

# PRODUCCIÓN *in vitro* DE PLÁNTULA DE PAPA INOCULADA CON *Pseudomonas* sp.

## Production of Potato Seedling *in vitro* Inoculated with *Pseudomonas* sp.

Zuno-Floriano Fabiola G.<sup>1‡</sup>, Estrada-de los Santos P.<sup>2</sup>, Gallegos-Infante José A.<sup>3</sup>, Rocha-Gúzman Nuria E.<sup>3</sup>, Aldana-Madrid María L.<sup>4</sup>, Virgen-Calleros Gil<sup>5</sup>, Miller M. G.<sup>6</sup> y Muñoz-Ruiz Carlos V.<sup>1</sup>

### RESUMEN

Se evaluó la capacidad de una cepa de *Pseudomonas* sp., para asociarse a las raíces e introducirse a plántulas de papa (*Solanum tuberosum* L.) cv. Alpha propagadas mediante cultivo de tejidos. Las plántulas de papa, de 38 días de edad, se inocularon con 100 µL de una suspensión bacteriana con 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> de cultivo. Se observó una biopelícula, alrededor de las raíces, a los siete días de incubación. La concentración inicial de células en el interior de las plántulas fue de 1.53 x 10<sup>7</sup> UFC g<sup>-1</sup> de tejido vegetal. En la quinta semana de incubación, la concentración fue de 1.92 x 10<sup>5</sup> UFC g<sup>-1</sup> de tejido vegetal, semejante a la obtenida en el medio de soporte. Los patrones de digestión del gen *ribosomal 16S* del DNAr demuestran que, con esta forma de inoculación, la cepa de *Pseudomonas* sp. puede establecerse en forma endofítica, garantizando que las plántulas estarán asociadas únicamente a la bacteria de interés. En futuras investigaciones se evaluarán aspectos como promoción de crecimiento y degradación de ciertos agroquímicos.

**Palabras clave:** *Solanum tuberosum* L., bacterias, inoculación, endofítica, biopelícula, asociación.

### SUMMARY

The ability of *Pseudomonas* sp. to associate with and penetrate potato seedling roots cv. Alpha propagated by tissue culture was evaluated. 38-day old potato seedlings were inoculated with 100 µL of a bacterial suspension containing 10<sup>8</sup> CFU mL<sup>-1</sup> of culture medium. A biofilm was observed surrounding the roots after seven days of incubation. The initial concentration of bacterial cells inside root plants was 1.53 X 10<sup>7</sup> CFU g<sup>-1</sup> of plant tissue. In the fifth week of the incubation period the concentration was 1.92 X 10<sup>5</sup> CFU g<sup>-1</sup> of plant tissue, which was similar to that obtained in the support medium. The digestion patterns of the *ribosomal gene 16S* of the DNAr showed that, with this kind of inoculation, *Pseudomonas* sp. can be established in an endophytic way and guarantee that the seedlings will associate only with bacteria of interest. In further investigations, aspects such as promotion of plant growth and degradation of certain agrochemicals will be evaluated.

**Index words:** *Solanum tuberosum* L., bacteria, inoculation, endophytic, biofilm, association.

### INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es la hortaliza de mayor importancia en el mundo, debido a que su tubérculo representa el cuarto alimento básico del mundo, superado sólo por el maíz, el trigo y el arroz, con una producción mayor de 325 mil toneladas aproximadamente hacia el 2008. Para poder obtener semillas libres de enfermedades, se emplea la producción de minitubérculos *in vitro*, metodología que, además, facilita la manipulación de la semilla por su tamaño (Scott *et al.*, 2000).

El género *Pseudomonas* ha sido utilizado para nombrar un amplio grupo de cepas bacterianas Gram-negativas no entéricas, en general aeróbicas, no fermentativas y móviles (Scarpellini *et al.*, 2004). Los miembros del género *Pseudomonas* son

<sup>1</sup> Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Departamento de Biotecnología. 59510 Jiquilpan, México.

<sup>‡</sup> Autor responsable (gaf24@hotmail.com).

<sup>2</sup> Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional. 88710 Reynosa, Tamaulipas, México.

<sup>3</sup> Instituto Tecnológico de Durango. 34080 Durango, México.

<sup>4</sup> Universidad de Sonora. 83000 Hermosillo, Sonora, México.

<sup>5</sup> Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. 45100 Zapopan, Jalisco, México.

<sup>6</sup> Universidad de California, Departamento de Toxicología Ambiental. Davis, CA. 95616 USA.

considerados ubicuos, juegan un papel clave en el reciclado de nutrientes y son un importante componente en la comunidad microbiana del suelo (Turnbull *et al.*, 2001). Las cepas de *Pseudomonas* de interés para el hombre se encuentran en alguna de las siguientes categorías: patógenos, biodegradadores o controladores biológicos. Una de las principales características que presenta este género es la facilidad para colonizar las raíces de las plantas (Hansen *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 2000). Los exudados que las plantas liberan por las raíces son ricos en carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos (Davey y O Toole, 2000; Knee *et al.*, 2001), los cuales son utilizados por las bacterias como fuente de alimento (Lugtenberg y Dekkers, 1999).

Cuando se lleva a cabo la colonización de las raíces por microorganismos, se puede dar origen a los siguientes procesos: (i) causar enfermedad cuando se trate de patógenos; (ii) controlar enfermedades por microorganismos que producen metabolitos antimicrobianos; (iii) estimular el desarrollo vegetal (p. ej., promoción del crecimiento de la planta por la producción de hormonas); (iv) biofertilizar (p. ej., los procesos por los cuales los microorganismos incrementan la disponibilidad de nutrientes a la planta, como nitrógeno, fósforo y micronutrientes) y (v) degradar contaminantes químicos peligrosos para el hombre (Rainey, 1999). El proceso de colonización de las plantas se da mediante la formación de agregados, microcolonias o biopelículas.

En la primera fase de la formación de la biopelícula, la bacteria se desplaza por medio de flagelos polares y subsecuentemente se adhiere a un sustrato. En tanto se fija la bacteria, se divide y diferencia, dando origen a las formas tridimensionales características de una biopelícula madura (aglomerados) (Fujishige *et al.*, 2006). Las bacterias se encuentran alrededor de una matriz compuesta de polisacáridos, en especial exopolisacáridos, proteínas y DNA (Fujishige *et al.*, 2006). Una vez que las bacterias colonizan las raíces, pueden penetrar el tejido vegetal; en algunos casos, debido a la producción de enzimas celulíticas y pectinolíticas, mismas que contribuyen a la degradación de las paredes celulares. La penetración también puede realizarse a través de las fisuras que se forman durante la emisión de las raíces secundarias, o a través de las heridas que se producen cuando la raíz se va desarrollando (Lodewyckx *et al.*, 2002; Germaine *et al.*, 2004). En la actualidad se han desarrollado numerosas técnicas con la intención de inocular bacterias a plantas,

ya sea para aumentar su resistencia contra fitopatógenos o para ser utilizadas en la fitorremediación de suelos contaminados con compuestos químicos, como hidrocarburos, residuos de plaguicidas, entre otros. Algunas de estas técnicas son: inoculación hidropónica (Duffy y Défago, 1977); inoculación a tubérculo por heridas (Schisler *et al.*, 1997); inoculación a semillas (Kim *et al.*, 1997); inoculación a suelo (Dupler y Baker, 1984; Kloepper y Beauchamp, 1992; Raupach *et al.*, 1996; Kenney *et al.*, 1999; Kloepper *et al.*, 1999; Reddy *et al.*, 1999; Ryu *et al.*, 1999; Zehnder *et al.*, 2000); inoculación en suelo y semilla (De Meyer y Höfte, 1997); inoculación a la planta (Leeman *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1995); e inoculación *in vitro* a semilla (Sharma y Nowak, 1998).

En ninguna de las técnicas mencionadas se garantiza la ausencia de microorganismos en el interior de las semillas o de las plantas que puedan interactuar o entrar en un estado de competencia por los nutrientes con el microorganismo a inocular. Sin embargo, si la pretensión es realizar estudios en los cuales se requiera conocer el efecto de un microorganismo, es necesario contar con una técnica de inoculación que garantice la presencia del microorganismo en el interior de las plantas. El objetivo de este estudio ha sido producir plántulas de papa *in vitro* e inocularlas con la cepa de *Pseudomonas* sp., aprovechando su capacidad de asociación con las raíces de las plántulas y su introducción al tejido vegetal.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para el manejo de plántulas libres de microorganismos endófitos, las de papa cv. Alpha fueron propagadas por la técnica de cultivo de tejidos (Wilson *et al.*, 2001), utilizando como medio de soporte Murashige y Skoog. Se tomó parte de la reserva de plántulas de papa del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR-IPN- Michoacán, México). En condiciones de esterilidad, se eliminó el follaje de las plántulas y se cortaron segmentos de dos nódulos, los cuales se colocaron en frascos (175 mL), conteniendo 15 mL del medio MS (siguiendo la polaridad de la plántula). Posteriormente, éstas se expusieron a un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad a temperaturas de 19 y 16 °C, respectivamente, durante un periodo de 30 días, con la finalidad de obtener suficientes plántulas para llevar a cabo su inoculación.

La cepa de *Pseudomonas* sp. se obtuvo de la rizósfera de plántulas de papa de un cultivo comercial establecido en el valle de Zamora, Michoacán. El aislamiento de la bacteria se realizó impregnando una esponja estéril con suelo de la rizósfera, y descargando a manera de impronta sobre medio Agar Papa Dextrosa. El cultivo bacteriano se incubó a 30 °C durante 24 h. La cepa de *Pseudomonas* sp. se transfirió a medio B de King, para posteriormente conservarla mediante liofilización.

Se determinó la cinética de crecimiento de la cepa de *Pseudomonas* sp. durante un periodo de 27 h. Para ello, se inoculó la cepa bacteriana en 25 mL de medio de infusión de papa y se incubó a 22 °C durante 24 h en agitación horizontal. Posteriormente, 1 mL de la suspensión anterior, con una concentración de  $6.3 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>, se transfirió a 25 mL de medio PDI incubado en las condiciones mencionadas. Cada hora, durante un periodo de 27 h, se monitoreó la absorbancia a una longitud de onda de 535 nm, utilizando un espectrofotómetro. Asimismo, se cuantificaron las unidades formadoras de colonias por mililitro de medio de cultivo (UFC mL<sup>-1</sup>). La suspensión bacteriana para la inoculación se preparó a una concentración de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> aproximadamente.

Se inocularon 25 plántulas de papa de 38 días de edad, propagadas mediante cultivo de tejidos. Las plántulas contenidas en frascos con el medio MS se inocularon con 100 µL de la suspensión bacteriana; el resultado se depositó sobre el medio MS. Las plántulas se colocaron a un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad, con temperaturas de 19 y 16 °C, respectivamente, y se revisaron cada día hasta que se observó la aparición de una biopelícula en la periferia de la radícula. Posteriormente, se aislaron las bacterias del interior de cinco plántulas cada semana durante un periodo de 35 días.

Las plántulas se sumergieron durante un minuto en recipientes estériles que contenían una solución de alcohol etílico al 10%. Consecutivamente, se colocaron por 5 min en una solución de hipoclorito de sodio al 3% y, finalmente, se retiraron los residuos de hipoclorito de sodio enjuagando abundantemente con agua destilada estéril. El exceso de agua se eliminó utilizando toallas desechables estériles. De acuerdo con el peso de las plántulas, se llevó a cabo una dilución  $10^1$  en agua peptonada al 1% y se maceraron. Se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^3$  y  $10^4$ , las cuales se inocularon en medio PDA. Los aislados bacterianos

obtenidos se transfirieron al medio KB para su consecutivo análisis. Los datos de la densidad poblacional de *Pseudomonas* sp. en el interior de las plántulas y en el medio MS se analizaron con el programa Statistical Analysis System (SAS Institute, 1990). Se realizó una prueba de comparación de medias mediante la prueba de Tukey con una probabilidad del 5%.

El DNA total de las cepas de *Pseudomonas* sp. se obtuvo utilizando un equipo comercial de purificación Wizard Genomic DNA. El gen *ribosomal 16S* DNAr se amplificó con los iniciadores 27f y 1495r (Grifoni *et al.*, 1995), utilizando la enzima GoTaq DNA polymerase (Promega). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un termociclador Mastercycler gradient, siguiendo las indicaciones descritas por el fabricante. Las condiciones de la amplificación consistieron en un ciclo inicial de desnaturalización (95 °C, 5 min), 35 ciclos de amplificación (95 °C, 1 min; 60 °C, 1 min; 72 °C, 1 min 30 s) y, finalmente, un ciclo de elongación (72 °C, 10 min). El fragmento del gen *ribosomal 16S* amplificado (ca. 1.5 kb) fue digerido con 5 U de las enzimas de restricción *AluI*, *HaeIII* y *HhaI*. El perfil de restricción se determinó y comparó entre las distintas cepas bacterianas mediante electroforesis en geles de agarosa al 3%. El fragmento amplificado del gen *16S* DNAr se clonó en el vector PCR2.1, utilizando un equipo comercial TA cloning kit. La secuencia del gen *16S* DNAr se obtuvo en un secuenciador de Applied Biosystems Mod. 3730, usando los iniciadores universales M13 presentes en el vector. La secuencia se comparó en la base de datos EMBL/GenBank, y las secuencias relacionadas se alinearon, utilizando el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). La topología del árbol se infirió con el método de neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987), utilizando el modelo de Jukes y Cantor (1969), presente en el programa MEGA, versión 4 (Kumar *et al.*, 2001).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Inoculación de Plántulas con la Cepa de *Pseudomonas* sp.

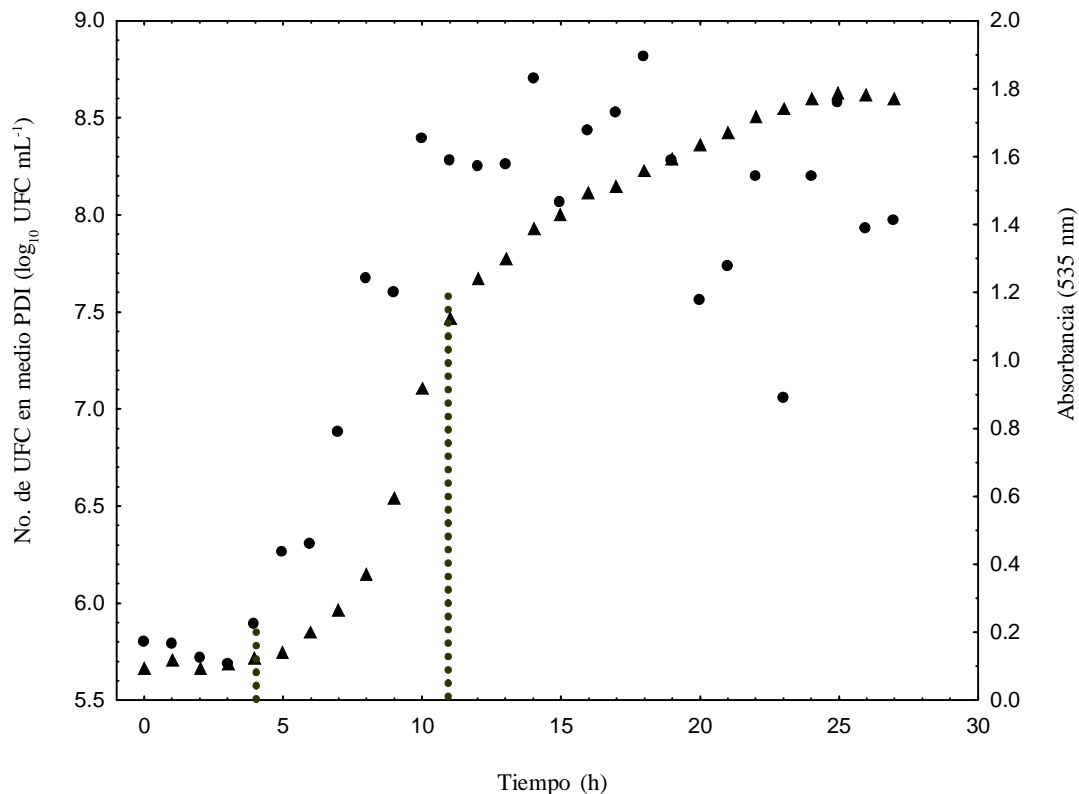
De acuerdo con los datos de la absorbancia ( $A_{535}$ ) y la concentración de células expresada en Log<sub>10</sub> UFC mL<sup>-1</sup> de cultivo, obtenidos en la cinética de crecimiento para la cepa de *Pseudomonas* sp. en medio PDI (Figura 1), el tiempo de duplicación de la bacteria fue de 47.93 min (Figura 2). Comparando el tiempo

de duplicación de la cepa de *Pseudomonas* sp. con el de otras cepas correspondientes al mismo género, se tiene, por ejemplo, que la cepa de *Pseudomonas fluorescens* presentó un tiempo de duplicación de 2 h, de acuerdo con el estudio realizado por Caldwell y Lawrence (1986).

Con un valor de absorbancia ( $A_{535}$ ) cercano a 0.3 a las 8 h posteriores a la inoculación del medio con la bacteria, se tuvo una concentración promedio de células de  $10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  de cultivo: concentración de células recomendada para llevar a cabo la inoculación de las plántulas de papa, de acuerdo con lo establecido por Germaine *et al.* (2004). En un periodo de siete días después de la inoculación de las plántulas con la suspensión bacteriana de *Pseudomonas* sp., se observó la asociación raíz-bacteria dada por la formación de la biopelícula alrededor de las raíces (Figura 3).

Rainey (1999) reportó que la asociación de la raíz de la caña de azúcar con diferentes cepas de *Pseudomonas* ocurrió a los 14 días de la inoculación.

En la investigación realizada por Turnbull *et al.* (2001), la colonización de las raíces de plantas de trigo también llevó más tiempo (nueve días). De acuerdo con estas investigaciones, el tiempo que tarda el microorganismo para asociarse a las raíces depende de varios factores; uno de los principales, es la afinidad que éste presenta con respecto a la composición de los exudados liberados por la planta (Hansen *et al.*, 1997). Estos exudados, según Rainey (1999), están compuestos de lipopolisacáridos, celulosa, tiamina, aminoácidos, biotina e isoflavonoides, los cuales sirven como nutrientes para las bacterias que se asocian. En el caso de las cepas de *Pseudomonas*, se ha comprobado que su asociación con la raíz de solanáceas (como el tomate), se da principalmente por la utilización de los ácidos orgánicos, los cuales les sirven como base nutricional (Lugtenberg y Dekkers, 1999; Normander y Prosser, 2000; Bloemberg y Lugtenberg, 2001; Berg *et al.*, 2005).



**Figura 1.** Cinética de crecimiento de *Pseudomonas* sp. en medio PDI a 30 °C. Datos de los valores de absorbancia (D). Datos de concentración de células en  $\text{Log}_{10}$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  de cultivo (•). Los puntos representan la media de los valores obtenidos en los experimentos realizados por triplicado. Las líneas punteadas indican la fase exponencial.

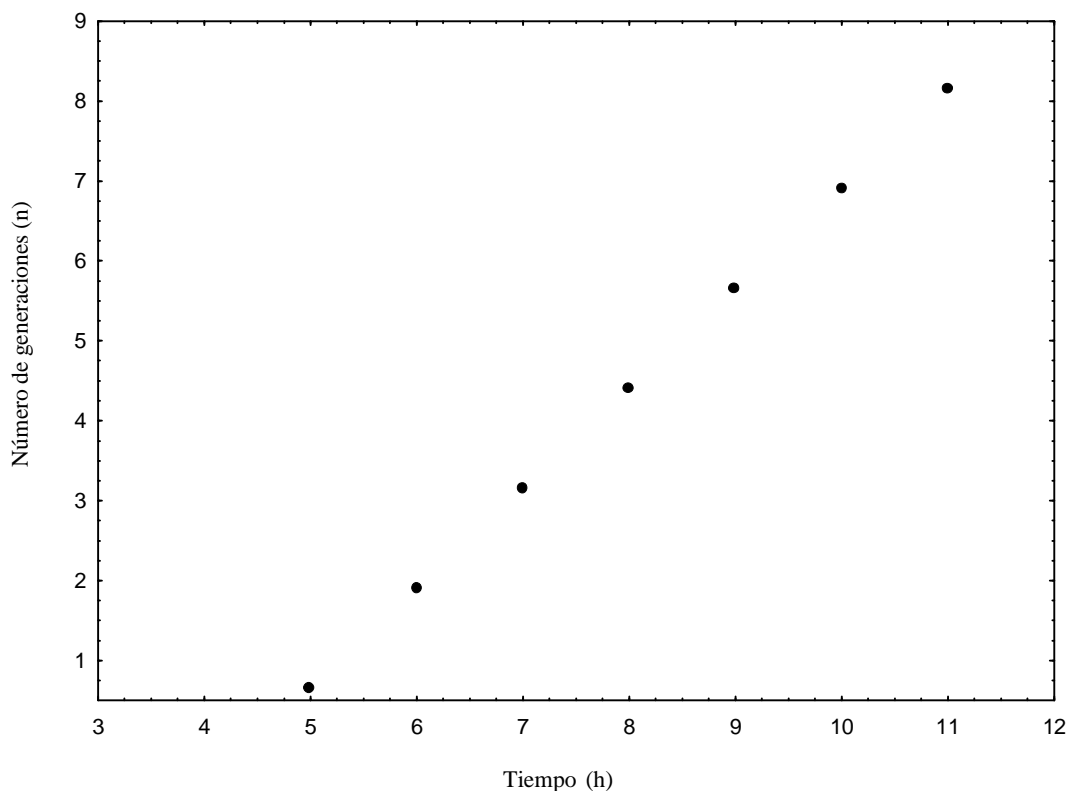


Figura 2. Número de generaciones obtenidas de la cinética de crecimiento de *Pseudomonas* sp. en medio PDI a 30 °C. Datos del número de generaciones (\*). Los puntos representan la media de los valores obtenidos en los experimentos realizados por triplicado.

### Reaislamiento de *Pseudomonas* sp. de Plántulas de Papa cv. Alpha

La densidad poblacional promedio de *Pseudomonas* sp. en el interior de las plántulas de papa, luego de observada la asociación raíz-bacteria (siete días), fue de 64 UFC g<sup>-1</sup> de tejido vegetal (Figura 4). Después de dos semanas de incubación, este valor aumentó, alcanzando concentraciones promedio de 1.53 x 10<sup>7</sup> UFC g<sup>-1</sup> de tejido vegetal. De acuerdo con el análisis estadístico realizado, fue la concentración más alta que se alcanzó durante el periodo de incubación. Para las siguientes semanas disminuyó manteniéndose constante con una concentración promedio de 1.92 x 10<sup>5</sup> UFC g<sup>-1</sup> de tejido vegetal. El crecimiento de la bacteria en medio MS, durante las cuatro primeras semanas, se mantuvo constante, siendo que se había partido de una concentración promedio de 17 UFC g<sup>-1</sup> de medio MS en la primera semana y para la cuarta se llegó a 4.48 x 10<sup>5</sup> UFC g<sup>-1</sup> de medio MS. Al final de la investigación, la densidad poblacional promedio de *Pseudomonas* sp. en la plántula y en medio MS presentó

valores cercanos a 10<sup>5</sup> UFC g<sup>-1</sup> de muestra. El comportamiento de la densidad poblacional de la cepa *Pseudomonas* sp. utilizada en el presente trabajo, fue semejante al observado por Ramos *et al.* (2000) cuando trabajaron con *Pseudomonas putida* en la colonización de raíces de cebada. En condiciones estériles, *P. putida* presentó altas velocidades de crecimiento durante un día, posterior a la colonización, pero el potencial de las velocidades de crecimiento disminuyó al trabajar en condiciones no estériles. Los resultados obtenidos demuestran que, con esta forma de inoculación, se consiguen altas densidades poblacionales en el interior de los tejidos (10<sup>7</sup> UFC g<sup>-1</sup> de tejido vegetal) del microorganismo inoculado.

En este estudio, hacia la cuarta semana, se tuvo una densidad promedio de 1.92 x 10<sup>5</sup> UFC g<sup>-1</sup> de tejido vegetal (Figura 4), cifras semejantes a las obtenidas por Sturz y Nowak (2000), quienes encontraron una densidad poblacional de 10<sup>2</sup> a 10<sup>7</sup> UFC g<sup>-1</sup> de tejido vegetal. Al trabajar con cepas de *Pseudomonas*, Germaine *et al.* (2004) reportaron una densidad bacteriana en plantas de álamo de 10<sup>3</sup> a 10<sup>4</sup> UFC g<sup>-1</sup> de tejido vegetal. Adachi

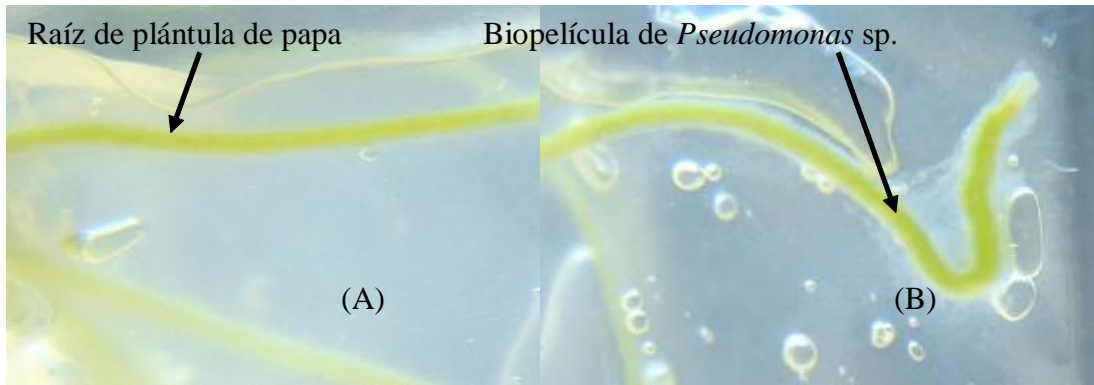


Figura 3. (A) Raíces de plántula de papa sin inocular. (B) Crecimiento de la bacteria *Pseudomonas* sp. alrededor de las raíces de plántulas de papa cv. Alpha.

*et al.* (2002) encontraron una densidad poblacional de  $10^2$  a  $10^4$  UFC  $g^{-1}$  de tejido vegetal en camote. Garbeva *et al.* (2001) reportaron una concentración de bacterias endófitas en plantas de papa de  $10^3$  a  $10^5$  UFC  $g^{-1}$  de tejido vegetal. Recuenco y Van Vuurde (2000) encontraron valores de  $10^3$  a  $10^7$  UFC  $g^{-1}$  de tejido vegetal en el cultivo de pera. En la comparación entre los resultados obtenidos y los reportados por otros investigadores (Garbeva *et al.*, 2001; Adachi *et al.*, 2002;

Germaine *et al.*, 2004), con el tiempo requerido para la colonización y la densidad poblacional endofítica, varía de acuerdo con el tipo de microorganismo y al tipo de planta a la cual sea asociado.

Para corroborar que la cepa inoculada y la aislada de las plántulas de papa era la misma, se hicieron dos pruebas: la primera consistió en observar las características de las colonias sobre medio KB. Se obtuvieron colonias cremosas, redondas y con emisión

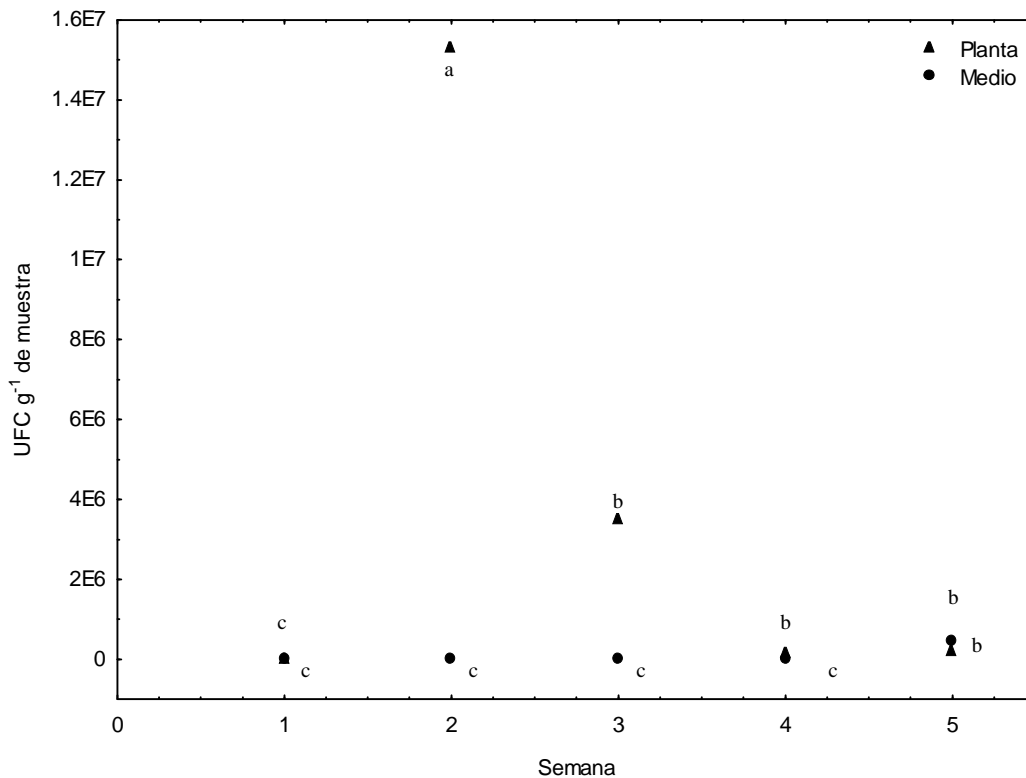


Figura 4. Comportamiento del crecimiento de *Pseudomonas* sp. en el interior de plántulas de papa cv. Alpha y en medio. Los puntos son el promedio de dos experimentos realizados con cinco repeticiones.

de fluorescencia ante luz UV (Figura 5). La segunda prueba consistió en comparar los patrones de la digestión del gen *ribosomal 16S* del DNAr, de la cepa inoculada y la extraída.

### Análisis de la Restricción del *16S* DNAr Amplificado (ARDRA)

El gen *ribosomal 16S* DNAr amplificado de seis aislados, correspondientes a dos aislados de la cepa de *Pseudomonas* inoculada, y cuatro aislados recobrados al término del periodo de incubación de las plántulas inoculadas, se digirieron individualmente con tres enzimas de restricción de corte frecuente. Los resultados mostraron que tanto los cuatro aislados recobrados de las plántulas de papa, como la cepa inoculada, presentaban el mismo perfil ARDRA con las distintas enzimas de restricción (Figura 6), lo cual sugiere que las cepas recuperadas de las plántulas de papa correspondían a la cepa inoculada. La metodología de ARDRA se ha utilizado anteriormente para diferenciar cepas de *Rhizobium* (Laguerre *et al.*, 1994) y *Burkholderia* (Estrada-de los Santos *et al.*, 2001). No obstante, dada la gran similitud que puede llegar a existir entre las copias del gen *16S* DNAr de especies correspondientes a un mismo género (Fox *et al.*, 1992; Martínez-Murcia *et al.*, 1992), las cepas inoculadas y extraídas se analizaron con mayor grado de exhaustividad mediante la metodología de rep-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic PCR) (Louws *et al.*, 1994). El análisis de los resultados mostró que ambas cepas corresponden al mismo linaje bacteriano, confirmando que la cepa recuperada en los ensayos de



Figura 5. Crecimiento de *Pseudomonas* sp. sobre medio B de King (KB).

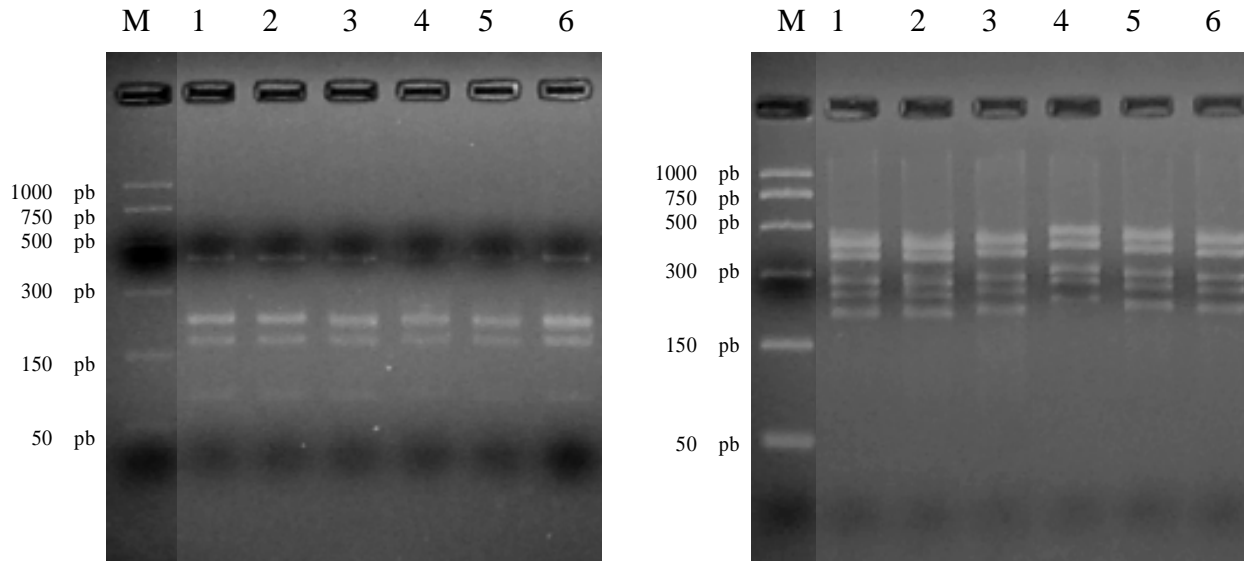
inoculación, realmente correspondía a la cepa que se inoculó a las plántulas de papa.

### Análisis Filogenético del Gen *16S* DNAr

Para conocer la identidad del aislado bacteriano utilizado en este trabajo, la secuencia del gen *16S* DNAr se obtuvo y comparó en la base de datos del GenBank. El resultado mostró que la cepa inoculada poseía 97% de similitud con la cepa Nj-55 de *Pseudomonas* sp. (AM409368) y con una clona bacteriana no cultivada (AY958838). El análisis filogenético de las secuencias del gen *16S* DNAr de la cepa inoculada y de la mayoría de las especies del género *Pseudomonas* descritas oficialmente, determinó que la cepa inoculada se localizó en el grupo de *P. fluorescens* (Anzai *et al.*, 2000), pero sin corresponder a ninguna de las especies ya descritas en este género bacteriano. Un análisis filogenético enfocado a las especies contenidas en el grupo de *P. fluorescens* (Figura 7), mostró que la especie más cercana a la cepa inoculada fue *P. brenneri* con 96% similitud (Baida *et al.*, 2001).

Con respecto a los resultados del análisis de la secuencia del gen *16S* DNAr, la cepa utilizada en los experimentos se identificó como perteneciente al género *Pseudomonas*. Se ha sugerido que un porcentaje mayor al 97% de similitud entre secuencias del gen *16S* DNAr corresponde a cepas que comparten una identidad genómica igual a o mayor de 70%, clasificándolas como la misma especie bacteriana (Stackebrandt y Goebel, 1994). No obstante, en la actualidad se requiere de un análisis taxonómico de carácter polifásico, para proponer una nueva especie bacteriana (Stackebrandt *et al.*, 2002). Dado que el porcentaje de similitud entre *Pseudomonas* sp. y la especie más cercana (y descrita válidamente) es del 96%, se sugiere que podría tratarse de una nueva especie de *Pseudomonas*. Sin embargo, un estudio taxonómico polifásico de un número importante de aislados, así como especies ya descritas del género *Pseudomonas*, deberá ser realizado para proponer a la cepa de *Pseudomonas* utilizada como una nueva especie de este género bacteriano.

Del análisis de los resultados obtenidos sobre la densidad de la población bacteriana en las plántulas de papa y el análisis de la secuencia del gen *16S* DNAr de los aislados de la cepa inoculada y extraída, puede decirse que, una vez que *Pseudomonas* sp. se asoció a las raíces de las plántulas, penetró y colonizó el interior de los tejidos, estableciéndose en forma endofítica.



**Figura 6.** Patrones de análisis de la restricción del *16S* DNAR ampliado (ARDRA) de aislados de *Pseudomonas* sp. M: Marcador (1 kb). Cepas inoculadas (3 y 4), cepas aisladas de plántulas de papa cv. Alpha (1, 2, 5 y 6).

A diferencia de las técnicas de inoculación tradicionales: inoculación hidropónica, inoculación en semilla, planta, raíces, suelo y combinaciones de ellas, en las cuales, en ocasiones, es utilizado suelo con tratamiento térmico para disminuir la cantidad de microorganismos presentes, aún se tiene el problema de la presencia de microorganismos pertenecientes a la comunidad endofítica autóctona de las semillas y las plantas, los cuales podrían impedir la colonización de los tejidos de la planta con el microorganismo inoculado. Al utilizar las técnicas de inoculación mencionadas, si se desea medir la población endofítica de la cepa inoculada, es necesaria la utilización de herramientas como microscopía de fluorescencia o el uso de cepas resistentes a antibióticos (rifampicina) (Hallmann *et al.*, 2001; Germaine *et al.*, 2004). De esta manera, se podría descartar el crecimiento de los microorganismos distintos al estudiado. Con la forma de inoculación utilizada en este trabajo, se requiere menor cantidad de suspensión bacteriana (100  $\mu$ L), con una concentración de células de  $10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  para inocular cinco plantas; logrando la misma efectividad que con la metodología propuesta por Benhamou *et al.* (1996), en donde se utilizan 2 mL de cultivo con la misma concentración celular. En la metodología propuesta por Sturz *et al.*, (1998) para la inoculación de plántulas de papa, se tiene una mayor manipulación de las plántulas, lo cual implica un mayor riesgo de contaminación por microorganismos durante la inoculación. Este método para *Pseudomonas* sp. a plántulas de papa se utilizó para evaluar el efecto

de la cepa con respecto a la degradación de los plaguicidas más utilizados en el cultivo. De esta forma, se garantizó que el único efecto observado sobre la degradación del agroquímico, dado por el metabolismo microbiano, fuera del microorganismo inoculado. Esta metodología, que permite introducir bacterias de interés antropológico para la producción de minitubérculo, no implica más que la adición del inóculo bacteriano en el transcurso del desarrollo de la plántula *in vitro*. Este mecanismo de producción de minitubérculo, además de ser innovador, práctico y de aplicación inmediata, ofrece una alternativa a la creciente demanda de productos agrícolas con bajos niveles de plaguicidas, ya que pueden ser introducidos a las plántulas microorganismos degradadores de agroquímicos, los cuales promuevan el crecimiento, o incluso microorganismos antagónicos que reaccionen en contra de algunos fitopatógenos.

## CONCLUSIONES

- Se produjo *in vitro* plántula de papa inoculada con la cepa de *Pseudomonas* sp. La cepa de *Pseudomonas* sp. formó una biopelícula alrededor de las raíces de plántula de papa a los siete días posteriores a la inoculación y, a su vez, logró establecerse en forma endofítica en las plántulas, alcanzando una densidad poblacional de  $1.92 \times 10^5$  UFC  $\text{g}^{-1}$  de tejido vegetal en la quinta semana de incubación.
- De acuerdo con el análisis filogenético del Gen *16S* DNAr, la cepa utilizada en este trabajo quedó localizada



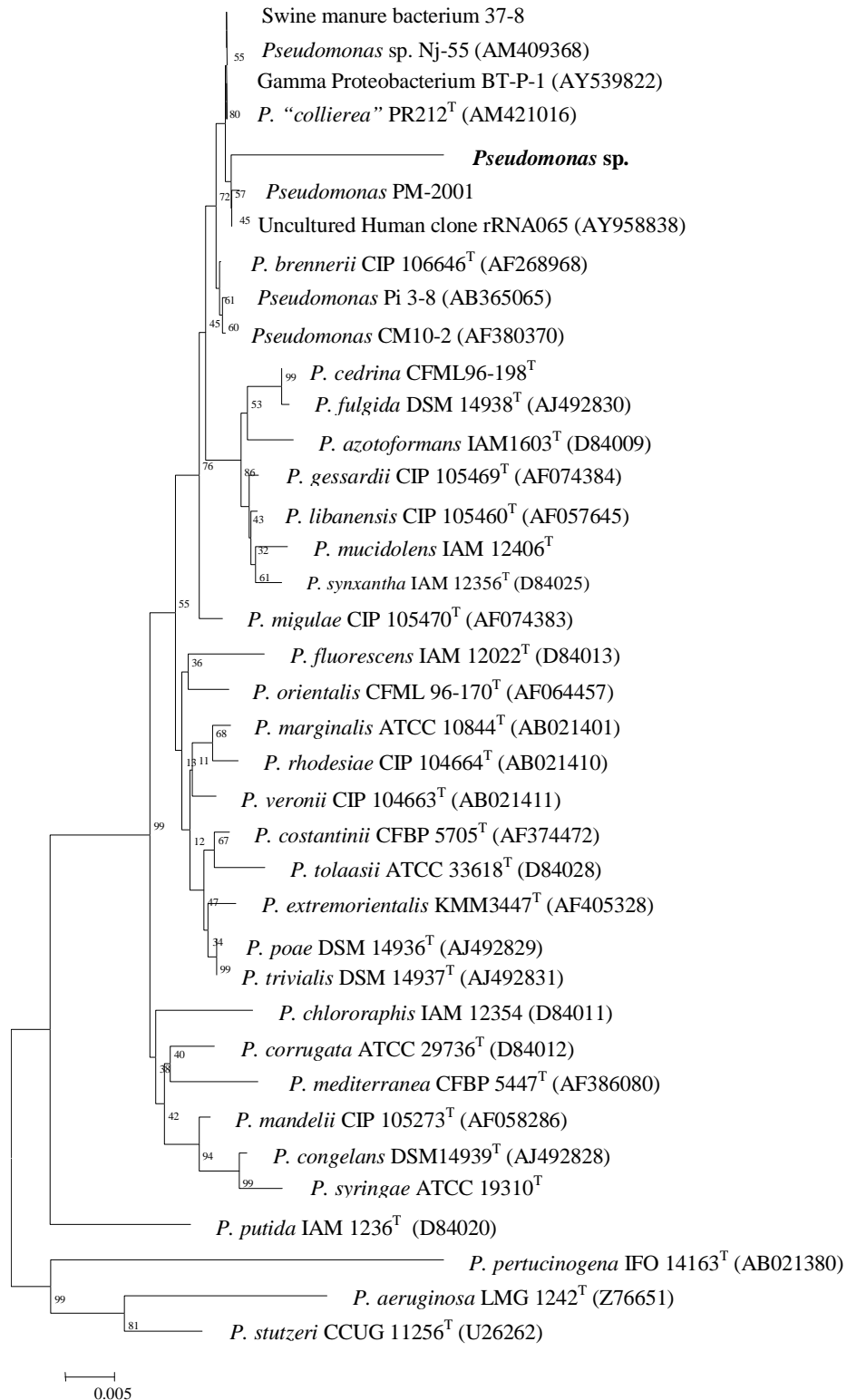


Figura 7. Árbol filogenético basado en el análisis del gen *16S* DNAr de especies del género *Pseudomonas*. En negritas se muestra al aislado analizado en este trabajo. La barra representa cinco sustituciones de nucleótidos por 1000 nucleótidos. La robustez del árbol se determinó utilizando 1000 réplicas de bootstrap, y el número de acceso al GenBank de cada una de las cepas se muestra entre paréntesis.

en el grupo de *Pseudomonas*, pero sin corresponder a algunas de las especies ya descritas en este género bacteriano, por lo que pudiera tratarse de una nueva especie.

## AGRADECIMIENTOS

A la Maestra en Ciencias Ma. Antonia Cruz del Laboratorio de Interacción Planta Microorganismo del Centro de Biotecnología Geonómica del IPN, por su colaboración en la caracterización de la fracción del gen *ribosomal 16S* de la cepa de *Pseudomonas* sp.

## LITERATURA CITADA

- Adachi, K., M. Nakatani, and H. Mochida. 2002. Isolation of an endophytic *Diazotroph*, *Klebsiella oxytoca*, from sweet potato stems in Japan. *Lett. Appl. Microbiol.* 48: 889-895.
- Anzai, Y., H. Kim, J. H. Park, H. Wakabayashi, and H. Oyaizu. 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1563-1589.
- Baida, N., A. Yazourh, E. Singer, and D. Izard. 200. *Pseudomonas brenneri* sp. nov., a new species isolated from natural mineral waters. *Res. Microbiol.* 152: 493-502.
- Benhamou, N., J. W. Kloepper, A. Quadt-Hallman, and S. Tuzun. 1996. Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. *Plant Physiol.* 112: 919-929.
- Berg, G., A. Krechel, M. Ditz, R. Sikora, A. Ulrich, and J. Llamán. 2005. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51: 215-229.
- Bloemberg, G. and B. Lugtenberg. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 343-350.
- Caldwell, D. E. and J. R. Lawrence. 1986. Growth kinetics of *Pseudomonas fluorescens* microcolonies within the hydrodynamic boundary layers of surface microenvironments. *Microbial Ecology* 12: 299-312.
- Davey, M. E. and G. A. O'Toole. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 847-867.
- De Meyer, G. and M. Höfte. 1997. Salicylic acid produced by rhizobacterium *Pseudomonas aeuroginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. *Phytopathology* 87: 588-593.
- Duffy, B. K. and G. Défago. 1977. Zinc improves biocontrol of fusarium crown and root rot of tomato by *Pseudomonas fluorescens* and represses the production of pathogen metabolites inhibitory to bacterial antibiotic biosynthesis. *Phytopathology* 87: 1250-1257.
- Dupler, M. and R. Baker. 1984. Survival of *Pseudomonas putida*, a biological control agent, in soil. *Phytopathology* 74: 195-200.
- Estrada-de los Santos, P., R. Bustillos-Cristales, and J. Caballero-Medallo. 2001. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2790-2798.
- Fox, G. E., J. D. Wisotzkey, and P. Jurtschuk. 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 42: 166-170.
- Fujishige, N. A., N. N. Kapadia, and A. M. Hirsch. 2006. A feeling for the micro-organisms: structure on a small scale. *Biofilms on plant roots.* *Bot. J. Linn. Soc.* 150: 79-88.
- Garbeva, P., L. S. van Overbeek, J. W. L. van Vuurde, and J. D. van Elsas. 2001. Analysis of endophytic bacterial communities of potato by planting and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments. *Microbiol. Ecol.* 41: 369-383.
- Germaine, K., E. Keogh, G. García-Cabellos, B. Borremans, D. van der Lelie, T. Barac, L. Oeyen, J. Vangronsveld, F. Porteus Moore, E. R. B. Moore, C. D. Campbell, D. Ryan, and D. N. Dowling. 2004. Colonization of poplar trees by gfp expressing bacterial endophytes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48: 109-118.
- Grifoni, A., M. Bazzicalupo, C. Di Serio, S. Fancelli, and R. Fani. 1995. Identification of *Azospirillum* strains by restriction fragment length polymorphism of the 16S rDNA and of the histidine operon. *FEMS Microbiol. Lett.* 127: 85-91.
- Hallmann, J., A. Quadt-Hallmann, W. G. Miller, R. A. Sikora, and S. E. Lindow. 2001. Endophytic colonization of plants by the biocontrol agent *Rhizobium etli* G12 in relation to *Meloidogyne incognita* infection. *Phytopathology* 91: 415-422.
- Hansen, M., L. Kragelund, O. Nybroe, and J. Sørensen. 1997. Early colonization of barley roots by *Pseudomonas fluorescens* studied by immunofluorescence technique and confocal. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23: 353-360.
- Jukes, T. H. and C. R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules. pp. 21-132. *In:* H. N. Munro (ed.). *Mammalian protein metabolism.* Academic Press. New York, NY, USA.
- Kennedy, D. S., M. S. Reddy, and J. W. Kloepper. 1999. Commercial potential of biological preparations for vegetable transplants. *Phytopathology* 89: S39.
- Kim, D., J. Cook, and D. M. Weller. 1997. *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. *Am. Phytopathol. Soc.* 87: 551-558.
- Kloepper, J. W. and C. J. Beauchamp. 1992. A Review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Can. J. Microbiol.* 38: 1219-1232.
- Kloepper, J. W., R. Rodriguez-Kabana, D. S. Kennedy, M. S. Reddy, N. Martinez-Ochoa, N. Kokalis-Burelle, and K. Arthur. 1999. Development of an integrated biological approach to develop transplants suppressive to various plant diseases. *Phytopathology* 89: S40.
- Knee, E., F. Gong, M. Teplitski, A. Jones, A. Foxworthy, A. Mort, and W. Bauer. 2001. Root mucilage from pea and its utilization by rhizosphere bacteria as a sole carbon source. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14: 775-784.
- Kumar, S., K. Tamura, I. B. Jakobsen, and M. Nei. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software. Arizona University. Tempe, AZ, USA.
- Laguerre, G., M. R. Allard, F. Revoy, and N. Amarger. 1994. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-Amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 56-63.

- Leeman, M., J. A. van Pelt, F. M. den Ouden, M. Heinsbroek, P. A. H. M. Baker, and B. Schippers. 1995. Induction of systemic resistance against fusarium wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* 85: 1021-1027.
- Liu, L., J. W. Kloepper, and S. Tuzun. 1995. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting *Rhizobacteria*: duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. *Phytopathology* 85: 1064-1068.
- Lodewyckx, C., M. Megeay, J. Vangronsveld, J. Clijsters, and D. van der Lelie. 2002. Isolation, characterization and identification of bacteria associated to the zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* subsp. *calaminaria*. *Int. J. Phytorem.* 4: 101-115.
- Louws, F. J., D. W. Fulbright, C. T. Stephens, and F. J. de Bruijn. 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas pathovars* and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2286-2295.
- Lugtenberg, J. and L. Dekkers. 1999. What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? *Environ. Microbiol.* 1: 9-13.
- Martínez-Murcia, A. J., S. Benlloch, and M. D. Collins. 1992. Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 42: 412-421.
- Normander, B. and J. Prosser. 2000. Bacterial origin and community composition in the barley phytosphere as a function of habitat and presowing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4372-4377.
- Rainey, B. 1999. Adaptation of *Pseudomonas fluorescens* to the plant rhizosphere. *Environ. Microbiol.* 1: 243-257.
- Ramos, C., L. Molbak, and S. Molin. 2000. Bacterial activity in the rhizosphere analyzed at the single-cell level by monitoring ribosome contents and synthesis rates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 801-809.
- Raupach, G. S., L. Liu, J. P. Murphy, S. Tuzun, and J. W. Kloepper. 1996. Induced systemic resistance in cucumber and tomato against cucumber mosaic cucumovirus using plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *Plant Dis.* 80: 891-894.
- Recuenco, M. E. and J. W. L. van Vuurde. 2000. Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. *Can. J. Microbiol.* 46: 1036-1041.
- Reddy, M. S., R. Rodriguez-Kabana, D. S. Kenney, C. M. Ryu, S. Zhang, Z. Yan, N. Martinez-Ochoa, and J. W. Kloepper. 1999. Growth promotion and induced systemic resistance (ISR) mediated by a biological preparation. *Phytopathology* 89: S65.
- Ryu, C. M., M. S. Reddy, S. Zhang, J. F. Murphy and J. W. Kloepper. 1999. Plant growth promotion of tomato by a biological preparation (LS213) and evaluation for protection against cucumber mosaic virus. *Phytopathology* 89: S67.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- SAS Institute. 1990. User's guide. Versión 6.12. SAS Institute. Cary, NC, USA.
- Scarpellini, M., L. Franzetti, and A. Galli. 2004. Development of PCR assay to identify *Pseudomonas fluorescens* and its biotype. *FEMS Microbiol. Lett.* 236: 257-260.
- Schisler, D. A., P. J. Slininger, and R. J. Bothast. 1997. Effects of antagonist cell concentration and two-strain mixtures on biological control of fusarium dry rot of potatoes. *Phytopathology* 87: 177-183.
- Scott, G. J., M. W. Rosegrant, and C. Ringler. 2000. Roots and tubers for the 21<sup>st</sup> century. Trends, projections and policy options. *Agriculture and the environment discussion. Paper 31.* International Food Policy Research Institute. Washington, DC, USA.
- Sharma, V. K. and J. Nowak. 1998. Enhancement of verticillium wilt resistance in tomato transplants by *in vitro* co-culture of seedlings with a plant growth promoting rhizobacterium (*Pseudomonas* sp. strain PsJN). *Can. J. Microbiol.* 44: 528-536.
- Stackebrandt, E. and B. M. Goebel. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 44: 846-849.
- Stackebrandt, E., W. Frederiksen, G. M. Garrity, P. A. D. Grimont, P. Kampfner, M. C. J. Maiden, X. Nesme, R. Rossello-Mora, J. Swings, G. Truper, L. Vauterin, A. C. Ward, and W. B. Whitman. 2002. Report of the *ad Hoc* Committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1043-1047.
- Sturz, A. V., B. R. Christie, and B. G. Matheson. 1998. Association of bacteria endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. *Can. J. Microbiol.* 44: 162-167.
- Sturz, A. V. and J. Nowark. 2000. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing association with crops. *Appl. Soil Ecol.* 15: 83-190.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Turnbull, A., J. Morgan, J. Whipps, and J. Saunders. 2001. The role of bacterial motility in the survival and spread of *Pseudomonas fluorescens* in soil and in the attachment and colonisation of wheat roots. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36: 21-31.
- Wilson, P., T. Whitwell, and J. Klaine. 2001. Metalaxyl toxicity, uptake, and distribution in several ornamental plant species. *J. Environ. Qual.* 30: 411-417.
- Zehnder, G. W., C. Yao, J. F. Murphy, E. R. Sikora, and J. W. Kloepper. 2000. Induction of resistance in tomato against cucumber mosaic cucumovirus by plant growth-promoting rhizobacteria. *Bio-Control* 45: 127-137.