

# Diversity of endophytic bacteria associated with tomato plants (*Solanum lycopersicum*)

## Diversidad de bacterias endófitas asociadas a plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*)

Rosa M. Longoria-Espinoza\*, <sup>1</sup>Universidad Autónoma de Occidente, Unidad Regional Guasave, Departamento de Ciencias Biológicas, Avenida Universidad s/n, CP 81120. Guasave, Sinaloa, México; Rubén Félix-Gastélum, Universidad Autónoma de Occidente, Unidad Regional Los Mochis, Departamento de Ciencias Biológicas, Bulevard Macario Gaxiola y Carretera Internacional s/n, CP 81223. Los Mochis, Sinaloa; Jesús D. Cordero-Ramírez<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia: rosamarialongoria@hotmail.com.

Recibido: 28 de Febrero, 2020.

Aceptado: 19 de Abril, 2020.

Longoria-Espinoza RM, Félix-Gastélum R and Cordero-Ramírez JD. 2020. Diversity of endophytic bacteria associated with tomato plants (*Solanum lycopersicum*). Mexican Journal of Phytopathology 38(2): 307-319.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2002-7

Primera publicación DOI: 25 de Abril, 2020.

First DOI publication: April 25, 2020.

**Resumen.** En este estudio se propuso como objetivo identificar las bacterias endófitas aisladas de plantas de jitomate y caracterizarlas en función de propiedades promotoras del crecimiento vegetal. Se realizaron recolectas de plantas de jitomate asintomáticas de la variedad Missouri. Los tejidos (raíz, tallo y hojas) fueron esterilizados superficialmente, se maceraron y se establecieron en agar nutritivo. Adicionalmente, se sembraron semillas *in vitro* (THB y SUN6366) y del tejido se realizó el mismo procedimiento. Con los aislados bacterianos obtenidos, se analizaron algunas actividades promotoras de crecimiento vegetal (producción de sideróforos,

**Abstract.** In this study, the objective was to identify the endophytic bacteria isolated from tomato plants and characterize them based on properties that promote plant growth. Collections of asymptomatic tomato plants of the Missouri variety were carried out. The tissues (root, stem and leaves) were superficially sterilized, macerated and seeded in nutrient agar. Additionally, seeds were sown *in vitro* (THB and SUN6366) and the same procedure was performed on the tissue. With the obtained bacterial isolates, some plant growth promoting activities were analyzed (production of siderophores, chitinase and phosphate solubilization). The bacteria obtained were morphologically identified and sequenced. 25 isolates were obtained: 10 *in vitro* (50 plants) and 15 field (20 plants). Seven axenic isolates (one *in vitro* and six field isolates) were molecularly identified as *Methylobacterium radiotolerans*, *Shinella* sp., *Burkholderia cepacia*, *Sphingobium herbicidovorans*, *Pseudomonas* sp., *Achromobacter xylosoxidans* and *Rhizobium radiobacter*. *Methylobacterium* isolated *in vitro*, without

quitinasa y solubilización de fosfato). Las bacterias obtenidas se identificaron morfológicamente y secuenciaron. Se obtuvieron 25 aislados: 10 *in vitro* (50 plantas) y 15 de campo (20 plantas). Siete aislados axénicos (uno *in vitro* y seis de campo) se identificaron molecularmente como *Methylobacterium radiotolerans*, *Shinella* sp., *Burkholderia cepacia*, *Sphingobium herbicidovorans*, *Pseudomonas* sp., *Achromobacter xylooxidans* y *Rhizobium radiobacter*. *Methylobacterium* aislado *in vitro*, sin reportes en plantas de jitomate. Aproximadamente el 86% de los aislados mostraron al menos una actividad benéfica, relacionada con el crecimiento y salud de las plantas. *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Rhizobium* presentaron alta capacidad fosfato-solubilizadora. Estos resultados permiten suponer que las bacterias endófitas en jitomate muestran potencial para ser utilizadas como bioinoculantes en otros cultivos de importancia agrícola.

**Palabras clave:** Endófitos bacterianos, *Methylobacterium*, sideróforos, *Rhizobium*, promotores de crecimiento.

El jitomate (*Solanum lycopersicum*) se encuentra entre las hortalizas de mayor producción en el mundo. México ocupa el décimo lugar en producción y el estado de Sinaloa se ha consolidado como el primer productor de jitomate; representando aproximadamente la tercera parte de la producción nacional, situación que es reconocida a nivel internacional (SAGARPA, 2018). Por lo que, actualmente el manejo de producción se ha centrado en el desarrollo seguro, ecológico, duradero y eficaz; debido a la importancia, muchos investigadores se han enfocado a conocer más respecto a los microorganismos que se encuentran presentes en el torrente del floema de las plantas (Ortiz-Galeana *et al.*, 2018). En la agricultura moderna, las bacterias

reports in tomato plants. Approximately 86% of the isolates showed at least one beneficial activity, related to plant growth and health. *Pseudomonas*, *Burkholderia* and *Rhizobium* presented high phosphate-solubilizing capacity. These results allow us to suppose that the endophytic bacteria in tomato show potential to be used as bioinoculants in other crops of agricultural importance.

**Key words:** Bacterial endophytes, *Methylobacterium*, siderophores, *Rhizobium*, growth promoter.

The tomato (*Solanum lycopersicum*) is one of the most widely grown vegetables in the world. Mexico has the tenth place in production and Sinaloa is the country's main producing state, with approximately one third of all Mexican tomatoes, acknowledged internationally (SAGARPA, 2018). Therefore, current production management has focused on its safe, environmental, long-term and efficient development. Due to their importance, many researchers have focused on learning more about the microorganisms present in the phloem of plants (Ortiz-Galeana *et al.*, 2018). In modern agriculture, growth-promoting bacteria have great potential. Nowadays, the growth of most vegetables requires the production of vigorous seedlings, an important factor for an adequate development of the fruit (Luna-Martínez *et al.*, 2013). Endophytism is the mutualistic association phenomenon between a plant and a microorganism living within its tissues without causing any disease symptoms, as well as being a biological resource that participates in several crucial functions related to growth, development, tolerance and adaptation to stress (Gundel *et al.*, 2012). However, depending on the availability of nutrients and the metabolic state of the host plant, the response of the long-term

promotoras de crecimiento vegetal tienen un gran potencial, actualmente el cultivo de la mayoría de las hortalizas requiere de la producción de plántulas vigorosas, factor importante para un buen desarrollo del fruto (Luna-Martínez *et al.*, 2013). El endofitismo es el fenómeno de asociación mutualista, de una planta con un microorganismo que vive dentro de los tejidos de esta sin causar ningún síntoma de enfermedad; además de ser un recurso biológico participando en diversas funciones indispensables relacionadas con el crecimiento, desarrollo, tolerancia y adaptación al estrés (Gundel *et al.*, 2012). Sin embargo, dependiendo de la disponibilidad de nutrientes y el estado metabólico de la planta huésped la respuesta de asociación a largo plazo de un endófito puede ser mutualista o antagonista (Eaton *et al.*, 2011).

Lo anterior, ha conducido al estudio de mecanismos indirectos por competencia de espacio y nutrientes (consumo de lixiviados-exudados, producción de sideróforos, inducción a la respuesta sistémica en plantas mediante la producción de fitohormonas y patrones moleculares) (Chowdhury *et al.*, 2015). Diversos trabajos han demostrado que las bacterias endofíticas son capaces de interactuar de una manera muy eficiente con sus hospederos, tales como promoción del crecimiento y protección vegetal contra la infección de fitopatógenos. Nawangsih *et al.* (2011), aislaron bacterias endofíticas utilizando tallos de plantas de jitomate asintomáticas reportando seis cepas con efecto antagonista sobre la marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) del jitomate; proponiendo un método de control alternativo para apoyar la agricultura sostenible de esta hortaliza. En la actualidad el interés en la protección al medio ambiente, la implementación de una agricultura sustentable y las diferentes regulaciones internacionales para importar/exportar productos sin agroquímicos demandan mejorar la eficiencia a través del estudio y explotación de los

association of an endophyte may be mutualistic or antagonistic (Eaton *et al.*, 2011).

This has led to the study of indirect mechanisms by competition for space and nutrients (consumption of leachates-exudates, production of siderophores, induction to the systemic response in plants with the production of phytohormones and molecular patterns) (Chowdhury *et al.*, 2015). Several investigations have proven that endophytic bacteria are capable of efficient forms of interaction with their hosts, such as growth promotion and the protection of plants against infections by phytopathogens. Nawangsih *et al.* (2011) isolated endophytic bacteria using asymptomatic tomato plant shoots with six strains, with an antagonistic effect on bacterial wilting (*Ralstonia solanacearum*) of the tomato, thus proposing an alternative control method to support sustainable agriculture of this vegetable. Currently, the interest in environmental protection, the implementation of sustainable agriculture, and different international regulations for the import/export of products without agrochemicals, demand an increase in efficiency by the study and exploitation of the beneficial effects that the endophytic microbiota can provide, and therefore, microorganisms that establish a positive interaction with plants are considered to play an important part in agricultural systems (Sánchez-Bautista *et al.*, 2017). Having stated this, the aim of this investigation was to identify the endophytic bacteria isolated from tomato plants and to characterize them based on the plant growth promoting properties.

In order to carry out the study, tomato plants of the variety Missouri were gathered during the 2017-2018 planting season in plots of the fields of the Gabriel Leyva Solano Ejido, located in the Municipality of Guasave in the state of Sinaloa, Mexico (25° 39' 50 latitude north and 108° 38' 18 longitude west). Asymptomatic plants were chosen

efectos benéficos que puede ejercer la microbiota endófito, por lo que se considera que aquellos microorganismos que establecen una interacción positiva con las plantas desempeñan un papel importante en los sistemas agrícolas (Sánchez-Bautista *et al.*, 2017). Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue identificar las bacterias endófitas aisladas de plantas de jitomate, y caracterizarlas en función de propiedades promotoras del crecimiento vegetal.

Para la realización del estudio se recolectaron plantas de jitomate de la variedad Missouri durante la temporada de siembra 2017-2018 en parcelas del campo agrícola del Ejido Gabriel Leyva Solano localizado en el Municipio de Guasave del estado de Sinaloa, México (25° 39' 50 latitud norte y 108° 38' 18 longitud oeste). Las plantas asintomáticas se eligieron al azar de la superficie sembrada y se trasladaron al laboratorio para su análisis. Por otra parte, basado en la hipótesis de que existe diversidad de endófitos en semillas (Surette *et al.*, 2003) se realizó el establecimiento de plantas de jitomate bajo condiciones *in vitro*. Para ello se utilizaron semillas de dos variedades de jitomate saladette (THB y SUN6366) proporcionadas por una casa comercial. Las semillas se colocaron en papel filtro humedecido con agua estéril y fueron precultivadas tres días bajo condiciones de iluminación natural a 25 °C. Posteriormente se establecieron en medio de sales Murashige y Skoog, sin reguladores de crecimiento y fueron transferidas a una cámara de crecimiento bajo condiciones controladas (22 °C, fotoperiodo de 16 h día<sup>-1</sup> y flujo fotosintético de 225 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

En el caso de los tejidos de raíz, tallo y hojas de plantas recolectadas en campo se lavaron con agua destilada estéril. Para las raíces se retiraron cuidadosamente las partículas adheridas de suelo. Posteriormente, se esterilizaron superficialmente, sumergiendo en etanol al 70% durante 30 segundos, pasado el tiempo se lavaron con solución de

at random from the planted surface, and sent to the laboratory for their analysis. On the other hand, based on the hypothesis that there is a large diversity of endophytes in seeds (Surette *et al.*, 2003), tomato plants were established under *in vitro* conditions. For this, seeds from two saladette tomato varieties (THB and SUN6366) were used, provided by a commercial company. The seeds were placed on filter paper, dampened with sterile distilled water, and they were precultured for three days under natural lighting conditions at 25 °C. Later, they were placed in Murashige and Skoog salt media, without growth regulators, and they were transferred to a growth chamber under controlled conditions (22 °C, photoperiod of 16 h day<sup>-1</sup> and a photosynthetic flow of 225 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

The plant root, shoot and leaf tissues gathered in the field were washed with sterile distilled water. For the roots, the adhered soil particles were carefully removed. They were then superficially sterilized by submersion in ethanol at 70% for 30 seconds and later washed with a sodium hypochlorite solution (2.5%) for 5 min, and ethanol at 70% for 30 s, to finally be washed between five and ten times with sterile distilled water. Next, the plant tissue (foliar, shoot and root) was macerated individually in 20 mL of sterile water, taking 50 µL of a dilution of 10<sup>-4</sup> for each tissue, which were established in nutrient agar in triplicated; for the plants obtained from seeds established *in vitro*, the whole plant was macerated and sown in nutrient agar to obtain and isolate the bacteria.

The Petri dishes were incubated for eight days at 27 °C (Yang *et al.*, 2011). Continuous purification rounds were carried out in the nutrient agar of the bacterial cultures, achieving strains with similar morphological characteristics to perform the culture morphology analysis, which was carried out in a stereoscope of each of the isolations with 48 h growth, where the variables considered were

hipoclorito de sodio (2.5%) durante 5 min, y etanol al 70% durante 30 s, finalmente se lavaron de cinco a 10 veces con agua destilada estéril. Consecutivamente, el tejido vegetal (foliar, tallo y raíz) se maceró de manera individual en 20 mL de agua estéril tomando 50  $\mu$ L de una dilución de  $10^{-4}$  para cada tejido, las cuales fueron establecidas en agar nutritivo por triplicado; para el caso de las plantas obtenidas de las semillas establecidas *in vitro* se maceró la planta completa y se sembraron en agar nutritivo para obtener y aislar las bacterias.

Las cajas Petri se incubaron durante ocho días a 27 °C (Yang *et al.*, 2011). Se realizaron continuas rondas de purificación en medio agar nutritivo de las colonias bacterianas, obteniendo cepas con características morfológicas similares para realizar el análisis de morfología colonial, el cual se llevó a cabo en un estereoscopio de cada uno de los aislados de 48 h de crecimiento; en donde las variables consideradas fueron: tamaño, color, forma, bordes, elevación, superficie, aspecto, luz transmitida, consistencia y luz reflejada. Posteriormente, se realizaron conteos de las unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de peso fresco para cada tejido; la técnica de tinción de Gram se realizó siguiendo el protocolo del kit comercial (Golden Bell).

Para la identificación molecular se partió del ADN genómico de siete cepas bacterianas donde se utilizaron los oligonucleótidos F2C (5'-AGAGTTTGATCATGGCTC-3') y C (5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3') (Shi *et al.*, 1997), para amplificar el gen que codifica la subunidad 16S del ADNr. El producto se purificó con el kit Wizard® SV Gel y PCR Clean-Up System y se envió a secuenciar en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) en CINVESTAV-IPN; la homología de las secuencias obtenidas se comparó dentro de la base de datos del GenBank, utilizando el programa Blast del NCBI y RDP. El análisis filogenético del gen 16S del ADNr, se realizó con el

size, color, shape, edges, elevation, surface, aspect, light emitted, consistence and light reflected. Later, the culture-forming units (CFU) were counted per gram of fresh weight for each tissue; the Gram stain technique was carried out following the protocol on the commercial kit (Golden Bell).

For molecular identification, we began with the genomic DNA from seven bacterial strains oligonucleotides F2C (5'-AGAGTTTGATCATGGCTC-3') and C (5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3') (Shi *et al.*, 1997) to amplify the gene that codifies the subunit 16S of the rDNA. The product was purified using the Wizard® SV Gel kit and PCR Clean-Up System, and it was sent for resequencing to the National Genomics Laboratory for Biodiversity (LANGEBIO) in CINVESTAV-IPN; the homology of the sequences obtained was compared within the GenBank database, using the program Blast of the NCBI and RDP. The phylogenetic analysis of the gene 16S of the rDNA was performed using the software MEGA 5 Beta (Tamura, *et al.*, 2011). The strength of the topology of NJ was evaluated with the bootstrap test, using 1000 replications. The phylogenetic trees were created using the Neighbor-Joining (NJ) method (Saitou and Nei, 1987), as well as the Tamura-Nei model. In order to identify potential plant growth-promoting microorganisms, the capabilities of each bacterial isolation were compared, using the strain (B25) *Bacillus cereus* as a control (Figueroa-López *et al.*, 2016); each one of the experiments was carried out in triplicate. For the analysis of the production of siderophores, we used a chrome azurol S (CAS) medium, prepared by following the method described by Schwyn and Neilands (1987). Chitinase production was evaluated with chitin as the only source of carbon, following the method by Shanmugaiah *et al.* (2008). The evaluation of the solubilization of phosphate was carried out on

software MEGA 5 Beta (Tamura *et al.*, 2011). La solidez de la topología de NJ se evaluó mediante la prueba de bootstrap, usando 1000 réplicas. Los árboles filogenéticos se construyeron con el método de Neighbor-Joining (NJ) (Saitou y Nei, 1987) y el modelo de sustitución de Tamura-Nei. Con la finalidad de identificar potenciales microorganismos promotores de crecimiento vegetal, se compararon de manera cualitativa las capacidades de cada uno de aislados bacterianos utilizando como control positivo la cepa (B25) *Bacillus cereus* (Figueroa-López *et al.*, 2016); y cada uno de los experimentos se realizó por triplicado. Para el análisis de producción de sideróforos se utilizó medio agar de cromo azurol S (CAS), preparado de acuerdo a la metodología descrita por Schwyn y Neilands (1987). La producción de quitinasas se evaluó, con quitina como única fuente de carbono de acuerdo con la metodología de Shanmugaiah *et al.* (2008). La evaluación de capacidad de solubilización de fosfato, se realizó en placas de agar-Pikosvkaya, se incubaron a 25 °C durante una semana (Pikosvkaya, 1948).

A las diez semanas se obtuvieron 50 plantas de jitomate establecidas *in vitro*, con un crecimiento aproximado de 5 cm. Por otra parte, se recolectaron en campo 20 plantas de jitomate en fase de crecimiento vegetativo y asintomático. Se obtuvieron un total de 25 aislados de bacterias: 10 de *in vitro* y 15 de campo (9 raíz, 4 tallo y 2 tejido foliar); obteniendo siete aislados axénicos (Gram negativo); uno de *in vitro* y seis de campo (4 raíz y 2 tejido foliar) (Cuadro 2); con los cuales se realizaron conteos de unidades formadoras de colonia por gramo de peso fresco ( $\log_{10}$  UFC  $g^{-1}$ ) (Cuadro 1). Los resultados coinciden con lo propuesto por Sørensen y Sessitsch, (2007); donde señalan que la rizosfera es una fuente de adquisición de endófitos para las plantas permitiendo que las bacterias rizosféricas penetren los tejidos internos de las plantas por grietas

agar-Pikosvkaya plates, incubated at 25 °C for one week (Pikosvkaya, 1948).

After ten weeks, 50 tomato plants were established *in vitro*, with an approximate growth of 5 cm. On the other hand, 20 asymptomatic tomato plants in a vegetative growth stage were gathered on the field. A total of 25 bacterial isolations were obtained, 10 from *in vitro* and 15 from the field (9 root, 4 shoots, and 2 foliar tissue), obtaining seven axenic isolations (Gram negative), one from *in vitro* and six from the field (4 root and 2 foliar tissue) (Table 2), which were used to count the culture-forming units per gram of fresh weight ( $\log_{10}$  CFU  $g^{-1}$ ) (Table 1). The results coincide with the proposal by Sørensen and Sessitsch, (2007), who point out that the rhizosphere is a source of endophytes for plants, helping the rhizospheric bacteria penetrate the internal tissues of plants via cracks in the roots and lesions in tissues that take place as a result of plant growth.

**Cuadro 1. Recuento de bacterias aisladas de plantas de jitomate recolectadas en campo de la variedad Missouri durante la temporada de siembra 2017-2018, en parcelas del campo agrícola del Ejido Gabriel Leyva Solano localizado en el Municipio de Guasave, Sinaloa, México.**

**Table 1. Count of bacteria isolated from tomato plants gathered on the field of the variety Missouri during planting season 2017-2018, from plots of the field in the Gabriel Leyva Solano Ejido, located in the Municipality of Guasave, Sinaloa, Mexico.**

No. de aislados	Tejido	( $\log_{10}$ UFC $g^{-1}$ ) <sup>2</sup>
9	Raíz	3.5 <sup>x</sup> ± 0.1c <sup>y</sup>
2	Hoja	2.2 ± 0.3a
4	Tallo	1.5 ± 0.2b

<sup>x</sup> Valores promedio de las tres réplicas por tejido y triplicados de las siembras de cada suspensión (n = 9) / Average values of the three replications by tissue and in triplicate from the cultivations of each suspension (n = 9).

<sup>y</sup> Letras diferentes en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas (p < 0.05) / Different letters in super-script indicate statistically significant differences (p < 0.05).

<sup>2</sup>UFC: unidades formadoras de colonias por gramo de peso fresco, según corresponda / UFC: culture-forming units per gram of fresh weight, as appropriate.

**Cuadro 2. Características de las bacterias relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal aisladas en plantas de jitomate (*in vitro* y campo) recolectadas en parcelas del campo agrícola del Ejido Gabriel Leyva Solano, Municipio de Guasave, Sinaloa, México.****Table 2. Characteristics of bacteria related with growth promotion in plants, isolated from tomato plants (*in vitro* and field) gathered from plots of the field in the Gabriel Leyva Solano Ejido, Municipality of Guasave, Sinaloa, Mexico.**

Cepa	Origen	Quitinasa	Sideróforos	Fosfatos
<b>Control positivo</b> (B25) <i>Bacillus cereus</i>	<b>Maíz</b>	+	+	+
<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	<b>In vitro</b>	-	+	+
<i>Shinella</i> sp.	Foliar	+	-	-
<i>Burkholderia cepacia</i>	Raíz	+*	+*	+*
<i>Sphingobium herbicidovorans</i>	Raíz	+	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp.	Raíz	+*	+*	+*
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Foliar	+	+	-
<i>Rhizobium radiobacter</i>	Raíz	+*	+*	+*

\* \*Visualmente produce más que control positivo (B25) *B. cereus* aislado de maíz / \*Visually produces more than positive control (B25) *B. cereus* maize isolation.

de las raíces y heridas de tejidos que ocurren como resultado del crecimiento de la planta.

Por otra parte, se ha reportado que existe una mayor diversidad de filotipos en la rizosfera de plantas de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*), que la diversidad de endófitos bacterianos (Márquez-Santacruz *et al.*, 2010). La morfología colonial de los aislados presentó pocas diferencias entre sí a las 48 h de crecimiento, caracterizadas por tener color blanco o crema, solo una mostró pigmentos de color rojo brillante, forma circular, borde ondulado, con superficie brillante. La comparación de las secuencias obtenidas del gen 16S ADNr de los siete aislados endófitos contra la base de datos del NCBI, indicó estrechas relaciones con las especies bacterianas identificadas en el GenBank, con identidades mayores al 97% representando a: *Methylobacterium radiotolerans* (NR074244.1), *Shinella* sp. (KF261566.1), *Burkholderia cepacia* (AB162427.1), *Sphingobium herbicidovorans* (NR113843.1), *Pseudomonas* sp. (KR067597.1), *Achromobacter xylosoxidans* (KR136349.1) y *Rhizobium radiobacter* (KF975413.1).

On the other hand, there are reports of a larger diversity of phylotypes in the rhizosphere of husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*), than the diversity of bacterial endophytes (Márquez-Santacruz *et al.*, 2010). The culture morphology of the isolations displayed few differences amongst each other after 48 h of growth, characteristically white or cream-colored; only one displayed bright red pigmentation, a circular shape, ruffled edges and a shiny surface. The comparison of the sequences obtained from the gene 16S rDNA of the seven endophytic isolations against the NCBI database indicated broad relations with the bacterial species identified in the gene bank, with identities above 97% representing *Methylobacterium radiotolerans* (NR074244.1), *Shinella* sp. (KF261566.1), *Burkholderia cepacia* (AB162427.1), *Sphingobium herbicidovorans* (NR113843.1), *Pseudomonas* sp. (KR067597.1), *Achromobacter xylosoxidans* (KR136349.1) and *Rhizobium radiobacter* (KF975413.1).

The data generated by the database helped tentatively identify the organisms, yet a more thorough molecular characterization is necessary

Los datos generados por la base de datos permitieron dar a conocer de manera tentativa a los organismos; sin embargo, es necesaria una caracterización molecular más exhaustiva para asignar a que especie pertenecen. La Figura 1 ilustra las relaciones filogenéticas de los aislados presentando siete clusters (I a VII); en donde la inclusión de secuencias de referencia permitió corroborar la identidad de estas mostrando un agrupamiento con las caracterizadas y publicadas en otros trabajos. Turner *et al.* (2013) proponen que la interacción planta-microorganismo es diversa; sin embargo, aquellas relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal son importantes para el uso agro-biotecnológico (entre otras muchas aplicaciones).

En este trabajo, se destacan los géneros *Pseudomonas* y *Burkholderia*; dichos géneros han sido ampliamente estudiados por la producción y emisión de su diversa gama de productos metabólicos secundarios incluyendo antibióticos y compuestos orgánicos volátiles antifúngicos (Hernández-León *et al.*, 2015). Otros reportes, muestran que los géneros *Pseudomonas* y *Burkholderia*, son miembros dominantes en la microbiota rizosférica con habilidad para la utilización de sustratos carbonados, lo que apoya la teoría de que estas bacterias son estimuladas por la presencia y composición de distintos exudados radiculares (Marrero *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2016). En este estudio las cepas de *Pseudomonas* y *Burkholderia*, se aislaron en raíces de plantas de jitomate recolectadas en campo, lo cual es consistente en otros estudios. Madhaiyan *et al.* (2007), demostraron que la bacteria *Burkholderia* sp. reduce la acumulación de cadmio y plomo en raíces y brotes en plántulas de tomate como también del metal que está disponible en el suelo debido a la absorción y bioacumulación por parte de la bacteria. Un paso importante es el uso de tres formulaciones comerciales de *Pseudomonas* registradas en la Agencia de Protección Ambiental de EE. U.U, para la supresión de enfermedades de las

to define what species they belong to. Figure 1 illustrates the phylogenetic relations of the isolations presenting seven clusters (I to VII), where the inclusion of reference sequences helped verify their identity by showing a group with those characterized and published in other papers. Turner *et al.* (2013) propose that plant-microorganism interactions are diverse, although those related to plant growth promotion are important for agrobiotechnological use (among many other uses).

This experiment highlights the genera *Pseudomonas* and *Burkholderia*. These have been widely studied for the production and emission of their diverse range of secondary metabolical products, including antibiotics and volatile organic antifungal compounds (Hernández-León *et al.*, 2015). Other reports show that the genera *Pseudomonas* and *Burkholderia* are dominant members in the rhizospheric microbiot with the ability to use carbon substrates, which supports the theory that these bacteria are stimulated by the presence and composition of different root exudates (Marrero *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2016). In this study, the *Pseudomonas* and *Burkholderia* strains were isolated in tomato plant roots gathered in the field, which is consistent with other studies. Madhaiyan *et al.* (2007) proves that the bacteria *Burkholderia* sp. reduces the accumulation of cadmium and lead in tomato plant roots and shoots, as well as the metal available in the soil due to the absorption and bioaccumulation by the bacteria. An important step is the use of three commercial formulations of *Pseudomonas* registered in the Environmental Protection Agency of the United States for the suppression of plant diseases, respectively. These products are applied in balers to prevent fungal diseases during the storage of citrus fruits, stone fruits and potatoes (Stockwell *et al.*, 2006).

The group of bacteria called plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) includes the



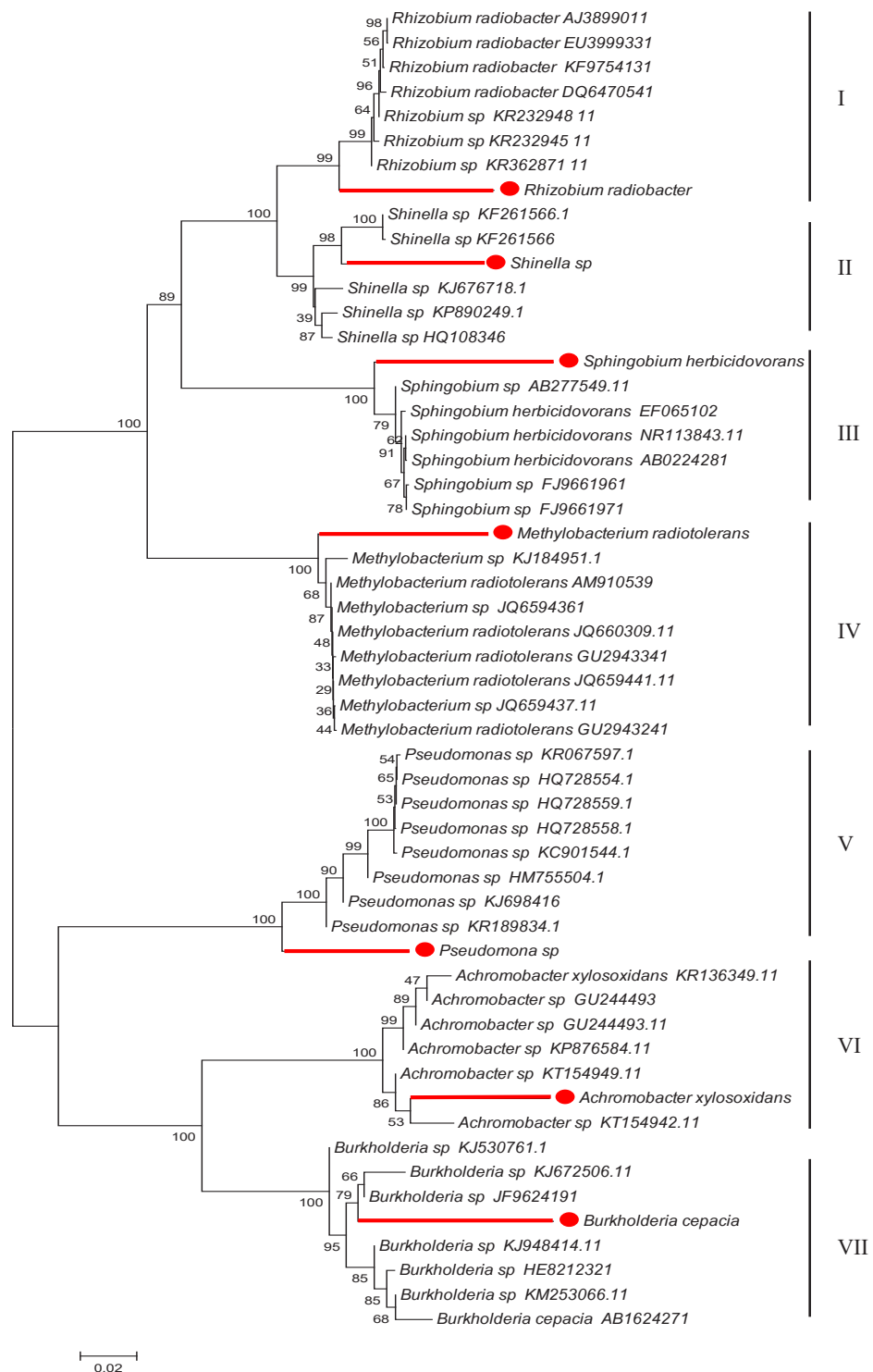


Figura 1. Relaciones filogenéticas de siete bacterias endófitas (marcadas línea roja) aisladas de tejido (raíz, tallo follaje) de jitomate colectadas en campo y bajo condiciones *in vitro* (Semilla). Aislamientos comparados con secuencias Gen-Bank.

Figure 1. Phylogenetic relations between seven endophytic bacteria (red lines) isolated from tissues (root, foliage stem) from tomato gathered on the field and under *in vitro* (Seed) conditions. Isolations compared with GenBank sequences.

plantas, respectivamente. Estos productos se aplican en empacadoras para prevenir enfermedades fúngicas durante el almacenamiento de cítricos, frutas de hueso y papa (Stockwell *et al.*, 2006).

El grupo de bacterias llamadas rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPR) incluye el género *Rhizobium*. Las investigaciones se han orientado su estudio como promotor del crecimiento de plantas leguminosas y no leguminosas (Piñerúa *et al.*, 2013). Por otra parte, estudios realizados por Santillana *et al.* (2005), reportaron que cepas de *Rhizobium*, estimulan la germinación de semillas de jitomate y promueven su crecimiento. En la actualidad, la agricultura sustentable plantea mejorar la eficiencia de la fijación del nitrógeno mediante el uso de plantas leguminosas y rizobios competitivos, capaces de ser usados en bioremediación y fitorremediación y de esta manera extender las ventajas de la simbiosis a otros cultivos (Piñerúa *et al.*, 2013). En este estudio la cepa de *Methylobacterium* fue aislada de tejido vegetal de plántulas de jitomate establecidas bajo condiciones *in vitro* sin reguladores de crecimiento, no hay reportes de dicho género bajo condiciones *in vitro* en plantas de jitomate. Diversos estudios han reportado que presentan la capacidad de producir fitohormonas que estimulan el crecimiento vegetal, favoreciendo la fijación de nitrógeno y protegiendo a la planta contra patógenos (Pérez-Montaña *et al.*, 2014). Otro grupo de bacterias importantes aisladas del tejido de plantas de jitomate lo conforman *S. herbicidovorans* y *A. xylosoxidans*.

Actualmente, existen pocos trabajos reportados en relación a *S. herbicidovorans*, el cual es ampliamente utilizado contra las malas hierbas de hoja ancha en la agricultura, pastos, césped e industrias (Müller *et al.*, 2004). Estudios enfocados a la evaluación de la actividad antifúngica de *A. xylosoxidans* contra aislados de *F. oxysporum* y *F. solani*, reportaron efectos positivos reduciendo hasta en un 80% el crecimiento del micelio del patógeno en

genus *Rhizobium*. Investigations have pointed its study as the growth promoter in legume and non-legume plants (Piñerúa *et al.*, 2013). On the other hand, studies by Santillana *et al.* (2005) reported that strains of *Rhizobium* stimulate the germination of tomato seeds and promote their growth. Nowadays, sustainable agriculture suggests improving the efficiency of nitrogen fixation using legume plants and competitive rhizobia, which can be used in bioremediation and phytoremediation, thus extending the advantages of symbiosis to other crops (Piñerúa *et al.*, 2013). In this study, the strain of *Methylobacterium* was isolated from the plant tissue of tomato seedlings established under *in vitro* conditions without growth regulators; there are no reports of this genus under *in vitro* conditions in tomato plants. Diverse studies have reported that they are able to produce phytohormones that stimulate plant growth, favoring nitrogen fixation and protecting the plant against pathogens (Pérez-Montaña *et al.*, 2014). Another group of important bacteria isolated from the plant tissue of tomato is composed of *S. herbicidovorans* and *A. xylosoxidans*.

There are currently few investigations reported in regard to *S. herbicidovorans*, which is widely used against broad-leaf weeds in agriculture, grasses, lawn and industries (Müller *et al.*, 2004). Studies focusing on the evaluation of the antifungal activity of *A. xylosoxidans* against isolations of *F. oxysporum* and *F. solani* reported positive effects, reducing the mycelial growth of the pathogens by up to 80% in comparison with the control, suggesting a potential use as a biocontrol agent (Dhaouadi *et al.*, 2018). The inoculation of *A. xylosoxidans* F3B in *Arabidopsis thaliana* has been reported to stimulate a significant increase in root length and fresh weight, considering said bacteria as endophytic (Ying-Ning *et al.*, 2009).

In the evaluation of activities related with the promotion of plant growth, the strains

comparación con el control, sugiriendo un uso potencial como agente de biocontrol (Dhaouadi *et al.*, 2018). Se ha reportado la inoculación de *A. xylosoxidans* F3B en *Arabidopsis thaliana* estimulando un aumento significativo en la longitud de la raíz y peso fresco, considerando dicha bacteria como endófito (Ying-Ning *et al.*, 2009).

En la evaluación de actividades relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal se observó que las cepas *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Rhizobium* presentaron alta capacidad fosfatosolubilizadora, frente al control (B25) *Bacillus cereus* (Cuadro 2). En la producción de sideróforos el aislado con mayor producción ante el control fue *Pseudomonas* sp. (Cuadro 2). Esta característica asocia a las rizobacterias, con el aumento del hierro disponible en el suelo permitiendo su absorción por la planta para constituir un mecanismo de promoción de crecimiento (Gouda *et al.*, 2018). Aunque no es frecuente encontrar evaluaciones cuantitativas de la síntesis de sideróforos por el género de *Pseudomonas*, se ha reportado la producción de varios sideróforos, con una gran afinidad por el Mo, V, Cu y Zn (Harrington *et al.*, 2012). Por otra parte, las bacterias endófitas pueden ser usadas como agentes de biocontrol mediante la producción de enzimas como hidrolasas y quitinasas consideradas como enzimas de defensa de las plantas contra la infección de patógenos (Perez *et al.*, 2013). En este trabajo la cepa con mayor actividad quitinasa fue *Burkholderia cepacia* (Cuadro 2).

Las especies bacterianas endófitas asociadas al cultivo de jitomate fueron: *Methylobacterium radiotolerans* (*in vitro*), *Shinella* sp. y *Achromobacter xylosoxidans* (tejido foliar), *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas* sp., *Sphingobium herbicidovorans* y *Rhizobium radiobacter* (raíz). En general, bajo las condiciones evaluadas en la presente investigación

*Pseudomonas*, *Burkholderia* and *Rhizobium* were observed to display a high phosphate solubilizing ability, in comparison with the control (B25) *Bacillus cereus* (Table 2). In the production of siderophores, the isolation with the greatest production in comparison with the control was *Pseudomonas* sp. (Table 2). This characteristic relates rhizobacteria with the increase in iron available in the soil, allowing its absorption by the plant to constitute a growth-promoting mechanism (Gouda *et al.*, 2018). Although finding quantitative evaluations of the synthesis of siderophores by the genus *Pseudomonas* is infrequent, there have been reports of the production of several siderophores with a strong affinity for Mo, V, Cu and Zn (Harrington *et al.*, 2012). On the other hand, endophytic bacteria can be used as biocontrol agents with the production of enzymes such as hydrolases and chitinases, considered as plant defense enzymes against the infection from pathogens (Perez *et al.*, 2013). In this investigation, the strain with the highest chitinase activity was *Burkholderia cepacia* (Table 2).

The endophytic bacterial species associated with tomato crop were *Methylobacterium radiotolerans* (*in vitro*), *Shinella* sp. and *Achromobacter xylosoxidans* (foliar tissue), *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas* sp., *Sphingobium herbicidovorans* and *Rhizobium radiobacter* (root). In general terms, under the conditions evaluated in this investigation, approximately 86% of the isolated strains were observed to have the ability to produce plant-growth promoting substances, and according to this, these results show the possible beneficial effect of the bacterial endophytes in tomato plants. This lays the foundations for future field studies to determine the effect of these strains on the production and quality of tomato fruits.

se observó que aproximadamente el 86% de las cepas aisladas tienen capacidad de producir sustancias promotoras de desarrollo vegetal, de acuerdo con lo anterior estos resultados muestran el posible papel benéfico de los endófitos bacterianos en plantas de jitomate. Lo que sienta las bases para futuros estudios de campo para determinar el efecto de estas cepas sobre la producción y calidad de frutos de tomate.

#### AGRADECIMIENTOS

Universidad de Occidente y Dirección de Investigación y Posgrado Programa de Apoyo a la Investigación.

#### LITERATURA CITADA

- Chowdhury SP, Hartmann A, Gao X and Borriss R. 2015. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - a review. *Frontiers in Microbiology*. 6:780. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00780>.
- Dhaouadi S, Rouissi W, Mougou-Hamdane A and Nasraoui B. 2018. Evaluation of biocontrol potential of *Achromobacter xylosoxidans* against *Fusarium* wilt of melon. *European Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-01646-2>.
- Eaton CJ, Cox MP and Scott B. 2011. What triggers grass endophytes to switch from mutualism to pathogenism? *Plant Science* 180:190–195. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.10.002>.
- Figuroa-López, AM, Cordero-Ramírez JD, Martínez-Álvarez JC, López-Meyer M, Lizárraga-Sánchez GJ, Félix-Gastélum R, Castro-Martínez C y Maldonado-Mendoza IE. 2016. Rhizospheric bacteria of maize with potential for biocontrol of *Fusarium verticillioides*. *Springer Plus*, 5, 330. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1780-x>.
- Gouda S, Kerry RG, Das G, Paramithiotis S, Shin HS and Patra JK. 2018. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research* 206:131-140. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.016>
- Gundel PE, Martínez-Ghersa MA, Omacini M, Cuyeu R, Paganano E, Ríos R and Ghersa CM. 2012. Mutualism effectiveness and vertical transmission of symbiotic fungal endophytes in response to host genetic background. *Evolutionary Applications* 5:838–884. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2012.00261.x>
- Harrington JM, Bargar JR, Jarzecki AA, Roberts JG, Sombers LA and Duckworth OW. 2012. Trace metal complexation by the triscatecholate siderophore protochelin: structure and stability. *Biometals* 25: 393-412. <https://doi.org/10.1007/s10534-011-9513-7>.
- Hernández-León RD, Rojas-Solis M, Contreras-Pérez MC, Orozco-Mosqueda LI, Macías- Rodríguez H and Reyes-

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Universidad de Occidente and the Office for Research and Postgraduate Studies Program for the Support of Research.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

- de la Cruz. 2015. Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biological Control Journal* 81:83-92. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.11.011>
- Kumar A, Singh R, Yadav A, Giri DD, Singh PK and Pandey KD. 2016. Isolation and characterization of bacterial endophytes of *Curcuma longa* L. 3. *Biotechnology* 6(1):60. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0393-y>.
- Luna-Martínez L, Martínez-Peniche RA, Hernández-Iturriaga M, Arvizu-Medrano SM y Pacheco-Aguilar JR. 2013. Caracterización de Rizobacterias Aisladas de Tomate y su Efecto en el Crecimiento de Tomate y Pimiento. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 36(1): 63-69. <https://www.researchgate.net/publication/262786197>
- Madhaiyan M, Poonguzhali S and Tongmin SA. 2007. Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Chemosphere* 69:220–228. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.04.017>.
- Márquez-Santacruz HA, Hernandez-Leon R, Orozco-Mosqueda MC, Velazquez-Sepulveda I and Santoyo G. 2010. Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*) and their detection in the rhizosphere. *Genetics and Molecular Research*. 9:2372-2380. <https://doi.org/10.4238/vol9-4gmr921>
- Marrero MA, Agaras B, Wall LG y Valverde C. 2015. Enriquecimiento diferencial de *Pseudomonas* spp. en el rizoplasma de distintas especies cultivadas *Reviews Argent Microbiology* 47(2):132-137 <https://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2015.03.007>
- Müller TA, Steven MB, Christoph W, Jan RV, Hans and PE. 2004. Genetic Analysis of Phenoxyalkanoic Acid Degradation in *Sphingomonas herbicidovorans* MH. *Applied and Environmental Microbiology* 70(10): 6066-6075. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.10.6066-6075.2004>
- Murashige T and Skoog E. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15 (2): 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nawangsih AA, Damayanti I, Wiyono S, Juang GK. 2011. Selection and Characterization of Endophytic Bacteria as Biocontrol Agents of Tomato Bacterial Wilt Disease. *Hayati Journal of Biosciences* 18(2): 66-70. <https://doi.org/10.4308/hjb.18.2.66>.
- Ortiz-Galeana MA, Hernández-Salmerón JE, Valenzuela-Aragón B, de los Santos-Villalobos S, Rocha-Granados MC and Gustavo-Santoyo. 2018. Diversity of cultivable endophytic bacteria associated with blueberry plants (*vaccinium corymbosum* l.) cv. biloxi with plant growth-

- promoting traits. Chilean Journal Agricultural & Animal Science 34(2): 140-151. ISSN 0719-3882 print. ISSN 0719-3890 online
- Perez CA y Chamorro LB. 2013. Bacterias endófitas: Un nuevo campo de investigación para el desarrollo del sector agropecuario. Revista Colombiana Ciencia Animal 5(2):439-462. <https://doi.org/10.24188/recia.v5.n2.2013.457>
- Pérez-Montaña F, Alías-Villegas C, Bellogín RA, Del Cerro P, Espuny MR, Jiménez-Guerrero I, López-Baena FJ, Ollero FJ and Cubo T. 2014. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. Microbiological Research 169(5-6):325-336. <http://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.011>
- Pikosvkaya RI. 1948. Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. Microbiologia.17:362-370.
- Piñerúa Gonsalvez J F, Zambrano Infantino RC, Calcaño C, Montaña C, Fuenmayor Z, Rodney H, Rodney M, Rossanna CZ, Infantino CC, César M, Zaida F, Henry R and Marianela R. 2013. Endocarditis infecciosa por *Rhizobium radiobacter*: Reporte de un caso. Investigación Clínica 54(1):68-73 ISSN 0535-5133.
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y alimentación. 2018. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. [www.siap.gob.mx/index](http://www.siap.gob.mx/index). (Consulta: Diciembre, 2018).
- Saitou N. and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4:406-425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Sánchez-Bautista A, De León-García de Alba C, Aran-da-Ocampo S, Zavaleta-Mejía E, Nava-Díaz C, Good-win PH and Leyva-Mir SG. 2017. Root endophyte bacteria in drought-tolerant and drought-susceptible maize lines. Revista Mexicana de Fitopatología 36(1): 35-55. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1710-3>
- Santillana Nery, Arellano Consuelo y Zúñiga Doris. 2005. Capacidad del *Rhizobium* de Promover el Crecimiento en Plantas de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller) Ecología Aplicada 4(1-2):47-51. <https://doi.org/10.21704/rea.v4i1-2.297>.
- Schwyn B and Neilands JB. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Analytical Biochemistry 160:47-56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9).
- Shanmugaiah V, Mathivanan N, Balasubramanian N and Manoharan PT. 2008. Optimization of cultural conditions for production of chitinase by *Bacillus laterosporus* MML2270 isolated from rice rhizosphere soil. African Journal of Biotechnology 7(15): 2562-2568. <http://www.academicjournals.org/AJB> ISSN 1684-5315.
- Shi T, Reeves RH, Gilichinsky DA and Friedmann EI. 1997. Characterization of viable bacteria from Siberian permafrost by 16S rDNA sequencing. Microbial Ecology 33:169-179. <https://doi.org/10.1007/s002489900019>
- Sørensen J and Sessitsch A. 2007. Plant-associated bacteria life style and molecular interactions. p. 211-236. Modern soil microbiology. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Stockwell, VO, Johnson, KB, and Johnson, VW. 2006. Colonization of Flowers by *Pseudomonas Fluorescens* A506 Formulated in a Biopolymer gel. Acta Horticulturae 704:293-300. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.704.42>
- Surette MA, Sturz AV, Lada RR and Nowak J. 2003. Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. sativus): Their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. Plant and Soil Springer 253:381-390. <https://doi.org/10.1023/a:1024835208421>
- Tamura KD, Peterson N, Peterson G, Stecher, M and Nei S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution 28:2731-2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>.
- Turner TR, James EK and Poole PS. 2013. The plant microbiome. Genome Biology 14:209. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-6-209>
- Yang CJ, Zhang XG, Shi GY, Zhao HY, Chen L, Tao KY and Hou TP. 2011. Isolation and identification of endophytic bacterium W4 against tomato *Botrytis cinerea* and antagonistic activity stability. African Journal of Microbiology 5(2):131-136 <http://dx.doi.org/10.5897/AJMR10.815>.
- Ying-Ning Ho, Dony CM, Chun HS, Shu CH and Chieh CH. 2009. A novel endophytic bacterium, *Achromobacter xylosoxidans*, helps plants against pollutant stress and improves phytoremediation. Journal of Bioscience and Bioengineering 108(1): 75-95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.08.276>.