



RIZOBACTERIAS NATIVAS EN JAMAICA ANTAGONISTAS A *Phytophthora parasitica* Dastur. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN

NATIVE RHIZOBACTERIA IN ROSELLE ANTAGONISTS TO *Phytophthora parasitica* Dastur. ISOLATION AND CHARACTERIZATION

Magnolia Meléndez-Monroy¹, Sergio Aranda-Ocampo^{1*}, Guillermo Carrillo-Castañeda², Javier Hernández-Morales¹ y Lauro Soto-Rojas¹

¹Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, ²Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. Km. 36.5 Carr. México-Texcoco. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. de México.

*Autor de correspondencia (saranda@colpos.mx)

RESUMEN

Las comunidades microbianas en la rizosfera son importantes en la nutrición y sanidad de las plantas. En esta investigación se estudiaron las poblaciones bacterianas cultivables nativas en la rizosfera de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) var. Tecoanapa en los estados fenológicos de crecimiento inicial, desarrollo de botones florales y floración, en las localidades: Las Ánimas, Saucitos, Pueblo Largo, Santa Rosa y Xalpatláhuac municipio de Tecoanapa, Guerrero, con el objetivo de caracterizar fenotípica y genotípicamente rizobacterias antagonistas *in vitro* a *Phytophthora parasitica*. La densidad de población bacteriana total en la rizosfera fue log 3.50 y 6.56 UFC g⁻¹ de raíz. El estudio comparativo entre sitios mostró que el promedio de UFC g⁻¹ de raíz en la etapa de crecimiento inicial fue estadísticamente mayor ($P > 0.05$) y que el magnesio ($r = 0.93$) y el fósforo en el suelo ($r = 0.81$) tienen una correlación significativa con los valores de UFC. El antagonismo de 450 aislados bacterianos a *P. parasitica* mediante ensayos *in vitro* generó 18 cepas bacterianas eficientes. La caracterización de las bacterias mostró que 100 % de ellas expresaron actividad enzimática lipolítica y proteolítica, 88.9 % produjeron sideróforos, 44.4 % produjeron ácido indol-3-acético, y 72.2 % solubilizaron fosfatos. De las 18 cepas iniciales, seis expresaron las cinco actividades relacionadas con el antagonismo o promoción del crecimiento. Las cepas ($n = 18$) se identificaron genéticamente por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) mediante la amplificación y secuenciación de la región 16S rADN con los iniciadores 27F y 1492R. Los géneros identificados en la rizosfera de jamaica y con actividad antagonista a *P. parasitica* y promotoras del crecimiento vegetal fueron *Serratia*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas* con una homología del 99 %. Este estudio es el primero que se ha publicado sobre las comunidades bacterianas cultivables nativas en la rizosfera de jamaica.

Palabras clave: Antagonistas, *Hibiscus sabdariffa*, *Phytophthora parasitica*, rizobacterias.

SUMMARY

Microbial communities in the rhizosphere are important in nutrition and plant health. In this research, culturable native bacterial populations in the roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) var. Tecoanapa rhizosphere were evaluated in the growth stages of initial growth, bud development and flowering at the locations: Las Ánimas, Saucitos, Pueblo Largo, Santa Rosa and Xalpatláhuac in the Tecoanapa county, Guerrero in southern México. Rhizobacteria antagonistic to *Phytophthora parasitica* was characterized *in vitro* phenotypically and genotypically. The total bacterial population density in the rhizosphere was log

3.50 and 6.56 CFU g⁻¹ root. The comparative study between sites showed that the average root CFU g⁻¹ in the early growth stage was statistically highest ($P > 0.05$), and both magnesium ($r = 0.92$) and phosphorus content in the soil ($r = 0.80$) were significantly correlated with CFU values. According to the *in vitro* evaluation antagonism of 450 bacterial isolates to *P. parasitica*, we selected the 18 most efficient strains. The selected bacteria expressed lipolytic and proteolytic enzyme activity: 88.8 % produced siderophores, 44.4 % produced indole-3-acetic acid, and 72.2 % solubilized phosphates. Out of these 18 isolates, six strains expressed the five activities related with antagonism or growth promoters. Strains ($n = 18$) were genetically identified by polymerase chain reaction (PCR) by amplification and sequencing of the 16S rDNA region with primers 27F and 1492R. The genus identified in roselle rhizosphere with antagonist activity to *P. parasitica* and plant growth promotion were *Serratia*, *Pseudomonas* and *Stenotrophomonas* with a homology of 99 %. This is the first study that has been published on native culturable bacterial communities in the roselle rhizosphere.

Index words: Antagonists, *Hibiscus sabdariffa*, *Phytophthora parasitica*, rhizobacteria.

INTRODUCCIÓN

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es un cultivo cuyo potencial radica en su consumo en forma de bebida obtenida a partir de los cálices de la planta, en sus propiedades fitoquímicas y los usos farmacológicos de interés en la nutrición humana y en la industria (Sáyago-Ayerdi *et al.*, 2007). México se encuentra entre los 10 principales países productores donde el estado de Guerrero constituye la principal zona de cultivo (SIAP-SAGARPA, 2014). En esta zona la enfermedad más importante es causada por el oomyceto *P. parasitica* con incidencias de hasta 40 % con afectación al cultivo en su calidad y rendimiento (Hernández y Romero, 1990).

Actualmente no existen variedades de jamaica resistentes a *P. parasitica*, por lo que su manejo se basa principalmente en el uso de fungicidas los cuales no han sido completamente efectivos, aunado al impacto negativo

Recibido: 19 de Mayo del 2015

Aceptado: 15 de Diciembre del 2015

que implica su uso en el ambiente. Por ello es necesario buscar nuevas estrategias eficientes y sostenibles que se integren al manejo para el control de la enfermedad ocasionada por este oomyceto. El uso de antagonistas microbianos nativos en la rizosfera de las plantas como agentes de biocontrol y promotores de crecimiento vegetal, puede ser una alternativa para reducir el uso de productos químicos en la agricultura. La rizosfera incluye a las raíces de la planta y al suelo que las rodea, y se define como el volumen de suelo que está directamente influenciado por las propiedades físicas, químicas y biológicas de la raíz.

El término "rizobacterias" implica a un grupo de bacterias de la rizosfera que compiten en la colonización del entorno de la raíz y promueven un beneficio para la planta (Prashar *et al.*, 2014). Se ha documentado que los patrones de exudación de un amplio rango de compuestos de carbono exudados por la raíz de las plantas, modifican las propiedades físicas y químicas del suelo que la rodea e influyen la estructura de sus comunidades bacterianas y de la rizosfera (Bais *et al.*, 2006). Las plantas cultivadas han desarrollado una estrategia de estimular y promover la colonización de grupos específicos de microorganismos antagonistas nativos en la rizosfera, como primera línea de defensa contra patógenos del suelo (Latz *et al.*, 2015).

Se ha demostrado que las comunidades bacterianas en la rizosfera de muchas especies de plantas producen un efecto benéfico en el crecimiento y sanidad de las mismas, directa e indirectamente, y que dichas comunidades bacterianas están fuertemente influenciadas en su composición por el suelo, especie y genotipo de la planta (Berg y Smalla, 2009) y clones (Liu *et al.*, 2014). Las comunidades nativas son una fuente de microorganismos útiles para aplicaciones biotecnológicas de formulaciones como agentes de biocontrol o para la síntesis de nuevos compuestos bioactivos de interés en el área médica, veterinaria e industrial (Aranda *et al.*, 2011).

La rizosfera de jamaica puede albergar poblaciones bacterianas cultivables nativas, bien adaptadas, con diversidad metabólica, alto potencial como antagonistas contra *P. parasitica* y promotores del crecimiento de la planta. En la actualidad se carece de conocimiento de las comunidades bacterianas en la rizosfera de este cultivo, por lo que el objetivo de esta investigación se centró en las poblaciones bacterianas cultivables nativas en la rizosfera de jamaica en diferentes localidades del estado de Guerrero con potencial antagonista contra *P. parasitica*, y la caracterización *in vitro* de su actividad antimicrobiana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de bacterias nativas de la rizosfera de jamaica

Muestras de raíz de jamaica var. Tecoanapa se colectaron a una profundidad de 30 cm del suelo durante el ciclo de cultivo 2012, en cinco localidades del municipio de Tecoanapa, Guerrero, México: Las Ánimas (16° 57' 97" N; 099° 19' 37" O), Saucitos (16° 58' 68" N; 099° 18' 52" O), Pueblo Largo (16° 59' 59" N; 099° 15' 15" O), Santa Rosa (16° 57' 60" N; 099° 17' 22" O) y Xalpatláhuac (17° 0' 41.31" N; 99° 20' 04" O). Los estados fenológicos del cultivo en que se tomaron las muestras fueron: 1) crecimiento inicial, 2) desarrollo de botones florales y 3) floración.

Se seleccionaron al azar cinco plantas sanas, cuyas muestras de raíz se tomaron con suelo naturalmente adherido a ellas y se preparó una muestra compuesta mediante la mezcla de raíces y suelo rizosférico por localidad y estado fenológico. Se hizo un análisis físico y químico del suelo rizosférico en el laboratorio de Química de Suelos del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. De cada muestra se utilizaron 2.5 g de raíces y se pusieron en 20 mL de agua destilada estéril que se mantuvieron en agitación y ultrasonido por 10 min.

Las suspensiones obtenidas fueron diluidas en serie desde 10^{-1} hasta 10^{-4} y se sembraron 100 μ L en medio R2A agar (Aranda *et al.*, 2011) e incubadas a 28 ± 1 °C por 48 h con tres repeticiones por dilución. Se cuantificó el número de colonias totales y de éstas se seleccionaron treinta morfotipos diferentes por localidad y estado fenológico, que fueron considerados representativos del total de bacterias cultivables de las que se generó una colección de 450 bacterias. El número de bacterias se expresó como log UFC g^{-1} de raíz, con el que se efectuó el análisis de la varianza (ANOVA) por localidad y por estado fenológico, y la prueba de comparación de medias por el método de Tukey ($\alpha = 0.05$). El análisis estadístico se desarrolló con el programa SAS System para Windows versión 9.0.

Bioensayo de antagonismo *in vitro* contra *P. parasitica*

El efecto inhibitorio de las cepas sobre una cepa virulenta de *P. parasitica* previamente identificada y aislada del cultivo de jamaica en Tecoanapa, Guerrero, se hizo mediante cultivo dual *in vitro* en medio de cultivo Waksmán agar (Berg *et al.*, 2006). En el centro de cada placa con medio de cultivo, se colocó un disco de agar (5 mm

diámetro) con micelio del oomyceto. A 2.5 cm del disco se sembraron en punto cuatro bacterias y de cada una se depositaron 3 µL de suspensión bacteriana con 3.0×10^6 UFC. Las placas sembradas se incubaron a 28 ± 1 °C por 5 a 7 d. Como testigo se establecieron placas inoculadas solo con el oomyceto. Cada cepa bacteriana se evaluó con tres repeticiones, y las que registraron la mayor zona de inhibición promedio (mm) se seleccionaron como las de mayor antagonismo al oomyceto. La zona de inhibición considerada fue un área bien definida entre el margen de avance del crecimiento de micelio y las colonias bacterianas desarrolladas.

Caracterización *in vitro* en la producción de metabolitos

Las 18 cepas que mostraron el mayor antagonismo *in vitro* contra *P. parasitica* se caracterizaron cualitativamente por triplicado para la producción *in vitro* de metabolitos involucrados en la promoción de crecimiento y antagonismo, conforme a los protocolos descritos previamente por Hantsis-Zacharov y Halperin (2007) para la actividad lipolítica y proteolítica, por Schwyn y Neilands (1987) para la producción de sideróforos, por Frey-Klett *et al.* (2005) para ácido indol-3-acético (AIA), y por El-Yazeid *et al.* (2007) para solubilización de fosfato mineral.

Amplificación del gen 16S rADN, secuenciación e identificación de cepas antagonistas

La identificación de las cepas bacterianas se hizo por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) con la secuenciación del gen 16S rADN con ayuda de los iniciadores 27F y 1492R que amplifican un fragmento aproximado de 1500 pares de bases (pb). La extracción de ADN genómico, amplificación y secuenciación se hizo en MacroGen (DNA Sequency Service. Korean Biotechnology Company), y luego fueron alineadas con secuencias depositadas en el GenBank del Centro Nacional de Biotecnología de los Estados Unidos (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Densidad de poblaciones bacterianas cultivables en la rizosfera de jamaica

Los resultados de los valores medios de las bacterias cultivables (BC) en la rizosfera de jamaica mostraron que la población de BC estuvo en intervalos de log 3.50 y 6.56 UFC g⁻¹ de raíz, en las cinco localidades muestreadas. Estos resultados son similares con los citados por Berg *et al.* (2006) quienes estimaron una densidad en intervalos de $\log 7.63 \pm 0.18$ UFC g⁻¹ de raíz en fresa (*Fragaria X ananas-*

sa Duch). Los valores totales de la población bacteriana en UFC g⁻¹ de raíz de jamaica fueron diferentes en las cinco localidades analizadas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Valores promedio de la población bacteriana total registrada en las cinco localidades del municipio de Tecoaapa, Gro. México, y comparación estadística de medias.

Localidad	Población bacteriana en raíz (UFC g ⁻¹)
Las Ánimas	0.656 a
Saucitos	0.629 a
Pueblo Largo	0.525 ab
Santa Rosa	0.407 ab
Xalpatláhuac	0.350 b

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes. DMSH = 0.251 para comparaciones entre localidades (Tukey, 0.05).

El estudio comparativo entre las etapas fenológicas del cultivo mostró que la población de BC en UFC g⁻¹ de raíz en la etapa de crecimiento inicial fue mayor ($P > 0.05$) al promedio registrado en la etapa de desarrollo de botones florales; la variable tuvo sus valores más altos en los sitios Las Ánimas, Saucitos, Santa Rosa y Pueblo Largo, donde hubo mayor densidad de BC en la etapa de crecimiento inicial (Cuadro 2). En contraste, en Xalpatláhuac se presentó la mayor población bacteriana de raíz en la etapa de desarrollo de botones florales (Figura 1).

Las diferencias en densidad poblacional de las bacterias cultivables (BC) pueden ser atribuidas a las características físicas y químicas del suelo entre las localidades estudiadas, y a las características fenotípicas y genéticas (var. Tecoaapa) de la jamaica en los patrones cualitativos y cuantitativos de exudados de la rizosfera a través de las diferentes etapas fenológicas del cultivo. Rumberger *et al.* (2007) también observaron diferencias significativas en

Cuadro 2. Valores promedio de la población bacteriana total registrada en tres estados fenológicos de plantas de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), y comparación estadística de medias.

Estado fenológico	Población bacteriana en raíz (UFC g ⁻¹)
Crecimiento inicial	0.619 a
Floración	0.463 ab
Desarrollo de botones florales	0.458 b

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes. DMSH = 0.159 para comparaciones entre estados fenológicos (Tukey, 0.10).

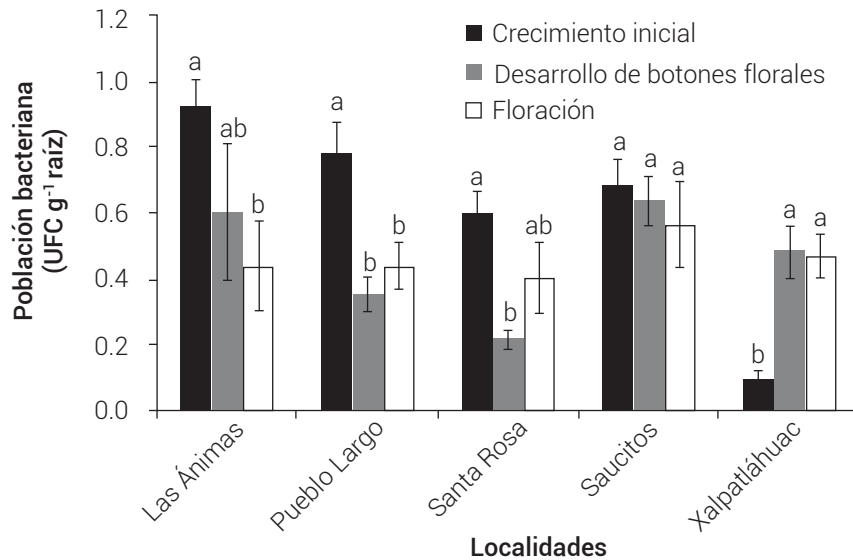


Figura 1. Promedios de poblaciones bacterianas totales registradas en cinco localidades del municipio de Tecoaapa, Gro. México, y su relación con tres estados fenológicos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). Medias con letras iguales en cada localidad no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.10). Las medias solo son comparables dentro de cada localidad.

las poblaciones microbianas de la rizosfera en función del genotipo de manzano (*Malus X domestica* Borkh) y de las características físicas y químicas del suelo. Otras investigaciones han documentado que la composición de los exudados radicales es dependiente del estado fisiológico de la especie de planta y de los microorganismos que interactúan (Marques *et al.*, 2014), y que la densidad de las poblaciones bacterianas varían entre estados fenológicos de las plantas por los cambios que ocurren en los exudados en las raíces, e incluso que la cantidad y calidad de estos exudados también es dependiente del estado fisiológico de la especie de planta (Kang *et al.*, 2010).

Los coeficientes de correlación de Pearson entre las características físicas y químicas del suelo (Cuadro 3) y el número de UFC g⁻¹ de raíz mostraron que Mg ($r = 0.92$) y P ($r = 0.80$) tienen una correlación significativa con los valores de UFC. En Las Ánimas el contenido de Mg y P en el suelo fue más alto que el registrado en Xalpatláhuac, y correlaciona con un incremento en la densidad de bacterias totales en la rizosfera. Estos resultados difieren de otras investigaciones debido a que el pH del suelo es uno de los factores que influencia la densidad y estructura de las comunidades bacterianas de la rizosfera (Hinsinger *et al.*, 2009; Ibekwe *et al.*, 2010); en este estudio se encontró que la cantidad de P y Mg en el suelo afectan significativamente la densidad de bacterias cultivables en la rizosfera de jamaica.

Estudios previos han demostrado la influencia del P sobre la densidad y fluctuaciones de las poblaciones bacterianas en la rizosfera de otras especies de plantas (Marschner *et al.*, 2004). Sin embargo, muy pocos estudios han aportado evidencia sobre el efecto del Mg sobre estas comunidades, por lo que la presente investigación contribuye a demostrar el papel del Mg edáfico en las poblaciones microbianas cultivables en la rizosfera.

Inhibición *in vitro* de *P. parasitica*

De 450 aislamientos bacterianos, 72 inhibieron el crecimiento micelial *in vitro* de *P. parasitica*, y el promedio de inhibición radial (mm) indicó que 18 cepas expresaron el mayor grado de antagonismo. La distribución de estas 18 cepas por sitio fue: 33 % de las Ánimas, 27.7 % de Xalpatláhuac, 22.2 % de Santa Rosa, 11.1 % de Pueblo Largo, y 5.7 % de Saucitos. La producción de metabolitos *in vitro* mostró que las 18 cepas (100 %) expresaron actividad proteolítica y lipolítica; 16 cepas (88.8 %) produjeron sideróforos; 8 cepas (44.4 %) produjeron AIA; y 13 cepas (72.2 %) solubilizaron fosfatos (Cuadro 4).

Identificación de bacterias antagonistas

El alineamiento de las secuencias de las 18 cepas bacterianas en el GenBank mostró que pertenecen a los géneros *Serratia*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*, con una similitud de 99 %. Todas ellas son Gram negativas dentro

Cuadro 3. Características físicas y químicas del suelo con crecimiento de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en cinco localidades del municipio de Tecoaapa, Gro. México.

Características físicas y químicas	Localidad				
	Las Ánimas	Santa Rosa	Pueblo Largo	Saucitos	Xalpatláhuac
Arena (%)	43.64	51.64	7.64	53.64	73.64
Limo (%)	33.28	30.36	21.08	27.08	19.08
Arcilla (%)	23.08	18.00	71.28	19.28	7.28
Textura	Migajón	Migajón arcilloso	Migajón limoso	Migajón arcillo arenoso	Migajón arenoso
pH	5.21	5.38	5.02	4.92	4.80
C.E. (dS m ⁻¹ a 25 °C)	0.19	0.30	0.24	0.4	0.10
M O (%)	1.05	5.74	1.31	2.25	1.55
N (%)	0.13	0.25	0.11	0.11	0.06
Ca (cmol _c kg ⁻¹)	7.36	4.99	1.19	2.14	1.43
Mg (cmol _c kg ⁻¹)	2.14	1.19	1.19	1.90	0.95
K (cmol _c kg ⁻¹)	0.18	0.29	0.12	0.28	0.08
P (mg kg ⁻¹)	28	9	32	64	2

del phylum Proteobacteria, en las familias Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae y Xanthomonadaceae respectivamente. *Serratia* fue el taxón antagonista identificado con mayor proporción entre los sitios de muestreo con 50 % (nueve cepas), seguido de *Pseudomonas* 38.9 % (siete cepas) y *Stenotrophomonas* 11.1 % (dos cepas).

Dentro de *Serratia*, 88.8 % se identificaron como *Serratia marcescens* y 11.2 % como *Serratia* sp. El género *Pseudomonas* mostró 14.3 % identificadas como *Pseudomonas fluorescens* y 85.7 % *Pseudomonas* sp. En el caso de *Stenotrophomonas* las cepas no pudieron ser identificadas a nivel de especie (Cuadro 4). Los resultados mostraron que *Serratia*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas* son las rizobacterias nativas en el cultivo de jamaica con mayor grado de antagonismo *in vitro* contra *P. parasitica*.

El género *Serratia* cada vez despierta más el interés como agente de control biológico, que se encuentra como saprófito en el suelo, agua y en las raíces de plantas. Particularmente, *S. marcescens* se considera con un alto potencial de biocontrol a oomycetos (Roberts *et al.*, 2007), hongos (Someya *et al.*, 2002); bacterias (Czajkowsky *et al.*, 2012) y nematodos fitopatógenos (Almaghrabi *et al.*, 2013). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Queiroz y De Melo (2006), quienes reportaron que *S. marcescens* posee el mayor grado de antagonismo *in vitro* al inhibir el crecimiento micelial de *P. parasitica*; además tiene la capacidad de reducir en 50 % la infección de este patógeno, inducir el

crecimiento de las plantas y suprimir a *P. parasitica* en condiciones de campo en plántulas de cítricos. *S. plymuthica*, es otra especie con potencial para uso en biocontrol (Weise *et al.*, 2014).

Pseudomonas constituye uno de los grupos de bacterias más diverso y significativo del planeta. Son bacterias cosmopolitas en suelos agrícolas y con un alto grado de adaptación en el ambiente rizosférico. Miembros de este género tienen potencial como agentes de biocontrol o como promotor de crecimiento de plantas, y naturalmente intervienen en la supresión contra fitopatógenos de suelos (Selvakumar *et al.*, 2015).

Los resultados de la eficiencia en la inhibición *in vitro* a *P. parasitica* en esta investigación están respaldados con los resultados en otras investigaciones, lo que demuestra la eficiencia en campo de *Pseudomonas* como agente de control biológico contra hongos del suelo (Yasmin *et al.*, 2015), particularmente contra especies de *Phytophthora* (Sang *et al.*, 2008) y bacterias fitopatógenas (Cigna *et al.*, 2015). Diversas cepas de *P. fluorescens* han mostrado especial eficiencia por competencia y antagonismo en el control de fitopatógenos de raíz y alta agresividad para colonizar la rizosfera, y para inducir resistencia sistémica en la planta (Maldonado-González *et al.*, 2015); la prevalencia de ciertas cepas de *P. fluorescens* en la rizosfera de especies de plantas, se ha atribuido a la presencia de carbohidratos de bajo peso molecular y ácidos orgánicos que favorecen

Cuadro 4. Identificación de cepas de la rizosfera de jamaica que expresan el mayor grado de antagonismo *in vitro* contra *P. parasitica*, y caracterización en la producción de los metabolitos evaluados.

Núm. de cepa	Procedencia/ Designación aislado	Base de datos del NCBI	Tpb (% de similitud)	Núm. Acceso NCBI Gen Bank	LIP	PRO	SID	AIA	FOS
1	Las Ánimas / A50	<i>Serratia marcescens</i>	950/956 (99 %)	JX469437	+	+	+	+	+
2	Las Ánimas/ A51	<i>Serratia marcescens</i>	951/957 (99 %)	CP003959	+	+	+	+	+
3	Las Ánimas/ A44	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	944/948 (99 %)	DQ439976	+	+	+	-	+
4	Las Ánimas/ A52	<i>Serratia marcescens</i>	952/961 (99 %)	JN896750	+	+	+	+	+
5	Saucitos/ S40	<i>Pseudomonas</i> sp.	947/955 (99 %)	AM745260	+	+	+	+	-
6	Pueblo Largo/ PL53	<i>Pseudomonas</i> sp.	940/946 (99 %)	AM745260	+	+	+	+	+
7	Santa Rosa/ SR61	<i>Pseudomonas</i> sp.	938/940 (99 %)	AM745260	+	+	+	-	-
8	Santa Rosa/ SR60	<i>Serratia marcescens</i>	973/979 (99 %)	JX469437	+	+	+	+	+
9	Xalpatláhuac/ X12	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	940/946 (99 %)	KC818599	+	+	+	+	-
10	Xalpatláhuac/ X19	<i>Pseudomonas</i> sp.	959/955 (99 %)	AM745260	+	+	+	+	+
11	Las Ánimas/ A49	<i>Serratia</i> sp.	950/954 (99 %)	JF833854	+	+	-	-	-
12	Santa Rosa/ SR59	<i>Serratia marcescens</i>	946/949 (99 %)	CP003959	+	+	+	-	+
13	Xalpatláhuac/ X5	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	941/947 (99 %)	KC818599	+	+	+	-	-
14	Xalpatláhuac/ X6	<i>Pseudomonas</i> sp.	937/941 (99 %)	AM745260	+	+	+	-	+
15	Xalpatláhuac/ X11	<i>Pseudomonas</i> sp.	938/941 (99 %)	AM745260	+	+	+	-	+
16	Santa Rosa/ SR69	<i>Serratia marcescens</i>	942/949 (99 %)	CP003959	+	+	+	-	+
17	Las Ánimas/ A45	<i>Serratia marcescens</i>	951/957 (99 %)	GU906248	+	+	-	-	+
18	Pueblo Largo/ PL 55	<i>Serratia marcescens</i>	949/956 (99 %)	GU906248	+	+	+	-	+

+ = actividad metabólica positiva; - = actividad metabólica negativa; Tpb = tamaño en pares de bases; LIP = actividad lipolítica; PRO = actividad proteolítica; SID = producción de sideróforos; AIA = producción de ácido indol-3-acético; FOS = solubilización de fosfato mineral.

la colonización eficiente de este grupo de bacterias (Kravchenko *et al.*, 2003).

El género *Stenotrophomonas* incluye ocho especies, con predominio de la especie *S. maltophilia* la cual está estrechamente asociada con plantas y es considerada una excelente colonizadora de la rizosfera. Se ha encontrado en la rizosfera de cultivos como papa (*Solanum tuberosum* L.), nabo (*Brassica rapa* L.), arroz (*Oryza sativa* L.), orquídea (*Oncidium cavendishianum* L.), café (*Coffea arabica* L.), vid (*Vitis vinifera* L.) (Berg *et al.*, 2010). *Stenotrophomonas* es motivo de estudios en la interacción benéfica como promotor de crecimiento y en su importancia como una nueva herramienta en la biotecnología y microbiología aplicada en la agricultura, y ha sido citado como efectivo agente de biocontrol de oomycetos (Jin *et al.*, 2011), bacterias (Elhag *et al.*, 2015), y nematodos fitopatógenos (Huang *et al.*, 2009), mediada por una eficiente producción de enzimas quitinolíticas, gluconolíticas, lipolíticas y proteolíticas.

El perfil metabólico del género *Stenotrophomonas* coincide con los resultados en este estudio de las cepas aisladas de la rizosfera de jamaica, ya que todas mostraron actividad proteolítica y lipolítica *in vitro* (Cuadro 4). Pliego *et al.* (2007) encontraron que *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas* fueron los antagonistas más abundantes en las raíces de aguacate (*Persea americana* L.), y con alta eficiencia como agentes de biocontrol a *P. cinammomi*. Por su parte, Kobayashi *et al.* (1995) demostraron que *S. marcescens* y *S. maltophilia* fueron los antagonistas con el mayor grado de supresión del patógeno del suelo *Magnaporthe poae*, con niveles de supresión mayores a 70 y 50 % respectivamente.

Es de resaltar que, en esta investigación, *Stenotrophomonas* fue aislada solamente en la localidad de Xalpatláhuac en plantas de jamaica en la etapa de floración y no en los otros sitios de muestreo a través de diferentes estados fenológicos del cultivo. Es conocido que las características físicas y químicas del suelo, así como los cambios en los

patrones de exudación en las raíces que dependen del estado fisiológico de la especie de planta, tienen efecto en la composición y abundancia relativa de poblaciones bacterianas. Lo anterior puede conducir a una selección específica de poblaciones microbianas en la rizosfera.

En el sitio de Xalpatláhuac existen diferencias principalmente en contenido de P y Mg del suelo con el resto de las localidades, lo cual podría sugerir que también son factores que promuevan una selección específica de ciertas poblaciones bacterianas, lo que permite explicar la presencia de *Stenotrophomonas* únicamente en ese sitio y estado fenológico de la planta. La anterior correlación se ha observado en poblaciones de *Pseudomonas* fluorescentes antagonistas, cuya frecuencia de aislamiento en un genotipo de maíz (*Zea mays* L.) fue significativamente diferente en tres localidades que difieren en características físicas y químicas del suelo y en el estado fenológico de la planta (Picard y Bosco, 2006).

La selección específica y sobrevivencia de *S. maltophilia* en función de la especie de la planta y de los patrones diferenciales de aminoácidos exudados en la raíz, se ha documentado en plantas como judía (*Phaseolus vulgaris* L.), maíz y jitomate (*Solanum lycopersicum* L.), que revela que la metionina favorece el crecimiento de esta bacteria (Elhalag *et al.*, 2015). La interacción específica de las comunidades bacterianas con estos factores resalta la importancia del estudio de cepas nativas en la rizosfera y en regiones productoras de un cultivo en particular, en donde se esperaría obtener cepas con una ventaja de adaptación, colonización y competencia, por encima de otras cepas introducidas y con diferente origen y patosistema, si se pretenden utilizar como agentes de biocontrol o como biofertilizante.

Caracterización *in vitro* en la producción de metabolitos

La caracterización *in vitro* de las 18 cepas bacterianas resultó en la clasificación de seis cepas (33.3 %) (cuatro cepas de *Serratia marcescens* y dos de *Pseudomonas* sp.) que expresaron las cinco actividades evaluadas (Cuadro 4). El éxito en la supresión de patógenos del suelo se ha atribuido a la expresión de características multifuncionales del agente de biocontrol en la interacción planta-rizobacteria-patógeno. En este estudio se identificaron seis cepas de la rizosfera de jamaica que expresaron actividad lipolítica, proteolítica y producción de sideróforos, que intervienen directamente en el antagonismo y competencia, solubilización de fosfatos y producción de AIA, que tienen relevancia en la absorción de nutrientes, promoción del crecimiento e inducción de resistencia sistémica en la planta.

Por lo anterior, estas representan cepas nativas con origen en la rizosfera de jamaica, bien adaptadas al ambiente, multifuncionales metabólicamente y con potencial para su uso como agentes de biocontrol, promotores de crecimiento o inoculantes en el cultivo de jamaica, que deberían ser evaluadas en condiciones de campo para confirmar su potencial. La presente investigación representa la primera información sobre las comunidades bacterianas cultivables nativas asociadas a la rizosfera de jamaica y su potencial antagonista contra *P. parasitica*.

CONCLUSIONES

Se puede inferir que las poblaciones bacterianas presentes en la rizosfera de jamaica varían de acuerdo con la etapa fenológica de la planta y con las características nutricionales del suelo ya que estas poblaciones bacterianas son afectadas por los contenidos de P y Mg del suelo. Se identificaron 18 cepas bacterianas nativas de la rizosfera de jamaica dentro de los géneros *Serratia*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas* que mostraron capacidad para inhibir el desarrollo *in vitro* de *P. parasitica*, y seis de ellas expresaron la producción de múltiples metabolitos involucrados en el antagonismo o promoción del crecimiento de las plantas.

AGRADECIMIENTOS

Al fondo sectorial SAGARPA-CONACYT por el financiamiento otorgado a través del proyecto: "Validación de variedades de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) con alta concentración de bioactivos, alto rendimiento y tolerantes a enfermedades, determinación de plagas y enfermedades e innovación de la maquinaria agrícola para una producción sustentable".

BIBLIOGRAFÍA

- Almaghrabi O. A., S. I. Massoud and T. S. Abdelmoneim (2013) Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode reproduction under greenhouse conditions. *Saudi Journal of Biological Sciences* 20:57-61.
- Aranda O. S., M. Montes-Borrego and B. B. Landa (2011) Purple-pigmented violacein-producing *Duganella* spp. inhabit the rhizosphere of wild and cultivated olives in southern Spain. *Microbial Ecology* 62:446-459.
- Bais H. P., T. L. Weir, L. G. Perry, S. Gilroy and J. M. Vivanco (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* 57:233-266.
- Berg G., K. Opelt, C. Zachow, J. Lottmann, M. Gotz, R. Costa and K. Smalla (2006) The rhizosphere effect on bacteria antagonistic towards the pathogenic fungus *Verticillium* differs depending on plant species and site. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology* 56:250-261.
- Berg G. and K. Smalla (2009) Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology* 68:1-13.
- Berg G., D. Egamberdieva, B. Lugtenberg and M. Hageman (2010) Symbiotic plant-microbe interactions: Stress protection, plant growth

- promotion, and biocontrol by *Stenotrophomonas*. In: Symbioses and Stress. Join Ventures in Biology. J. Seckbach and M. Grube (eds.). Springer Dordrecht Heidelberg London New York. pp: 447-460.
- Cigna J., R. Y. des Essarts, S. Mondy, V. Hélias, A. Beury-Cirou and D. Faure (2015) Draft genome sequences of *Pseudomonas fluorescens* strains PA4C2 and PA3G8 and *Pseudomonas putida* PA14H7, three biocontrol bacteria against *Dickeya* phytopathogens. *Genome Announcements* 3:e01503-14. DOI:10.1128/genomeA.01503-14.
- Czajkowsky R., W. J. de Boer, J. A. van Veen and J. M. Van der Wolf (2012) Characterization of bacterial isolates from rotting potato tuber tissue showing antagonism to *Dickeya* sp. biovar 3 *in vitro* and in planta. *Plant Pathology* 61:169-182.
- Elhalag K. M., H. M. Emara, N. A. S. Messiha, S. A. Elhadad and S. A. Abdalla (2015) The relation of different crop roots exudates to the survival and suppressive effect of *Stenotrophomonas maltophilia* (PD4560), biocontrol agent of bacterial wilt of potato. *Journal of Phytopathology* 163:829-840.
- El-Yazeid A. A., H. A. Abou-Aly, M. A. Mady and S. A. M. Moussa (2007) Enhancing growth, productivity and quality of squash plants using phosphate dissolving microorganisms (Biophos-phor®) combined with boron foliar spray. *Research Journal of Agricultural and Biological Sciences* 3:274-286.
- Frey-Klett P., M. Chavatte, M. L. Clause, S. Courrier, Ch. Le Roux, J. Raijmakers, M. G. Martinotti, J. C. Pierrat and J. Garbaye (2005) Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytologist* 165:317-328.
- Hantsis-Zacharov E. and M. Halperin (2007) Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Applied and Environmental Microbiology* 73:7162-7168.
- Hernández M. J. y S. Romero-Cova (1990) Identificación del agente causal de "La pata prieta" de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), y prueba de fungicidas para su control bajo condiciones de invernadero. *Revista Chapingo* 15:50-54.
- Hinsinger P., A. G. Bengough, D. Vetterlein and I. M. Young (2009) Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and Soil* 321:117-152.
- Huang H., J. Liu, J. Ding, Q. He, R. Xiong and K. Zhang (2009) The investigation of nematocidal activity in *Stenotrophomonas maltophilia* G2 and characterization of a novel virulence serine protease. *Canadian Journal of Microbiology* 55:934-942.
- Ibekwe A. M., J. A. Poss, S. R. Grattan, C. M. Grieve and D. Suarez (2010) Bacterial diversity in cucumber (*Cucumis sativus*) rhizosphere in response to salinity, soil pH, and boron. *Soil Biology & Biochemistry* 42:567-575.
- Jin F., Y. Ding, W. Ding, M. S. Reddy, W. G. D. Fernando and B. Du (2011) Genetic diversity and phylogeny of antagonistic bacteria against *Phytophthora nicotianae* isolated from tobacco rhizosphere. *International Journal of Molecular Sciences* 12:3055-3071.
- Kang S. M., M. Hamayun, G. J. Joom, A. L. Khan, Y. H. Kim, S. K. Kim, H. J. Jeong and I. J. Lee (2010) Effect of *Burkholderia* sp. KCTC 11096BP on some physicochemical attributes of cucumber. *European Journal of Soil Biology* 46:264-268.
- Kobayashi D. Y., M. Guglielmoni and B. C. Bruce (1995) Isolation of the chitinolytic bacteria *Xanthomonas maltophilia* and *Serratia marcescens* as biological control agents for summer patch disease of turfgrass. *Soil Biology and Biochemistry* 27:1479-1487.
- Kravchenko L. V., T. S. Azarova, E. I. Leonova-Erko, A. I. Shaposhnikov, N. M. Makarova and I. A. Tikhonovich (2003) Root exudates of tomato plants and their effect on the growth and antifungal activity of *Pseudomonas* strains. *Microbiology* 72:37-41.
- Latz E., N. Eisenhauer, S. Scheu and A. Jousset (2015) Plant identity drives the expression of biocontrol factors in a rhizosphere bacterium across a plant diversity gradient. *Functional Ecology* DOI:10.1111/1365-2435.12417.
- Liu D., S. Fang and Y. T. Xinjian Dun (2014) Seasonal and clonal variations of microbial biomass and processes in the rhizosphere of poplar plantations. *Applied Soil Ecology* 78:65-72.
- Maldonado-González M. M., E. Schiliró, P. Pilar-Prieto and J. Mercado-Blanco (2015) Endophytic colonization and biocontrol performance of *Pseudomonas fluorescens* PICF7 in olive (*Olea europaea* L.) are determined neither by pyoverdine production nor swimming motility. *Environmental Microbiology* DOI:10.1111/1462-2920.12725.
- Marques J. M., F. Thais, R. da Silva, E. Vullu, F. B. Arie, G. Ch. Ding, L. Seldin and K. Smalla (2014) Plant age and genotype affect the bacterial community composition in the tuber rhizosphere of field-grown sweet potato plants. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology* 88:424-435.
- Marschner P., D. Crowley and H. C. Yang (2004) Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant and Soil* 261:199-208.
- Picard C. and M. Bosco (2006) Heterozygosity drives hybrids to select elite 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* strains among resident soil populations. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology* 58:193-204.
- Pliogo C., F. C. Cazorla, F. M. González-Sánchez, M. A. Pérez-Jiménez, R. M. A. De Vicente and B. Cayo-Ramos (2007) Selection for biocontrol bacteria antagonistic toward *Rosellinia necatrix* by enrichment of competitive avocado root tip colonizers. *Research in Microbiology* 158:463-470.
- Queiroz B. P. V. and I. S. De Melo (2006) Antagonism of *Serratia marcescens* towards *Phytophthora parasitica* and its effects in promoting the growth of citrus. *Brazilian Journal of Microbiology* 37:448-450.
- Prashar P., N. Kapoor and S. Sachdeva (2014) Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 13:63-77.
- Roberts D. P., L. F. McKenna, D. K. Lakshmanb, S. L. F. Meyerc, H. Konga, J. T. de Souza, J. Lydona, C. J. Bakere, J. S. Buyera and S. Chung (2007) Suppression of damping-off of cucumber caused by *Pythium ultimum* with live cells and extracts of *Serratia marcescens* N4-5. *Soil Biology & Biochemistry* 39:2275-2288.
- Rumberger A., I. A. Merwin and J. E. Thies (2007) Microbial community development in the rhizosphere of apple trees at a replant disease site. *Soil Biology & Biochemistry* 39:1645-1654.
- Sang M. K., Ch. Se-Chul and K. Ki-Deok (2008) Biological control of *Phytophthora* blight of pepper by antagonistic rhizobacteria selected from a sequential screening procedure. *Biological Control* 46:424-433.
- Sáyago-Ayerdi S. G., S. Arranz, J. Serrano and G. Isabel (2007) The dietary fiber content and associated antioxidant compounds in roselle flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 55:7886-7890.
- Schwyn B. and J. B. Neilands (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160:47-56.
- Selvakumar G., P. Panneerselvam, G. H. Bindu and A. N. Ganeshamurthy (2015) *Pseudomonas*: Plant growth promotion and beyond. In: *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets*. N. K. Arora (ed.), pp:193-208. DOI 10.1007/978-81-322-2068-8_10.
- SIAP-SAGARPA, (2014) Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado> (Diciembre 2014).
- Someya N., M. Nakajima, T. Hibi, I. Yamaguchi and K. Akutsu (2002) Induced resistance to rice blast by antagonistic bacterium, *Serratia marcescens* strain B2. *Journal of General Plant Pathology* 68:177-182.
- Weise T., A. Thürmer, S. Brady, M. Kai, R. Daniel, G. Gottschalk and B. Piechulla (2014) VOC emission of various *Serratia* species and isolates and genome analysis of *Serratia plymuthica* 4Rx13. *Federation of European Microbiological Societies Microbiological Letters* 352:45-53.
- Yasmin S., F. H. Hafeez and G. Rasul (2015) Evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* Z5 for biocontrol of cotton seedling disease caused by *Fusarium oxysporum*. *Biocontrol Science and Technology* 24:1227-1242.