *Cellulomonas* han sido aisladas y reportadas como endófitas de plantas de arroz, frijol soya, uva y maíz (Elvira-Recuenco y Van Vurde 2000; Bulgari et al., 2009). Las especies de estos géneros han mostrado su capacidad para degradar compuestos tóxicos, así como se ha mostrado que especies del género *Pantoea* pueden inhibir el crecimiento de patógenos de plantas (Zinniel et al., 2002).

En el presente estudio, se realizó una caracterización de la comunidad endófito bacteriana que se encuentra en las raíces de plantas de tomate verde o de cáscara (*Physalis ixocarpa*) empleando la secuencia de genes que codifican para la subunidad 16S de ARN ribosomal (ARNr).

Materiales y Métodos

Muestreo de plantas y análisis físico-químico del suelo

Se colectaron diez plantas de *P. ixocarpa* Brot. de dos meses de edad y el suelo rizosférico de cada una de ellas en un campo agrícola en Salvatierra, Guanajuato, México (20°12'54"N, 100°52'41"O, Altitud 1759 msnm). Las muestras fueron transportadas inmediatamente al laboratorio para su análisis. Las características físico-químicas del suelo se analizaron en el Laboratorio de Fertilidad de Suelos y Nutrición Vegetal en el INIFAP-México, y fueron las siguientes: textura franco-arcillosa, pH 7.9, el contenido de materia orgánica fue de 2.66%, 30.52% de arcilla, 12.1 ppm de N inorgánico.

Esterilización superficial de las raíces y extracción de ADN total

Una vez que se eliminaron las partículas del suelo rizosférico, las raíces se lavaron con agua destilada estéril. Las raíces se sumergieron en etanol al 70% durante 3 min, se lavaron con solución de hipoclorito de sodio fresco durante 5 min, se enjuagaron con etanol al 70% durante 30 segundos y finalmente se lavaron cinco veces con agua destilada estéril. Para confirmar que el proceso de esterilización de la superficie radicular se realizó correctamente, se inocularon alícuotas de 100 µL del agua destilada estéril utilizada en el enjuague final en caldo de cultivo Luria-Bertani (LB) y placas de agar nutritivo (AN). Las placas se examinaron en busca de crecimiento bacteriano después de incubación a 28°C durante 5 días, sin observarse colonias bacterianas. Las raíces de diez plantas (10 g en total de tejido vegetal) con superficie esterilizada se utilizaron para el aislamiento de ADN mediante el método descrito por Xie y colaboradores (1999).

Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa de los genes 16S bacterianos

Los genes de la subunidad 16S de ARNr fueron amplificados utilizando los cebadores universales bacterianos FD1, 5'-CAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y Rd1, 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3', correspondientes a las posiciones 8 a 28 y 1526 a 1542 del gen 16S de *Escherichia coli*, respectivamente (Weisburg et al., 1991). Se utilizaron las siguientes condiciones de PCR: una desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min, 30 ciclos de 1 min a 95 °C para la desnaturalización, 1 min a 53 °C para el alineamiento y 2 min a 72 °C para la extensión; y un paso de extensión final a 72 °C durante 5 min. Los productos de PCR se observaron en un gel de agarosa al 1% y se purificaron mediante el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA) de acuerdo al proveedor. Los fragmentos de PCR purificados fueron clonados en el vector pGEM-T Easy (Promega) y los productos de la ligación se utilizaron para transformar células de *E. coli* DH5 α electrocompetentes para generar la biblioteca de genes ribosomales 16S. Se detectaron 146 clonas positivas en medio LB adicionado con ampicilina (100 μ g/ml) con 80 mg/ml de X-Gal. El análisis de restricción de los plásmidos recombinantes del total de clonas se realizó con la enzima *EcoRI* para detectar los insertos. Una vez detectados los insertos en clonas positivas, se purificaron con un kit comercial (Promega, USA) y se secuenciaron mediante el uso de cebadores del vector (M13 "forward" y "reverse") en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Diversidad, Irapuato Gto.

Análisis de las secuencias de los genes 16S ribosomales

La posibilidad de obtener secuencias quiméricas se analizó utilizando el programa CHIMERA_CHECK de la página web del Ribosomal Database Project (Maidak et al., 1999). Las secuencias consideradas como quimeras fueron depuradas y comparadas con la base de datos GenBank (NCBI) utilizando el programa BLASTN, para obtener las mejores identidades. Dichas secuencias fueron depositadas en el GenBank con los números de acceso HM216894-HM216910.

Resultados y Discusión

En este trabajo se analizó la diversidad bacteriana endófitas en las raíces de plantas de tomate de cáscara mediante la amplificación y secuenciación de genes que codifican para la subunidad 16S del ARNr, con longitudes que varían entre 560 y 1450 pb. Este análisis sugiere que la biblioteca de raíces de tomate de cáscara (la cual consta de más de 140 clonas) contiene 16 OTUs, que incluye las clases Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria, Actinobacteria, Bacilli y bacterias no cultivables (Figura 1). Los géneros predominantes fueron *Stenotrophomonas* y *Microbacterium*, ya que 20 clonas mostraron identidad con cada uno de dichos géneros, en particular con las especies *S. maltophilia* y *M. foliorum*. Otro género abundante fue *Pseudomonas* con 16 clonas, mientras que en el caso de *Burkholderia cepa-*

cia se encontró identidad en 14 clonas, *Bacillus licheniformis* con 9 y *Bacillus subtilis* con 8. Otras secuencias mostraron identidad con bacterias de los géneros *Pantoea*, *Xanthomonas*, *Cellulomonas* y bacterias no cultivables (Figura 2). Cabe destacar que los porcentajes de identidad fueron mayores al 98% en todas las secuencias encontradas.

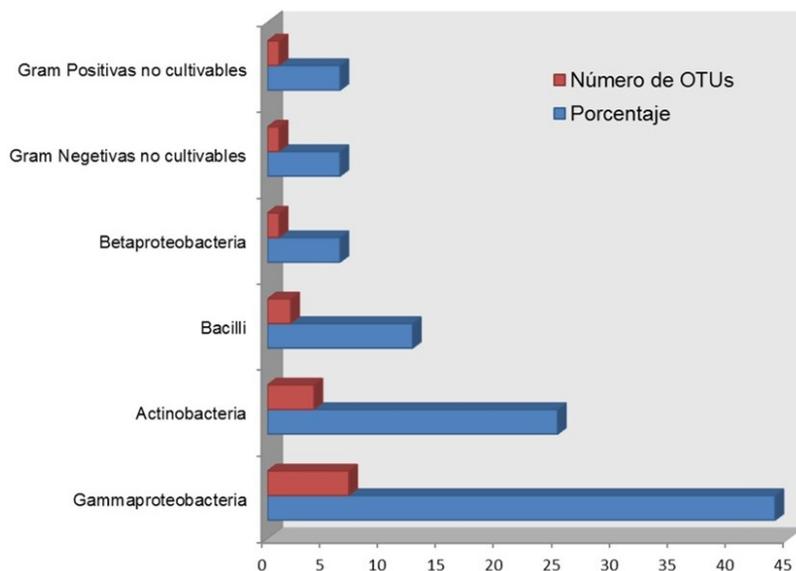
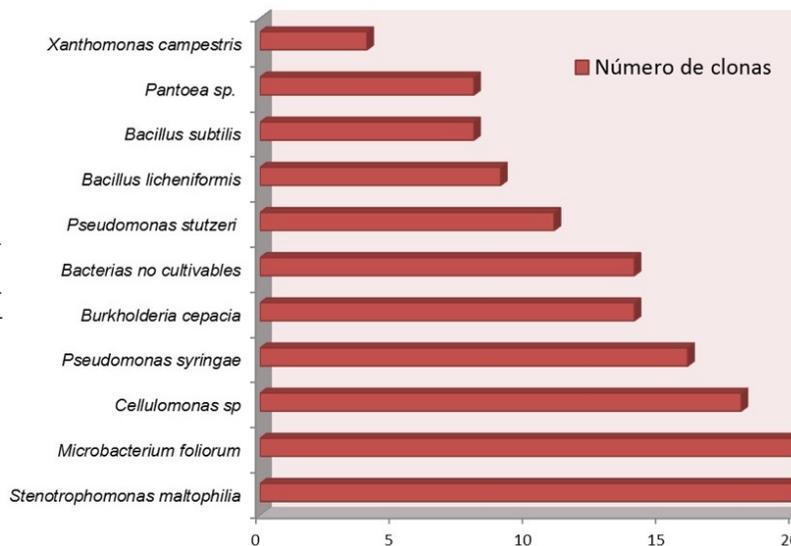


Figura 1. Diversidad de OTUs (unidades taxonómicas operacionales) y clases bacterianas encontrados en una biblioteca de genes ribosomales 16S aislados de raíces de plantas de tomate verde *Physalis ixocarpa*.

Figura 2. Diversidad de genes ribosomales 16S que corresponden a diferentes especies de bacterias endófitas en raíces de *Physalis ixocarpa*.



Nuestros resultados sugieren que el grupo más dominante está afiliado a las Gamma-proteobacteria, lo cual es consistente con otros estudios (Chelius y Triplett 2001; Kaiser et al., 2001; Sun et al., 2008). Esta clase incluye siete de dieciséis OTUs encontrados en la población analizada, lo que representa casi el 45%. 41 clonas mostraron alta identidad con las especies *Stenotrophomonas* sp. y *S. malthophilia*. Las especies de *Stenotrophomonas* se han aislado o detectado como endófitos de las raíces del arroz (Dalton et al., 2004; Sun et al., 2008) y plantas de algodón (McInroy y Kloepper 1995). Algunos estudios reportan especies de *Stenotrophomonas* como promotoras del crecimiento vegetal, y que pueden suprimir el desarrollo de enfermedades por la secreción de algunos compuestos, tales como el antibiótico maltofilina (Jakovi et al., 1996). El segundo grupo más representado fue *Microbacterium* sp., que se ha reportado en asociación endófitica con diferentes plantas y semillas de maíz (Zinniel et al., 2002; Conn y Franco, 2004; Rijavec et al., 2007). Por ejemplo, Conn y Franco (2004) reportaron varias especies de *Microbacterium* en un análisis de las poblaciones endófitas en las raíces de trigo (*Triticum aestivum* L.), siendo el género predominante en ese estudio.

Otras secuencias de ADNr 16S en nuestra biblioteca mostraron alta identidad con bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Bacillus* (98-100%). Tales géneros se han estudiado ampliamente debido a su gama de productos metabólicos secundarios incluyendo antibióticos, compuestos orgánicos volátiles, antifúngicos, antivirales e insecticidas entre otros compuestos (Lodewyckx et al., 2001; Ryan et al., 2008). También se detectó la presencia de nueve clonas que tenían identidad con *Xanthomonas campestris*, un patógeno de diversas plantas (Bashan, 1982; Guevara y Maselli, 2005). Bashan y colaboradores en 1982 mostraron la supervivencia de *X. campestris* pv. *vesicatoria* en las semillas y raíces de plantas de Chile sin mostrar síntomas de alguna enfermedad, aunque no se descarta la aparición de la enfermedad en algunas otras etapas de crecimiento. En este trabajo no se observó ningún síntoma de enfermedad en las plantas de tomate en el momento de la colecta. De acuerdo con diversos estudios, las poblaciones de endófitos pueden ser afectadas por factores biológicos o ambientales, tales como la edad de la planta, el tipo de tejido y el tiempo de muestreo (Siciliano et al., 1998; Araujo et al., 2001; Adams y Kloepper, 2002). El análisis de las funciones o actividades patogénicas en cepas de *X. campestris* endófitas podría ser un interesante tema de investigación.

Pantoea y *Cellulomonas* son otros dos géneros que se encuentran en nuestra biblioteca como endófitos de las plantas de tomate. *Pantoea* es un residente endófitico de diferentes plantas, como el arroz, soya, uva y maíz (Elvira-Recuenco y van Vuurde 2000; Bulgari et al., 2009). Curiosamente, la cepa TR-5 de *P. ananatis*, que fue aislada a partir de semillas de maíz, inhibe *in vitro* el crecimiento del hongo *Lecanicillium aphanocladii* (Bulgari et al., 2009). Zinniel y colaboradores (2002) aislaron especies de *Cellulomonas* de tejidos vegetales y mostraron una adecuada capacidad de colonización y sobrevivencia.

Finalmente, nuestros resultados muestran que dentro de las raíces de plantas de tomate, *P. ixocarpa*, residen bacterias endófitas que podrían tener un gran potencial para el control biológico de enfermedades vegetales, así como realizar funciones que promuevan el

crecimiento y la salud de las plantas. Actualmente estamos llevando a cabo el aislamiento de estas bacterias cultivables para detectar la síntesis de fitohormonas y antibióticos en plantas de tomate verde.

Agradecimientos

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto No. 169346) y a la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (2012-2013) por financiar los diversos proyectos de nuestro laboratorio. Se agradece también a los revisores anónimos por sus comentarios y sugerencias.

Referencias

- Adams P. y J. Klopper. 2002. Effect of host genotype on indigenous bacterial endophytes of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Soil* 240:181-189.
- Araujo W., L., W. Maccheroni, C.I. Aguilar-Vidoso y P.A. Barroso. 2001. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Can. J. Microbiol.* 47:229-236.
- Bashan Y. 1982. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper seeds and roots in symptomless and dry leaves in non-host plants and in the soil. *Plant Soil* 68:161-170.
- Berg G., A. Krechel, M. Ditz, R.A. Sikora, A. Ulrich y J. Hallmann. 2005. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51:215-229.
- Brooks D.S., C.F. González, D.N. Appel y T.H. Filer. 1994. Evaluation of endophytic bacteria as potential biological control agents for oak wilt. *Biol. Control* 4:373-381.
- Bulgari D., P. Casati, L. Brusetti, F. Quaglino, M. Brasca, D. Daffonchio y P. Bianco. 2009. Endophytic bacterial diversity in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves described by 16S rRNA gene sequence analysis and length heterogeneity-PCR. *J. Microbiol.* 47:393-401.
- Conn V.M. y C.M. Franco. 2004. Analysis of the endophytic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) by terminal restriction fragment length polymorphism and sequencing of 16S rRNA clones. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1787-1794.
- Chelius M.K. y E. Triplett. 2001. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. *Microb. Ecol.* 41:252-263.
- Dalton D.A., S. Kramer, N. Azios, S. Fusaro, E. Cahill y C. Kennedy. 2004. Endophytic nitrogen fixation in dune grasses (*Ammophila arenaria* and *Elymus mollis*) from Oregon. *FEMS Microbiol. Ecol.* 49:469-479.
- Elvira-Recuenco M. y J. W. Van Vuurde. 2000. Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. *Can. J. Microbiol.* 46:1036-1041.

- Germida J.J., S.D. Siciliano, J.R. De Freitas y A. Seib. 1998. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiol. Ecol.* 26:43-50.
- Guevara Y. y A. Maselli. 2005. Bacteriosis en cilantro (*Coriandrum sativum* L.) causada por *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson en Venezuela. *Rev. Mex. Fitopatol.* 23:97-100.
- Jakobi M., G. Winkelmann, D. Kaiser, C. Kempler, G. Jung, G. Berg y H. Bahl. 1996. Maltophilin: a new antifungal compound produced by *Stenotrophomonas maltophilia* R3089. *J. Antibiot.* 49:1101-1104.
- Kaiser O., A. Pühler y W. Selbitschka. 2001. Phylogenetic analysis of microbial diversity in the rhizoplane of oilseed rape (*Brassica napus* cv. *Westar*) employing cultivation-dependent and cultivation-independent approaches. *Microb. Ecol.* 42:136-149.
- Kuiper I., E.L. Lagendijk, G.V. Bloemberg y B.J. Lugtenberg. 2004. Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17:6-15.
- Lindow S.E. y M. Brandl. 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1875-1883.
- Lodewyckx C., S. Taghavi, M. Mergeay, J. Vangronsveld, H. Clijsters y D. Van Der Lelie. 2001. The effect of recombinant heavy metal resistant endophytic bacteria in heavy metal uptake by their host plant. *Int. J. Phytoremediation* 3:173-187.
- Maidak B.L., J.R. Cole, C.T. Parker, G.M. Garrity Jr, N.B. Larsen, B. Li, T.G. Lilburn, M.J. McCaughey, G.J. Olsen, R. Overbeek, S. Pramanik, T.M. Schmidt, J.M. Tiedje y C. Woese. 1999. A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.* 27:171-173.
- McInroy J.A. y J. Kloeppel. 1995. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant Soil* 173:337-342.
- Rijavec T., A. Lapanje, M. Dermastia y M. Rupnik. 2007. Isolation of bacterial endophytes from germinated maize kernels. *Can. J. Microbiol.* 53:802-808.
- Rosenblueth M. y E. Martínez-Romero. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:827-837.
- Ryan R.P., K. Germaine, A. Franks, D.J. Ryan y D. Dowling. 2008. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiol. Lett.* 278:1-9.
- Schulz B. y C. Boyle. 2006. What are endophytes? In: Schulz, B.J.E., Boyle, C.J.C., Sieber, T.N. (Eds), *Microbial Root Endophytes*. Springer-Verlag, Berlin, pp 1-3.
- Siciliano S.D., J.R. Theoret, P. de Freitas, J. Huci y J. Germida. 1998. Differences in the microbial communities associated with the roots of different cultivars of canola and wheat. *Can. J. Microbiol.* 44:844-851.
- Strobel G., B. Daisy, U. Castillo y J. Harper. 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *J. Nat. Prod.* 67:257-268.

- Sun L., F. Qiu, X. Zhang, X. Dai, X. Dong y W. Song. 2008. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microb. Ecol.* 55:415-424.
- Tan H.M., L.X. Cao, Z.F. He, G.J. Su, B. Lin y S. Zhou. 2006. Isolation of endophytic actinomycetes from different cultivars of tomato and their activities against *Ralstonia solanacearum* *in vitro*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22:1275-1281.
- Weisburg W.G., S.M. Barns, D.A. Pelletier y D.J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173:697-703.
- Xie Zh-W., S. Ge y D-Y Hong. 1999. Preparation of DNA from silica gel dried mini-amount of leaves of *Oryza rufipogon* for RAPD study and total DNA bank construction. *Acta Bot. Sinica* 41:802-807.
- Zinniel D.K., P. Lambrecht, N.B. Harris, Z. Feng, D. Kuczmarski, P. Higley, C.A. Ishimaru, A. Arunakumari, R.G. Barletta y A. Vidaver. 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2198-2208.