

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

CENTRO DE CIENCIAS GENOMICAS

**Simbiosis de transmisión vertical en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.):
nuevas especies de endófitos de semillas incluyendo *Rhizobium
endophyticum*.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

ALINE LOPEZ LOPEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA ESPERANZA MARTINEZ ROMERO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

La presente tesis se realizó dentro del programa Ecología Genómica en el Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. María Esperanza Martínez Romero.

Esta tesis fue realizada con apoyo de los donativos PAPIIT IN200709, DGAPA, GEF-PNUMA-CIAT y FOMIX 04-09-08.

Comité tutorial:

Dra. María Esperanza Martínez Romero.

Dr. Lorenzo Segovia Forcella.

Dr. Miguel Lara Flores.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres, Silvia López Sánchez y Angel López Juárez, por ser los mejores. Por estar conmigo siempre que los necesito aunque la distancia nos separe por momentos. Gracias por su amor, sus consejos y su apoyo que me han dado. Los quiero mucho.

A mi hermano por compartir su vida conmigo, por su buen humor y sus buenos chistes que manda por correo electrónico.

A Marco Antonio Rogel por ser parte de mi vida; por tu apoyo, tu comprensión y tu amor.

A mis abuelos por su apoyo moral.

A la Dra. Esperanza Martínez Romero por ser la asesora de esta tesis, por compartir su conocimiento conmigo e inspirar en mí mucha admiración.

A los Dres. Miguel Lara Flores y Lorenzo Segovia Forcella por ser parte de mi comité tutorial y haber estado pendiente de mi crecimiento profesional a lo largo de todos estos años.

A los Dres. Juan José Peña Cabriales, Ma. Del Carmen Wachter Rodarte, Javier Plasencia de la Parra y Federico Sánchez por las observaciones y comentarios que dieron a esta tesis.

Al Dr. Jesús Caballero Mellado[†] por su apoyo y ayuda previo a mi candidatura.

A mis amigos Vianey, Patty, Yagul, Ramiro, Yazmín, Yuri, Luis y Rocío porque gracias a ellos sé lo que es la amistad verdadera. Gracias por estar conmigo estos años, por sus consejos, por compartir risas y agradables momentos.

A mis nuevos amigos Corelly, Paulina, Lulú, Wendy, Augusto, Nicolás, Janette, Ana, Miguel, Diana, Maritza, Napoleón, Mariana, Magdalena y Monse por permitirme conocerlos y ser parte de su vida. Por estar a lo largo del doctorado conmigo, por las agradables salidas, pláticas, deliciosos desayunos, trucos culinarios en el lab y por los maravillosos momentos que hemos compartido.

A mis compañeros del laboratorio por hacer que cada momento fuera ameno. Gracias por compartir sus experiencias y por su ayuda.

Al personal de apoyo del laboratorio por la ayuda que me proporcionaron durante el doctorado.

A todas aquellas personas que no mencioné pero que han sido parte de este proyecto y que saben que están mi en corazón, gracias.

INDICE

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
¿Qué es un endófito?	5
Comunidades endófitas en las plantas	7
Colonización de la planta por endófitos	9
Beneficios que aportan los endófitos a la planta	14
Métodos de estudio de los endófitos	23
Genómica de los endófitos	28
Hipótesis	31
Objetivos	31
Artículo	32
Materiales y métodos de resultados complementarios	54
Resultados complementarios	60
Discusión	63
Conclusiones	74
Perspectivas	76
Referencias	77
Anexo	93
Otras publicaciones	95

RESUMEN

El frijol es uno de los cultivos agrícolas más importante para México, América Latina y África. Su producción es afectada por la limitación de nutrientes como nitrógeno y fósforo además de plagas y enfermedades. Esta leguminosa tiene la capacidad de establecer una asociación con bacterias del género *Rhizobium* que aportan nitrógeno a la planta. La presencia de otras bacterias asociadas a esta leguminosa fue analizada. Miembros de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Methylobacterium*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Sphingomonas*, *Kocuria*, *Streptomyces* entre otros fueron aislados y caracterizados molecularmente a partir del xilema, de raíces de 3 y 12 días así como de semillas inmaduras de plantas de frijol cultivadas en condiciones de esterilidad sugiriendo que el origen de estas bacterias es en la semilla de la leguminosa. La capacidad de solubilizar fosfato mineral y fitato fue evaluada en las bacterias aisladas de frijol encontrando que miembros de los géneros *Acinetobacter*, *Streptomyces* y *Rhizobium* presentan dicha actividad.

La naturaleza endófito de la cepa de *Methylobacterium* CCGE 2054 fue evaluada visualmente al marcarla con un gen reportero; en plantas de frijol esta cepa fue capaz de colonizar el interior de las raíces al inocularla, además de algunos nódulos cuando se co-inoculó con *R. etli* CFN42.

La secuencia de los genes 16S rARN, *rpoB*, *dnaK*, *atpD* y la caracterización fenotípica, así como la hibridación ADN-ADN de la cepa CCGE 2052 permitió la denominación de una especie nueva de *Rhizobium* llamada *Rhizobium endophyticum*.

El análisis más detallado de los endófitos de frijol, así como del genoma de *R. endophyticum* permitirá comprender mejor la asociación endófito-planta.

ABSTRACT

Common bean is one of the most important crops in Mexico, Latin America and Africa for human consumption. Its production is affected by nutrient limitation as nitrogen and phosphorus, and diseases. This legume has the ability to associate with nitrogen fixing bacteria belonging to the genus *Rhizobium* providing nitrogen to the plant. In this work the association of common bean with other bacteria was analyzed. Members from *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Methylobacterium*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Sphingomonas*, *Kocuria*, *Streptomyces* genera were isolated and characterized by sequencing 16S rRNA genes from bacteria isolated from 3-day and 12-day roots, sap xylem and immature seeds of plants grown in gnotobiotic conditions supporting the suggestion that the isolated bacteria are seed-borne endophytes. Some members of *Acinetobacter*, *Streptomyces* and *Rhizobium* showed mineral phosphate and phytate solubilization activities.

Colonization of common bean roots by *Methylobacterium* CCGE 2054 tagged with a reporter gene was evaluated. Beta glucuronidase activity was detected in root inner tissues and in some nodules when this strain was coinoculated with *Rhizobium etli* CFN42.

Sequence of 16S rRNA, *rpoB*, *dnaK*, *atpD* genes, phenotype characterization and DNA-DNA hybridization of strain CCGE 2052 with related strains of *Rhizobium* were the basis to describe *R. endophyticum* as a novel species. A further analysis on bean endophytes and the complete genome sequence of *R. endophyticum* CCGE 2052 will increase the understanding of the bacterial endophyte-plant association.

INTRODUCCIÓN

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es una leguminosa que forma parte de la dieta diaria de la población de América Latina y África. Esta leguminosa es cultivada en suelos tropicales que por lo general presentan bajo contenido de fósforo. El nitrógeno como el fósforo son macro-nutrientes esenciales para el crecimiento de la planta y tienen una participación importante en la composición de las células ya que el nitrógeno es necesario principalmente para la síntesis de compuestos como las bases nitrogenadas y aminoácidos. Por su parte, el fósforo participa en la síntesis de ácidos nucleicos, en la fotosíntesis, glicólisis, respiración, síntesis de membrana, activación e inactivación de enzimas, reacciones redox, generación de energía y en la fijación de nitrógeno (Israel, 1987; Raghothama, 1999). Por lo general, los agricultores utilizan fertilizantes químicos para subsanar las carencias de ambos elementos en el suelo; sin embargo, de las grandes cantidades aplicadas sólo una pequeña parte es aprovechada por las plantas, el resto contribuye a la contaminación del medio ambiente.

El frijol, al igual que muchas leguminosas tiene la capacidad de establecer una asociación con bacterias pertenecientes al género *Rhizobium* de las α -Proteobacterias (Martínez-Romero y Caballero-Mellado, 1996; Young, 1996) que son capaces de fijar nitrógeno atmosférico y transformarlo en amonio, forma asimilable por las plantas, debido a la actividad de la enzima nitrogenasa.

La domesticación del frijol comenzó hace aproximadamente 4000 años (Kaplan y Lynch, 1999) al seleccionar ecotipos silvestres de *P. vulgaris* en base a semillas y plantas grandes. Los dos centros de origen de esta leguminosa son México para las semillas mesoamericanas y los Andes para las semillas andinas. Existe una variabilidad genética del frijol tanto en los frijoles mesoamericanos como andinos en la utilización eficaz de fósforo y en la capacidad de fijación de nitrógeno (Beebe et al., 1997; Araujo et al., 1998; Vadez et al., 1999; Nielsen et al., 2001; Vadez and Drevon 2001; Christiansen, 2002; Singh et al., 2003). Diferentes proyectos de investigación han sido enfocados hacia el incremento de la producción del frijol a través de la selección de líneas resistentes a enfermedades

o incrementando la nodulación al utilizar cepas de *Rhizobium* eficientes (Martínez-Romero y Rosenblueth, 1990; Martínez-Romero et al., 1998; Rengel, 2002; Hardarson y Atkins, 2003) con el objeto de obtener altos niveles de fijación de nitrógeno y por lo tanto un uso más eficiente de nutrimentos.

En el CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) se han identificado nuevas líneas de frijol con una alta tolerancia a diferentes tipos de estrés como la limitación de fósforo en comparación con las variedades comerciales cultivadas de frijol. Dentro de este programa de mejora del frijol la línea BAT 477 ha sido seleccionada por su alto potencial de fijación simbiótica de nitrógeno (FSN) tanto en alto como en bajo fósforo (CIAT, 1997) y en estrés hídrico (Castellanos et al., 1996). Por el contrario la línea DOR 364 es sensible a la limitación de este elemento. Ambos genotipos se utilizaron para la obtención de una progenie y en éstos llevar a cabo el análisis de la segregación de “Quantitative Trait Loci” (QTL) relacionadas con el potencial de FSN, resistencia al estrés hídrico y a la tolerancia de limitación de fósforo.

Hongos y bacterias pueden establecer asociaciones con plantas, animales e inclusive con el ser humano; dichas asociaciones tienen un carácter desde ser mutualistas hasta patógenas (Dimijian, 2000a). Estas últimas han hecho que el hombre tenga un interés especial en entenderlas debido a todas las consecuencias que conlleva el desencadenar un proceso patogénico en cultivos agrícolas o en la salud de los individuos (Dimijian, 2000b). Sin embargo, el análisis de las asociaciones mutualistas no dejan de llamar la atención, siendo la de *Rhizobium*-leguminosa una de las más estudiadas, seguida de la asociación micorrícica (Limpens y Bisseling, 2004; Stacey et al., 2006; Jones et al., 2007). La asociación entre plantas y otras bacterias diferentes a *Rhizobium* y hongos no micorrícicos también ha sido analizada, teniendo un desarrollo importante en los últimos años. La presencia de estos microorganismos en la planta parece no provocar síntomas de enfermedad; dicha asociación es denominada endófito, debido al hecho de que bacterias y hongos se encuentran en el interior de la planta (Hallman, 1997; Schulz y Boyle, 2006).

La función o los posibles beneficios que este tipo de organismos aportan a sus hospederos ha sido el objeto de muchas investigaciones para utilizarlos en la agricultura, en la industria o en la medicina. Este es un campo de estudio fascinante el cual no está tan desarrollado y en donde queda mucho por descifrar y entender para su manejo.

A continuación se abordarán los temas qué es un endófito, las comunidades de endófitos presentes en las plantas, el proceso de colonización de la planta por los endófitos, los beneficios que aportan a las plantas cuando los endófitos están presentes en ellas, las metodologías utilizadas para estudiar y analizar los endófitos y la genómica de estos microorganismos.

¿Qué es un endófito?

El significado literal del término endófito es “dentro de la planta” proviene de la raíz griega *endo* que significa *dentro* y *phyton*, *planta*. Este término ha sido usado de una manera amplia para nombrar a hongos, bacterias e insectos que se encuentran en el interior de las plantas (Schultz y Boyle, 2006). Cualquier órgano vegetal puede ser colonizado por un organismo endófito, desde la raíz, pasando por el tallo, hojas y llegando hasta el fruto y la semilla; supuestamente no hay planta alguna en los diversos ambientes naturales que esté desprovista de organismos endófitos (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006)

La interacción entre la planta y el endófito puede ser de saprofitismo, parasitismo o mutualismo. El término endófito ha sido usado para denominar a algas endófitas patógenas, plantas endófitas parásitas, bacterias y hongos endófitos mutualistas así como a bacterias patógenas y hongos en fases de desarrollo latente (Schultz y Boyle, 2006)

Sin embargo, a pesar de los diversos usos que se le ha dado al término endófito, en este trabajo y en muchos otros se ha definido como “aquel microorganismo que vive en el interior de la planta y que no causa daño aparente alguno al hospedero” (Hallman, 1997), esta definición puede aplicarse tanto a hongos como a bacterias. Un punto importante que hay que recordar es que la definición describe un estado momentáneo, por lo que puede incluir a bacterias

patógenas avirulentas así como patógenos latentes y/o virulentos en etapas tempranas de infección (Schultz y Boyle, 2006). Parece existir una línea muy frágil que separa estos organismos en endófitos y patógenos pero ¿qué es lo que rompe esta frágil división?. Los estados de comensalismo y mutualismo son donde el hospedero no es afectado; en el primero, el huésped obtiene nutrimentos del hospedero pero este último no tiene beneficio alguno. En el mutualismo, ambos participantes son beneficiados y a menudo se genera una promoción del crecimiento del hospedero. Ambos estados requieren un balance entre las respuestas de defensa de la planta y la demanda de nutrimentos del endófito. Este balance puede verse afectado por factores genéticos, por un desbalance en el intercambio de nutrimentos, por factores ambientales o por la interacción microorganismo-microorganismo resultando una interacción patogénica (Kogel et al., 2006; Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006; Schulz y Boyle, 2006).

Considerando el estilo de vida se pueden establecer dos grandes tipos de endófitos; 1) aquellos microorganismos que dependen estrictamente de la planta para su crecimiento y su sobrevivencia denominados **endófitos obligados**, éstos se pueden transmitir de una planta a otra de manera vertical o bien por vectores, y 2) los **endófitos facultativos**, los cuales son microorganismos que viven en el interior de la planta al menos una parte de su vida y no depende de ésta de una manera estricta para su supervivencia; por lo general estos microorganismos llevan a cabo un proceso activo de colonización de la planta y en su mayoría son microorganismos del suelo (Reinhold-Hurek y Hurek 1998; Hardoim et al., 2008).

Las asociaciones simbióticas de hongos micorrícicos arbusculares y de bacterias del género *Rhizobium* con leguminosas han sido consideradas por algunos autores como asociaciones endófitas ya que ambos tipos de microorganismos viven en el interior de las plantas y no causan daño visible al hospedero. Sin embargo, estas asociaciones presentan una particularidad, ambas forman estructuras especializadas en el hospero; arbusculos en el interior de las células vegetales por los hongos micorrícicos y nódulos en raíces y tallos en el caso de rhizobia que además tienen la capacidad de colonizar el interior de las células vegetales. Tomando en cuenta estas características, en lo que concierne a

este trabajo no se tomarán en cuenta como endófitos estos microorganismos, serían considerados como endosimbiontes (Reinhold-Hurek y Hurek, 1998).

Comunidades endófitas en las plantas.

El análisis de las poblaciones de endófitos presentes en las plantas comenzó a desarrollarse alrededor de los años 70's cuando al liberarse un pasto mejorado se reportaron desórdenes en el comportamiento del ganado; los científicos agrícolas determinaron que la causa de esos desórdenes era debido a alcaloides presentes en el pasto, los cuales eran producidos por un hongo endófito del género *Neotyphodium*. A partir de ese momento se incrementaron las investigaciones sobre la interacción endófito-planta, en particular sobre hongos endófitos y su asociación con pastos (Clay y Chardl, 2002; Ahlholm et al., 2002). Posteriormente, se reportó que no sólo los hongos estaban presentes en las plantas también había bacterias; las cuales inicialmente se pensó que eran contaminantes (Chanway, 1996).

Además del estudio de los endófitos en los pastos, la mayoría de la investigación sobre endófitos se ha centrado en especies con un valor económico, agronómico o medicinal importante provocando un menor conocimiento sobre los papeles ecológicos de endófitos propios de plantas nativas. Dentro de las especies agrícolas importantes de las cuales se ha reportado la diversidad de endófitos están la papa, el maíz, la caña de azúcar, el arroz; frutos como la papaya y el plátano; también árboles como pinos, eucaliptos y sobre todo álamos (Rosenblueth y Martínez Romero, 2006). En cuanto a los endófitos en leguminosas, éstos han sido analizados en plantas de soya, chícharo, trébol, *Conzattia multiflora* reportándose bacterias del género *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Pantoea*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Methylobacterium* (Sturz et al., 1996; 1997; Elvira-Recuenco y Vuurde, 2000; Kuklinsky-Sobral et al., 2004; 2005; Burch y Sarathchandra, 2006; Wang et al., 2006; Hung et al., 2007).

No obstante del empleo de diferentes metodologías para la caracterización de los endófitos en plantas, los géneros de bacterias frecuentemente reportados como endófitos son *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Enterobacter*,

Acinetobacter; muchas de éstas son bacterias de vida libre que se encuentran en el suelo y que al colonizar el interior de la planta pasan a ser endófitas; las cuales también presentan beneficios para la salud de la planta o bien promueven el crecimiento de ésta. Como parte de las comunidades de bacterias endófitas de plantas, frecuentemente se han reportado bacterias que son patógenos oportunistas de humanos como *Burkholderia cepacia*, *Acinetobacter* y *Staphylococcus* (Reiter et al., 2002; Kuklinsky-Sobral et al., 2004; Berg et al., 2005b; Mendes et al., 2007). Se ha cuestionado el origen de este tipo de bacterias, si son contaminantes o si en realidad forman parte de la comunidad bacteriana de la planta. Poco se sabe respecto a la posible función que pudieran estar desarrollando; hasta el momento se propone que las plantas son únicamente reservorios de estas bacterias. Como patógenos presentan elementos importantes para la colonización de la planta muy similares a los de los endófitos como el pili tipo IV reportado en *Azoarcus* y el cual también está presente en patógenos como *Neisseria gonorrhoeae* o *Ralstonia solanacearum*; este tipo de pili les permite adherirse a las células del hospedero, células vegetales o animales, está involucrado en la motilidad y en la virulencia (Dör et al., 1998; Liu et al., 2001; Kang et al., 2002; Berg et al., 2005b). Se sugiere que los mecanismos que utilizan para ingresar a hospederos animales o humanos pudieran ser los mismos que utilizan para ingresar a las plantas (Berg et al., 2005b; Tyler y Triplett, 2008).

La diversidad de bacterias endófitas es influenciada por el tejido vegetal analizado y por la etapa de crecimiento de la planta. Berg y colaboradores (2005a) en un análisis de bacterias endófitas y epífitas de papa analizaron cuatro ambientes diferentes (rizósfera, endoriza, filósfera y endósfera) mediante un enfoque polifásico y observaron que las comunidades de los cuatro ambientes presentan géneros de bacterias específicas a cada uno de ellos. El análisis de los endófitos de soya mostró que dentro de los tejidos analizados (raíz, tallo y hoja), la raíz es la que presenta una diversidad mayor que el resto de los tejidos; sugiriendo que esto es debido a que en la raíz se excretan sustancias que son nutrientes para los microorganismos presentes en el suelo y que estos nutrientes permiten el desarrollo de las comunidades microbianas en el interior de la raíz (Kuklinsky-

Sobral et al., 2004). De la misma manera, existen diferencias en la composición de las comunidades bacterianas ligadas al tipo de cultivar. En las poblaciones de bacterias asociadas a chícharo, se observó que un cultivar de los once analizados mostró una mayor colonización de bacterias endófitas (Elvira-Recuenco y van Vuurde, 2000).

La composición de las comunidades bacterianas presentes en el interior de las plantas puede estar determinada o influenciada por factores de tipo biótico o abiótico (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006). En el análisis de los endófitos de papa se mostró que las plantas infectadas con *Erwinia carotovora* presentaban un número mayor de T-RFLP's que las plantas sanas por lo que se sugiere que el patógeno tiene una influencia en la comunidad bacteriana (Reiter et al., 2002). El análisis del efecto de la fertilización nitrogenada en las poblaciones endófitas de soya mostró que en una fertilización alta se incrementa la abundancia relativa de γ -Proteobacteria mientras que las α -Proteobacteria disminuyen, en especial *Methylobacterium* y *Aurantimonas* (Ikeda et al., 2010).

Colonización de la planta por endófitos.

Las plantas pueden adquirir sus endófitos a partir de las comunidades bacterianas presentes en el suelo involucrando un proceso activo de colonización. Los primeros pasos en la colonización de las raíces de las plantas por bacterias del suelo probablemente son eventos estocásticos, que depende de la probabilidad de que se establezca una asociación planta-microorganismo efectiva. Esta asociación va a estar influenciada por la abundancia, la diversidad, el estado fisiológico y la distribución de los posibles endófitos que estén en el suelo. Factores como el genotipo de la planta, la etapa de crecimiento y el estado fisiológico, el tejido vegetal, las condiciones del suelo y las prácticas agrícolas también van a determinar la colonización y la estructura de la comunidad de bacterias endófitas (Hardoim et al., 2008; Fuertes-Ramírez et al., 1999; Reiter et al., 2002; van Overbeek y van Elsas, 2008). Además de lo señalado anteriormente, las bacterias tienen ciertas características que determinan la diversidad endófitas. Estas características tienen que ver con la capacidad de

colonización de la planta; por ejemplo, quimiotaxis, motilidad y la presencia de enzimas líticas; a este conjunto de capacidades se les denomina capacidades de colonización (Hardoim et al., 2008).

En el proceso de colonización se puede establecer una comunicación entre la planta y la bacteria. En los exudados de las raíces de las plantas se excretan a la rizósfera compuestos de alto y bajo peso molecular entre ellos mucílago y proteínas, además de azúcares, compuestos fenólicos, ácidos orgánicos, aminoácidos y otros metabolitos secundarios.

Otro factor que contribuye de una manera importante en la competitividad por la colonización de la raíz es la motilidad como una respuesta de quimiotaxis a los exudados de la raíz. Esta respuesta de quimiotaxis varía entre las especies de endófitos; por ejemplo, los ácidos orgánicos atraen más a *Pseudomonas fluorescens* en asociación con el tomate, mientras que *Bacillus pumilus* y *Corynebacterium flavescentens* son atraídos por carbohidratos y azúcares del arroz (Hardoim et al., 2008). Bacilio-Jiménez y colaboradores en el 2003 analizaron el efecto quimiotáctico de los exudados de arroz en bacterias endófitas y rizosféricas y encontraron que los dos tipos de bacterias fueron atraídas pero la respuesta fue variable dependiendo del origen de éstas. Las bacterias endófitas presentaron una respuesta más elevada de quimiotaxis a los exudados que las bacterias rizosféricas. Además, la atracción quimiotáctica no es constante en el desarrollo de la planta, las dos primeras semanas de germinación de la semilla es el periodo en donde los exudados tienen una mayor cantidad y diversidad de aminoácidos y azúcares que en tiempos posteriores donde la cantidad y la diversidad de estos compuestos disminuye (Bacilio-Jiménez et al., 2003; Yaryura et al., 2008)

Las bacterias se adhieren a la superficie de la raíz mediante flagelos o pilis y polisacáridos. Los pilis tipo IV son apéndices celulares filamentosos, compuestos por subunidades de una proteína pequeña llamada pilina (150-160 aminoácidos); la función de este tipo de pili es el anclaje, la virulencia en bacterias patógenas, la adquisición de material genético extracelular y la motilidad tipo “twitching”. El pili tipo IV ha sido reportado en bacterias gram negativas patógenas como en *Neisseria*

gonorrhoeae y *Pseudomonas aeruginosa*, así como en bacterias ambientales de los géneros *Mixococcus*, *Shewanella*, *Synechocystis* (Hahn 1997; Pelicic 2008). *Azoarcus* sp. BH72 es un endófito aislado de pasto kallar en Pakistán; puede colonizar arroz y establecer una asociación mutualista con un oomiceto presente en el pasto. Este endófito presenta un pili tipo IV que participa en la formación de microcolonias en raíces de arroz y en el micelio. Una mutación en el gen *pilA* no permite la agregación de las células de *Azoarcus* en los sitios de infección de plántulas de arroz, del micelio del hongo y mucho menos la formación de una estructura membranosa donde se lleva a cabo la fijación de nitrógeno en el hongo denominada diazosoma (Dörr et al., 1998; Hurek y Reinold-Hurek 2003).

También, la colonización de la superficie de la raíz ha sido estudiada en la bacteria rizosférica *Azospirillum brasilense*; esta colonización se da en dos fases: la primera fase es una adherencia débil, reversible e inespecífica en donde intervienen proteínas de superficie, polisacáridos capsulares y el flagelo, mientras que la segunda fase es una adherencia irreversible y mucho más estable entre 8 y 16 h después de haber sido inoculada la bacteria y está mediado por polisacáridos de superficie (Rodríguez-Navarro et al., 2007).

Además del pili, los lipopolisacáridos pueden estar involucrados en la colonización de la superficie de la raíz como lo reportan Ormeño-Orrillo y colaboradores en donde mutantes de *Rhizobium tropici* CIAT 899 afectadas en la biosíntesis de lipopolisacáridos (LPS) no pueden colonizar la raíz de maíz (Ormeño-Orrillo et al., 2008) al igual que en *A. brasilense* (Jofré et al., 2004). Una vez adheridas las bacterias pueden comenzar a penetrar el interior de la planta, los puntos principales de colonización son la punta de la raíz, las uniones donde emergen las raíces laterales o por algunas rupturas de la raíz dado por daño mecánico (Reinhold-Hurek y Hurek, 1998; Hardoim et al., 2008). Sin embargo, se ha observado que algunas bacterias endófitas presentan enzimas líticas como celulasas o glucanasas que pudieran participar en la colonización de la raíz (Hurek y Hurek-Reinhold 2003; Germain et al., 2004; Hardoim et al., 2008). Al estar en el interior, las bacterias pueden establecerse en espacios intercelulares de capas externas de la raíz o trasladarse a tejidos más internos, por lo que dependen de

una motilidad de “twitching” para llevar a cabo esta dispersión a otras partes de la planta. En *Azoarcus*, la mutante en el gene *pilT* involucrado en la retracción del pili tipo IV, carece de motilidad tipo “twitching”; además, tiene un fenotipo hiperpilado, es capaz de adherirse a la superficie de la raíz pero no se establece en el interior de ésta y mucho menos se puede dispersar a otras partes de la planta (Böhm et al., 2007). Las bacterias en el interior de la planta pueden localizarse en espacios intercelulares del córtex, en el tejido vascular tanto de raíz como de hoja y tallo (Tabla 1). La raíz no es el único lugar de colonización de la planta, también puede ser a través de los estomas de la hoja (Hardoim et al., 2008)

La colonización de la planta no sólo depende de las capacidades de las bacterias, por parte de la planta se ha reportado la existencia de un receptor cinasa denominado SRH5 en caña de azúcar, el cual es reprimido en plantas que están colonizadas por bacterias endófitas diazótrofes, el mecanismo de modulación de la expresión de este receptor no involucra la producción de hormonas por la bacteria y es muy específico ya que sólo con bacterias diazótrofes se reprime y no con la presencia de bacterias patógenas (Vinagre et al., 2006).

La respuesta de defensa de la planta regula la colonización de ésta por las bacterias. El etileno, es un segundo mensajero en la inducción de defensa por la vía independiente de ácido salicílico también conocido como Sistema de Defensa Inducida (ISR) y se produce de manera endógena por la planta. El etileno limita la magnitud de colonización de *Medicago truncatula* por *Klebsiella pneumoniae* 342, mutantes insensibles a etileno son hipercolonizadas por la bacteria. La presencia del sistema de secreción tipo III en las bacterias induce el sistema de defensa en las plantas por ambas vías (ácido salicílico dependiente e independiente) y limita la colonización de la planta por estos microorganismos. Bacterias mutadas en este sistema pueden colonizar mucho mejor las raíces de alfalfa al no estimular el sistema de defensa (Iñiguez et al., 2005).

Tabla 1. Localización de las bacterias endófitas.

Microorganismo	Hospedero	Técnica de visualización	Sitios primarios de colonización	Localización	Referencia
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>gfp</i>	Punta de la raíz	Espacios intercelulares fuera del cilindro vascular	Timmusk et al., 2005
<i>Pseudomonas putida</i> W619	Álamo	<i>gfp</i>		Superficie de la raíz Colonización interna	Taghavi et al., 2009.
<i>S. proteomaculans</i> 658	Álamo	<i>gfp</i>		Colonización interna	Taghavi et al., 2009.
<i>Enterobacter sp.</i> 638	Álamo	<i>gfp</i>		Colonización interna	Taghavi et al., 2009.
<i>Pseudomonas sp</i> VM1449	Álamo	<i>gfp</i>		Córtex de raíz Margen interno del periciclo	Germaine et al., 2004
<i>Pseudomonas sp</i> VM1450	Álamo	<i>gfp</i>		Xilema	Germaine et al., 2004
<i>Serratia marcescens</i>	Arroz	<i>gusA</i>	Punta de la raíz Sitios de emergencia de raíces secundarias	Espacios intercelulares Células corticales senescentes Aerenchima Vasos del xilema	Gyaneshwar et al., 2001.
<i>Bacillus megaterium</i> C4	Arroz	<i>gfp</i>	Punta de la raíz Uniones de raíces laterales	Espacios intercelulares Xilema Epidermis Parénquima cortical	Liu et al., 2006.
<i>Herbaspirillum sp</i> B501	Arroz	<i>gfp</i>		Espacios intercelulares de hoja	Elbeltagy et al., 2001
<i>Herbaspirillum sp</i> B501	Arroz	<i>gfp</i>		Espacios intercelulares de hoja	Elbeltagy et al., 2001
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> Z67	Arroz	<i>gusA</i>	Raíces laterales Sitios de emergencia de raíces laterales	Espacios intercelulares de raíz Aerenchima Células corticales Xilema hoja y tallo	James et al., 2002.
<i>Bacillus sp.</i> CY22	Campanilla china	<i>Rif^r</i>		Espacios intercelulares del córtex cercanos a la stele y en el aerenchima. Tallo.	Cho et al., 2003.
<i>G. diazotrophicus</i> PAL5	Caña de azúcar/Arroz	<i>gusA/gfp</i>	Punta de la raíz Sitios de emergencia de raíces laterales		Rouws et al., 2010.
<i>G. diazotrophicus</i>	Caña de azúcar	<i>gusA</i>		Células corticales del tallo Xilema	Fuentes-Ramírez et al., 1999.
<i>Pantoea agglomerans</i>	Arroz	<i>gusA</i>	Punta de la raíz Sitios de emergencia de raíces laterales	Córtex de la raíz Región stelar	Verma et al., 2001.
<i>Azoarcus</i> BH72	Pasto kallar Arroz	<i>gusA</i>	Tejidos no diferenciados de la punta de la raíz Sitios de emergencia de raíces secundarias	Xilema Córtex de la raíz Aerenchima	Hurek et al., 1994 Reinhold-Hurek y Hurek, 1998. Reinhold-Hurek y Hurek, 2003.

Beneficios que aportan los endófitos a la planta.

Las bacterias endófitas al igual que las bacterias rizosféricas pueden promover el crecimiento de la planta mediante mecanismos de acción directa como la producción de hormonas, la solubilización de nutrimentos, la fijación de nitrógeno o mediante mecanismos indirectos como la supresión de patógenos por la estimulación del sistema de defensa, por competencia con los patógenos así como por antibiósisis o inclusive ayudar a tolerar el estrés por metales pesados (Lugtenberg et al., 2002; Compant et al., 2005; Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006; Ryan et al., 2008; Berg y Hallmann, 2006).

Fijación biológica de nitrógeno. La disponibilidad de nitrógeno limita el crecimiento de las plantas terrestres, en los sistemas agrícolas las deficiencias de este elemento son compensadas con la aplicación de fertilizantes químicos nitrogenados; los que eventualmente tienen un efecto negativo en la calidad de los suelos y el agua. Se ha buscado la manera de compensar la falta de nitrógeno en el suelo sin provocar daños en el medio ambiente, una alternativa es mediante la fijación biológica de nitrógeno. Este proceso es único de procariontes (Archeae y Bacteria) y se estima que contribuye de manera global entre 100-200 millones de toneladas de nitrógeno fijado por año. Animales y plantas pueden beneficiarse de este nitrógeno fijado de manera directa cuando establecen asociaciones simbióticas con procariontes fijadores de nitrógeno o indirecta después de la mineralización de esas bacterias. Una de las asociaciones más estudiadas es la que se establece entre plantas leguminosas y bacterias de la familia *Rhizobiaceae* (Stacey et al., 2006). Sin embargo, los granos más importantes a nivel mundial (arroz, trigo, maíz, caña de azúcar) que pertenecen a la familia *Graminaceae* y que no forman de manera natural estructuras simbióticas especializadas pueden establecer asociaciones simbióticas con bacterias fijadoras de nitrógeno de otros géneros. La fijación de nitrógeno se lleva a cabo en los espacios intercelulares del tallo donde las concentraciones de oxígeno son muy bajas o nulas y por lo tanto la enzima nitrogenasa no es inhibida; la cantidad de nitrógeno fijado en gramineas es muy baja en comparación con la aportación por leguminosas.

La fijación de nitrógeno *in planta* se ha comprobado para la asociación arroz-*Herbaspirillum* (Elbeltagy et al., 2001), pasto kallar y arroz-*Azoarcus* (Hurek y Reinhold-Hurek, 2003). Sin embargo, se ha medido la capacidad de fijar nitrógeno de manera indirecta empleando la actividad de reducción de acetileno para asociaciones que se establecen entre caña de azúcar con *Pantoea* (Loiret et al., 2004), *Burkholderia* (Perin et al., 2006); arroz y *Serratia marcescens* (Gyaneshwar et al., 2001); piña-*Gluconacetobacter diazotrophicus* (Tapia-Hernández, 2000); maíz con *Burkholderia* (Perin et al., 2006); *Klebsiella pneumoniae* y trigo (Iñiguez et al., 2004); plátano con *Klebsiella* (Martínez et al., 2003).

Promoción del crecimiento. Las hormonas vegetales auxinas y citocininas están involucradas en varias fases del crecimiento y desarrollo de la planta. No sólo las plantas sintetizan estas moléculas, también los microorganismos pueden sintetizar auxinas y citocininas, las auxinas pueden regular la expresión de genes en bacterias (Spaepens et al., 2007). A estas hormonas se les ha atribuido la estimulación del crecimiento cuando se establecen asociaciones con bacterias benéficas. La producción de auxinas ha sido ampliamente estudiada en *Azospirillum*, en donde se han reportado tres vías de biosíntesis de esta hormona. La promoción del crecimiento por *Azospirillum* es sobre todo por hormonas más que por efecto de la fijación de nitrógeno (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000). La producción de ácido indol acético (AIA) se ha reportado para bacterias endófitas de muchos géneros y su efecto radica sobre todo en la estimulación de crecimiento radicular tanto en longitud como en la formación de raíces laterales esto genera una mayor área para adquirir nutrientes por las plantas y consecuentemente pueden crecer mejor. La promoción del crecimiento por hormonas vegetales se ha visto en una gran diversidad de plantas (Verma et al., 2001; Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006). Además de las hormonas se ha reportado que la producción de compuestos volátiles como el 2,3-butanediol y la acetoina tienen un efecto positivo en el crecimiento de las plantas; estos compuestos son producidos por *Bacillus subtilis* GB03, *Bacillus amyloliquefasciens* IN937, *Enterobacter cloacae* JM22 y *Enterobacter* sp 638; el efecto en el

crecimiento ha sido reportado en plantas como *Arabidopsis thaliana* y álamo. (Ryu et al., 2003; Taghavi et al., 2009).

No sólo la producción de hormonas o compuestos volátiles estimulan el crecimiento de la planta, la disminución de las concentraciones endógenas de etileno también tiene el mismo efecto ya sea por la reducción de 1-aminociclopropano 1-carboxilato (ACC) o por la inhibición de la ACC sintasa y/o la β -cystathionasa, enzimas de la síntesis de etileno (Hardoim et al., 2008). El etileno es producido por la inducción de estreses bióticos o abióticos, el efecto de esta molécula señal es la inhibición de la elongación de la raíz. La enzima ACC desaminasa participa en la disminución de este contenido de etileno endógeno mediante la conversión del precursor del etileno, el ACC en amonio y α -cetobutirato; de esta manera permite la elongación de la raíz (Lugtenberg et al., 2002). La actividad ACC desaminasa ha sido reportada en bacterias del género *Burkholderia* que se asocian a tomate (Onofre-Lemus et al., 2009).

Control biológico. Las prácticas actuales para controlar las enfermedades de las plantas se basan sobre todo en la resistencia genética propia de la planta, el manejo de ésta y su ambiente; y en la aplicación de pesticidas sintéticos. Algunos de los pesticidas sintéticos han dejado de ser útiles debido ya sea al cambio de regulaciones de seguridad por los efectos que tienen en organismos no blancos o por el desarrollo de resistencia en las poblaciones patógenas. Como consecuencia existe una demanda de métodos que complementen las actuales estrategias de manejo de enfermedades. El control biológico, el uso de microorganismos para suprimir enfermedades es una poderosa alternativa para contrarrestar la aplicación de químicos sintéticos. La gran diversidad presente en el mundo microbiano provee una fuente inagotable de posibles prospectos para este propósito. El incremento de la población de una cepa bacteriana en la cercanía de la planta puede suprimir la enfermedad sin causar daños en el hospedero o en la comunidad microbiana de otros organismos; en el ecosistema ésta parece ser una solución ideal. Bacterias presentes en el suelo como en el interior de las plantas han mostrado poseer la capacidad para suprimir o disminuir los síntomas de enfermedad en las plantas mediante diversos mecanismos.

Algunos endófitos pueden estimular el sistema de defensa de la planta denominado ISR (Induction of Systemic Resistance). La ISR es un estado fisiológico de la capacidad de defensa aumentada, la cual es activada por estímulos ambientales específicos; las defensas innatas de la planta son potencializadas contra los estímulos bióticos subsecuentes. Además del ISR, existe otra forma de resistencia inducida denominada Sistema de Resistencia Adquirida (SAR), la cual puede ser diferenciada en base a la naturaleza de las moléculas elicitoras, así como de las vías de regulación involucradas. El SAR puede ser activado por la exposición de la planta a microorganismos virulentos, avirulentos y no patógenos. Para que el SAR se establezca necesita un periodo de tiempo dependiente de la planta y del tipo de elicitores; periodo durante el cual se acumulan proteínas relacionadas con la patogénesis (quitinasas y glucanasas), además del ácido salicílico (SA). En este periodo hay una respuesta de hipersensibilidad seguida de muerte celular y necrosis del área afectada por el patógeno. A diferencia del SAR, el ISR no involucra la acumulación de las proteínas relacionadas con la patogénesis o del SA; en su lugar, involucra vías de señalización dependientes de jasmonato y etileno y su inducción no causa síntomas visibles en la planta. (Compant et al., 2005; Choudhary y Johri, 2009). El ISR se puede desencadenar por la presencia de componentes bacterianos como flagelos, elicitores de virulencia, por lipopolisacáridos, sideróforos o por compuestos volátiles (Ryu et al., 2004; Iñiguez et al., 2005; Compant et al., 2005; Choudhary y Johri, 2009). La inoculación de raíces transformadas de chícharo con *Bacillus pumilus* SE34, endófito de algodón, incrementa la protección de la planta contra la colonización de *Fusarium oxysporum* f sp. pisi estimulando varias reacciones de defensa que culminan en la elaboración de barreras en los sitios de infección y en el desarrollo de un ambiente tóxico para el hongo por compuestos fenólicos (Benhamou et al., 1996). *Methylobacterium* sp. aislado de cacahuate protege a su hospedero contra la infección de *Aspergillus niger/Sclerotium rolfsii* mediante el incremento de la actividad de enzimas como peroxidasa, β -1,3-glucanasa, proteínas relacionadas a patogénesis, además del incremento en compuestos fenólicos; mecanismos asociados con ISR (Madhaiyan et al., 2006c).

La inoculación de bacterias rizosféricas como *Bacillus megaterium* en las plantas han mostrado inducir mecanismos muy parecidos a los mencionados (Chakraborty et al., 2006). Sin embargo, *Bacillus* o *Methylobacterium* no son los únicos géneros que estimulan la defensa de las plantas; también *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida* y *Burkholderia phytofirmans* (Compant et al., 2005).

La competencia por la colonización de nichos o por nutrimentos es otro mecanismo que permite el control de patógenos. El hierro es un elemento esencial para el crecimiento de todos los organismos; bajo condiciones de limitación de este elemento, bacterias rizosféricas o endófitas producen compuestos de bajo peso molecular llamados sideróforos para competir por la adquisición del ión férrico y de esta manera privan a los hongos patógenos de este elemento (Compant et al., 2005). A partir de raíces de banano, se aislaron 131 endófitos pertenecientes al género de *Streptomyces*, de los cuales 24 mostraron una actividad antagónica contra *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. La cepa S96 fue la más abundante y la que en ensayos *in vitro* mostró antagonismo contra el hongo pero este efecto se perdía cuando se agregaba FeCl^{+3} a la zona de inhibición. En ensayos *in vivo*, la inoculación de esta cepa incrementó el peso fresco de las plantas y la severidad de la enfermedad provocada por *F. oxysporum* disminuyó, el mecanismo de este antagonismo sugiere la producción de sideróforos (Cao et al., 2005). Algunos endófitos de papa fueron evaluados en la producción de sideróforos y se encontró que cerca del 77 % producen estos compuestos de bajo peso molecular pero sólo el 11 % mostró una actividad antagónica contra hongos (Sessitsch et al., 2004).

La excreción de enzimas hidrolíticas como quitinasas, glucanasas, pectinasas es otro mecanismo de inhibición del crecimiento de los patógenos. La quitina es un homopolímero de N-acetil-D-glucosamina, es el segundo polímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa, y es hidrolizado enzimáticamente en disacáridos u oligosacáridos largos. La quitina es un elemento fibroso estructural de la pared celular de los hongos que proporciona rigidez. El rompimiento de los enlaces glucosídicos es perjudicial para la morfología celular del hongo; se debilita la pared celular y se vacía el contenido celular del hongo.

Las enzimas quitinasas o glucanasas pueden lisar las paredes celulares de los hongos. En la práctica es preferible una actividad quitinasa que glucanasa debido a que en las paredes celulares de la planta no existe quitina y por lo tanto es más específica para hongos (Neeraja et al., 2010). El antagonismo contra hongos patógenos y la presencia de actividades de enzimas líticas se ha reportado en bacterias endófitas de soya, papa, *Platycodon grandiflorum*, ginseng (Kuklinsky-Sobral et al., 2004; Senthilkumar et al., 2009; Sessitsch et al., 2004; Cho et al., 2003; Asraful Islam et al., 2010; Cho et al., 2007); aunque no se correlaciona la actividad de enzimas líticas con la actividad antagonista. Quecine y colaboradores (2008) establecen esta correlación al evaluar *in vitro* la actividad quitinolítica de *Streptomyces* endófitos y el antagonismo que tienen contra hongos patógenos de trigo, pero no se observa esta correlación en el antagonismo de los endófitos contra oomicetos, ya que estos últimos presentan celulosa como componente principal de la pared celular.

Las bacterias endófitas producen metabolitos secundarios que tienen la capacidad de inhibir patógenos; estos metabolitos presentan una actividad antifúngica y/o antimicrobiana (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006; Berg y Hallmann, 2006; Haroim et al., 2008). *Bacillus subtilis* CY22, endófito de *Platycodon grandiflorum* produce la iturina A, la cual suprime el crecimiento de varios hongos entre ellos *Rizoctonia solani* (Cho et al., 2003). En la soya, el endófito *Paenibacillus* sp. HKA-15 produce un péptido con efectos de antibiosis contra *Rizoctonia bataticola*; mutantes de esta cepa pierden la capacidad antagonista contra el hongo, este efecto no es resultado de una mutación en algún gen fisiológicamente importante de la bacteria por lo que sugiere que está involucrada en la síntesis de este metabolito secundario (Senthilkumar et al., 2007). *Pseudomonas viridiflava* se ha reportado como endófito de chícharo (Elvira-Recuenco et al., 2000); esta especie bacteriana tiene la capacidad de producir ecomycinas, que son una familia de péptidos nuevos con actividad contra hongos patógenos de humanos como *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans* (Strobel y Daisy, 2003).

Ensayos de antagonismo *in vitro* y/o *in vivo* se han realizado en plantas de papaya, papa, soya entre otros (Krechel et al., 2002, Sessitch et al., 2004; Shi et al., 2010; Senthilkumar et al., 2009); pero ninguno ha sido estudiado tan exhaustivamente como el caso de *Xilella fastidiosa* y *Curtobacterium flucumfasciens*. El primero es una bacteria fitopatogena que afecta plantas de cítricos así como viñedos del sur de California. Esta bacteria forma biopelículas en los vasos del xilema que tapan los conductos para agua y nutrimentos provocando la muerte de las plantas (Ramey et al., 2004). El análisis de las comunidades de bacterias endófitas de plantas sintomáticas y asintomáticas a la enfermedad de clorosis permitió la identificación de *Curtobacterium flucumfasciens* el cual estaba presente en plantas asintomáticas. Los ensayos *in vitro* mostraron que esta bacteria inhibe el crecimiento de *Xilella fastidiosa* y que la sustancia inhibitoria se encontraba en el sobrenadante del cultivo de *C. flucumfasciens* (Araujo et al., 2002; Lacava et al., 2004). Ensayos *in vivo* en plantas de *Cantharanthus roseus* mostró que la inoculación de *C. flucumfasciens* reduce la severidad de los síntomas de enfermedad producidos por *X. fastidiosa* en un 60 % de las plantas (Lacava et al., 2007). No es el único caso de biocontrol que se ha analizado, otras asociaciones entre bacterias endófitas y plantas han sido reportadas (Rosenblueth y Martínez Romero 2006; Ryan et al., 2008)

Biorremediación. Además de los efectos benéficos que proporcionan a la planta, los endófitos tienen potencial biotecnológico para mejorar la eficiencia y la aplicación de la fitorremediación. La fitorremediación es el uso de plantas y sus microorganismos asociados para remediar un sitio disturbado; es una tecnología *in situ* y *ex situ* poderosa que requiere un mantenimiento mínimo, resultando en un bajo costo y una aceptación alta. Debido a que las opciones convencionales disponibles para la remediación por lo regular son caras e invasivas al ambiente, la fitorremediación es una alternativa valiosa, especialmente para el tratamiento de grandes áreas contaminadas. La industria y la milicia tienen un efecto negativo en el suelo debido a que contaminan los sitios que ocupan dejándolos poco viables para la agricultura. Estos sitios son denominados recalcitrantes y parecen ser el centro de atención para utilizarlos como áreas de producción de plantas para

biodiésel y al mismo tiempo para que sean remediados empleando la fitorremediación.

Siciliano y colaboradores (2001) analizaron los endófitos asociados a plantas en suelo contaminados con hidrocarburos y con nitroaromáticos, con una atención especial en la presencia de genes involucrados con las vías metabólicas de degradación de los compuestos y encontraron que el enriquecimiento de genotipos catabólicos microbianos en el interior de la raíz ocurre en diferentes plantas, en una variedad de ambientes y en respuesta a diferentes contaminantes. Este enriquecimiento es dependiente de la especie de la planta y del contaminante. Una bacteria endófito del género *Methylobacterium* capaz de degradar 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-trinitriazeno (RDX) y octahidro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5-tetrazocino (HMX) en menos de 50 días tuvo un impacto importante en la recuperación de suelos contaminados por explosivos; esta cepa fue descrita como *Methylobacterium populi* (van Aken et al., 2004a; 2004b).

El grupo de Vangronsveld ha realizado un arduo trabajo en el papel de los endófitos en la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos y con explosivos. Analizaron la diversidad de endófitos asociados al álamo en suelos contaminados con tolueno y reportaron la presencia de *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Bacillus* y *Paenibacillus* entre otros microorganismos; además las comunidades de endófitos fueron diferentes al comparar dos variedades de álamo (Porteous Moore et al., 2006). También reportaron como endófitos del roble a bacterias pertenecientes a los géneros de *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*; los cuales tienen la capacidad de degradar Tricloroetileno (TCE) (Weyens et al., 2009a). Sin embargo, no sólo han realizado trabajos en el análisis de la diversidad de endófitos, se han involucrado en la mejora de la capacidad degradadora de BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno, xileno), en la reducción de la evapotranspiración y/o en la promoción del crecimiento utilizando endófitos tanto en plantas de *Lupinus* como de álamo y la posible transferencia horizontal de genes entre endófitos con la información de genes de degradación y las poblaciones nativas de

endófitos de plantas (Barac et al., 2004; Taghavi et al., 2005; Thagavi et al., 2009; Weyens et al., 2009a; 2009b; Weyens et al., 2010). Weyens y colaboradores estiman que la utilización de endófitos a los que se les ha incorporado un plásmido con un gen de degradación de tolueno como una posible solución en la biorremediación de los suelos y en la producción de biomasa para biodiesel utilizando suelos marginales es viable. Así mismo, han aportado datos experimentales, si bien no se ha aceptado del todo su propuesta parece que los endófitos sí juegan un papel importante en un proceso de biorremediación (Weyens et al., 2009c, 2009d)

No sólo la contaminación con productos como BTEX es el centro de atención de la biorremediación, también los metales pesados en el suelo son un grave problema en la producción agrícola o de plantas para biocombustible. El desarrollo que se ha dado en esta área no ha sido tan importante como se mencionó en el ejemplo anterior. Se han realizado contribuciones en la diversidad de endófitos asociados a plantas hiperacumuladoras de metales pesados como cadmio (Cd), zinc (Zn), níquel (Ni), cobre (Cu) o plomo (Pb) entre los cuales se han reportado bacterias de los géneros *Sphingomonas*, *Curtobacterium*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia* y Actinobacteria; algunas de éstas además de ayudar en la biorremediación también presentan actividad ACC desaminasa o producen sideróforos lo que estimula el crecimiento de la planta o bien favorece la salud de ésta (Idris et al., 2004, Kuffner et al., 2010; Guo et al., 2010; Sheng et al., 2008).

Productos naturales. El incremento en el número de personas en el mundo que tienen problemas de salud causados por diferentes tipos de cáncer, bacterias resistentes a antibióticos, protozoarios parásitos y hongos es alarmante. Una búsqueda intensiva por agentes antimicrobianos nuevos y más eficientes para contrarrestar estos problemas de salud está siendo llevada a cabo y los endófitos son una fuente potencial de compuestos médicos. Hongos y bacterias son capaces de producir metabolitos secundarios que tienen actividades antibióticas, anticancerígenos o antioxidantes. La mayor parte del análisis de estos metabolitos se ha centrado en el estudio de hongos endófitos, por lo que son pocos los

reportes de bacterias que producen este tipo de compuestos. El ejemplo más conocido es el compuesto de Taxol, encontrado en las especies *Taxus* y que después de años de investigación se encontró que también es sintetizado por el hongo endófito *Taxomyces andreanae*. Este compuesto presenta una función anticancerígena (Strobel, 2003). Varias revisiones han sido realizadas respecto a este tema en donde se abordan ejemplos concretos de microorganismos endófitos así como el o los metabolitos que producen; además de la naturaleza de éstos, su fórmula química y posibles aplicaciones en el campo de la medicina (Strobel, 2003; Strobel y Daisy, 2003; Strobel et al., 2004; Guanatilaka, 2006; Zhang et al., 2006).

El campo médico no es el único interesado y beneficiado por los productos naturales producidos por los endófitos, también la industria papelera, textil o alimenticia está interesada en las xilanasas, glucanasas, pectinasas, celulasas que los endófitos pudieran estar sintetizando (Sakiyama et al., 2001).

Métodos de estudio de los endófitos.

Por mucho tiempo el análisis de los endófitos se ha realizado mediante el aislamiento de éstos en medios de cultivo de laboratorio y su posterior caracterización, **método dependiente de cultivo**. El procedimiento de aislar endófitos es un paso crítico muy importante, el cual debe ser por una parte sensible para obtener a los endófitos y por otra parte severo para eliminar los microorganismos epífitos del tejido vegetal analizado. El procedimiento más usado para el aislamiento de endófitos consiste en una esterilización superficial del tejido, seguido de un triturado del mismo y finalmente obtención de crecimiento bacteriano en placas con medio de cultivo a partir del triturado y/o de pequeños segmentos de tejido esterilizado (Hallman et al., 2006).

Como se mencionó anteriormente, cualquier tejido vegetal puede ser objeto de estudio para aislar o identificar microorganismos endófitos. El tejido a analizar es esterilizado o desinfectado superficialmente; esta desinfección superficial consiste en un lavado del tejido en agua corriente, sobre todo de las raíces para eliminar los restos de suelo que están adheridos a éstas. Adicionalmente, se

puede llevar a cabo un pre-tratamiento para eliminar las sustancias hidrofóbicas en la superficie vegetal, de esta manera permitir un mejor acceso del agente desinfectante al tejido y por ende una mejor desinfección; en este paso también se podría realizar una sonicación para despegar más partículas adheridas a las raíces o bien hacer un suave cepillado en las hojas para eliminar la cera presente en éstas (Hallman et al., 2006). Enseguida, se realiza una esterilización superficial para eliminar los microorganismos que colonizan la superficie del tejido, esto con el uso de agentes desinfectantes; entre los más utilizados son el etanol al 70 o 95 % (Andreote et al., 2010; Singh et al., 2006), el hipoclorito de sodio o de calcio (Tapia-Hernández, 2000; Cho et al., 2002; Podolich et al., 2009; Asraful Islam et al., 2010), el peróxido de hidrógeno (Izumi et al., 2008) y en algunos casos el cloruro de mercurio (Goryluk et al., 2009). Este último se recomienda utilizarlo de una manera muy cautelosa por su toxicidad y sólo en aquellas ocasiones en donde los tejidos vegetales no puedan ser desinfectados de otra manera. En tejidos leñosos se puede realizar el desprendimiento de la corteza con un cuchillo o bisturí estéril y en algunos casos también se recurre al flameado de los tejidos, sobre todo en tallos como la caña de azúcar (Loiret et al., 2004; Velázquez et al., 2008). La combinación de algunos de estos agentes así como la duración de la aplicación de éstos puede hacer una esterilización superficial mucho más efectiva. El empleo de agentes surfactantes como Tween 20, Tween 80 o Triton X-100, además del uso del agente desinfectante reducen la tensión superficial y permiten que este último llegue a aquellos sitios donde no penetraría el agente desinfectante (Hallman et al., 2006; Rijavec et al., 2007).

Después de la aplicación del agente desinfectante, el tejido vegetal debe ser enjuagado de manera repetida con abundante agua estéril. Finalmente, se realiza una prueba de esterilidad para confirmar que se llevó a cabo una desinfección superficial completa del tejido y de esta manera se puede asumir que los microorganismos aislados son endófitos. Esta prueba puede realizarse mediante la impresión de la superficie esterilizada del tejido en un medio de cultivo o plateando en medios de cultivo una alícuota del agua del último lavado

realizado. Todo el proceso de esterilización superficial debe hacerse en condiciones de esterilidad, de preferencia en una campana de flujo laminar.

El triturado del tejido se puede realizar con mortero y pistilo estéril, licuadora u homogenizador Polytron. Sin embargo, el aislamiento de endófitos no sólo se realiza empleando la trituración de tejidos, también se puede hacer mediante la colocación de pequeños y delgados segmentos de tejido en medios de cultivo (Hallman et al., 2006).

Los medios de cultivo empleados son un punto importante en el aislamiento de endófitos ya que éstos pueden generar cierto sesgo en los microorganismos aislados (Reiter et al., 2003). Los medios de cultivo frecuentemente utilizados son los que permiten el crecimiento de un amplio rango de bacterias entre ellos destacan Agar Soya-Triptona (TSA), también están aquellos que permiten el crecimiento de microorganismos que requieren bajos niveles de nutrimentos como el medio R2A; medios nutritivos con extracto de levadura para el crecimiento de bacterias, medios para organismos específicos como King's B para *Pseudomonas* o medios sin fuente de nitrógeno para el crecimiento de microorganismos diazótrofos (Gyaneshwar et al., 2001; Estrada de los Santos et al., 2001; Martínez et al., 2003; Shi et al., 2010). También se pueden emplear medios con celulosa, quitina o pectina para microorganismos con actividades de enzimas líticas. En algunos casos la adición de antibióticos, fungicidas o nutrimentos específicos a los medios de cultivo estimulan o suprimen el crecimiento de algunos microorganismos.

La utilización de vacío o presión para coleccionar fluidos de las raíces es un método alternativo en el aislamiento de endófitos. El empleo de estos métodos permite la recolección de organismos presentes en los vasos conductores de los fluidos de la raíz, así como de los espacios intercelulares adyacentes a éstos pero no aquellos que pudieran estar intracelularmente. Mediante este método se obtienen menos bacterias que empleando la trituración pero se pueden recuperar en un mayor número aquellos microorganismos poco representados dando como resultado índices de riqueza y diversidad más altos (Hallman et al., 2006)

La caracterización de los endófitos se puede llevar a cabo empleando pruebas bioquímicas y fenotípicas, galerías basadas en el uso de fuentes de carbono como API o Biolog o a través del análisis de la composición de ácidos grasos (FAME) (Kirk et al., 2004). Actualmente, se recurre al aislamiento de ADN seguida de la amplificación y secuenciación de genes ribosomales así como la comparación de estas secuencias para la identificación de los microorganismos.

El empleo de un enfoque dependiente de cultivo sigue siendo vigente ya que permite la manipulación de los microorganismos para realizar ensayos de localización en la planta, re-inoculación del hospedero, manipulación genética de los microorganismos y la producción de algún producto microbiano a una escala industrial, lo cual es una ventaja si se piensa en los endófitos como un posible bioinoculante o agente de biocontrol.

Los métodos dependientes de cultivo como el conteo de colonias en placa presentan una desventaja al subestimar el número de microorganismos diferentes aislados, además estos métodos no registran aquellas células viables no cultivables (CVNC) como son los biotrofos obligados y microorganismos con requerimientos de crecimiento no conocidos. Los cuales pueden ser detectados y analizados utilizando métodos de biología molecular a partir de ADN de los tejidos vegetales.

El análisis de la diversidad de bacterias endófitas mediante el empleo de un **método independiente de cultivo** parte de la amplificación del gen ribosomal a partir de una muestra de ADN del tejido a analizar previamente lavado; del empleo de técnicas como el DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), el TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) (Spiegelman, 2005; Van Overbeek et al., 2006), T-RFLP's (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) o bien la creación de librerías del 16S rADN o rARN (Hallman et al., 2006; Ryan et al., 2008). La amplificación de los genes ribosomales se realiza usando oligonucleótidos universales (Weisburg et al., 1991) o específicos para un grupo bacteriano en particular. Posteriormente, se pueden secuenciar los productos de amplificación del gen ribosomal y compararlos con la base de datos para identificar los microorganismos. El desarrollo de las nuevas tecnologías como la

pirosecuenciación ha permitido el análisis de la diversidad de endófitos bacterianos con un enfoque independiente de cultivo (Manter et al., 2010).

Las limitaciones del empleo de los métodos independientes de cultivo son que pueden existir sesgos provocados por el método de aislamiento de ADN genómico, por la amplificación de la PCR dependiendo de los *primers* utilizados y por el número de copias de los genes ribosomales que presenta cada especie bacteriana (Miller et al., 1999; Sun et al., 2008). Las secuencias obtenidas a partir de una librería de 16S rADN generan información sobre la estructura de la comunidad pero no sobre la actividad metabólica de los miembros de la comunidad ni qué función están desempeñando dentro de ésta. La elaboración de librerías basadas en ARN o el uso de técnicas como DNA-Based Stable Isotope Probing (SIP) generan información sobre los individuos que están fisiológicamente activos dentro de la comunidad (Sun et al., 2008; Uhlik, 2009; Rasche et al., 2009)

Algunos estudios de la diversidad de endófitos se han realizado empleando ambos métodos dependientes e independientes de cultivo y se considera que son complementarios (Berg et al., 2005a; Sessitsch et al., 2004; Reiter et al., 2002). En algunos casos muestran diferencias en cuanto a la diversidad de bacterias obtenidas; por ejemplo, en un estudio de papa se demostró que algunos grupos bacterianos como *Bacillus* y *Staphylococcus* no se localizaron mediante métodos independientes de cultivo, los cuales podrían estar en forma de esporas en las plantas además de considerar que el proceso de lisis para aislar el ADN no fue eficiente para estos grupos (Reiter et al., 2002)

Un punto importante del estudio de los endófitos es el comprobar que éstos son capaces de colonizar el interior de las plantas. La visualización de las bacterias endófitas en el interior de la planta se ha realizado utilizando técnicas como el marcaje de cepas con un gen reportero *gusA* o con un gen que codifica para la proteína verde fluorescente (*gfp*) e inclusive realizando microscopía electrónica para validar la colonización (Liu et al., 2006; Bloemberg y Camacho Carvajal, 2006; Hallman et al., 2006). Otro método empleado es rastrear bacterias y seleccionarlas en base a su resistencia a antibióticos.

La genómica de los endófitos.

En los últimos cinco años, los reportes sobre genomas de bacterias endófitas se han incrementado. Hasta el momento 11 genomas han sido secuenciados: *Azoarcus* sp. BH72, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, *Azospirillum brasilense* B510; *Enterobacter* sp. 638, *Methylobacterium populi* BJ001, *Pseudomonas putida* W619, *Stenotrophomonas maltophilia* R551-3, *Serratia proteomaculans* 568, *Klebsiella pneumoniae* 342, aunque sólo 5 han sido reportados como genomas completos (Tabla 2). Todos los genomas secuenciados son de bacterias gram negativas y la mayoría pertenecen a la división gamma-Proteobacteria aunque también hay alfa y beta-Proteobacteria. En general, los genomas presentan tamaños entre 3.9 Mb hasta 7.6 Mb y están compuestos de 1 a 7 replicones de diferentes tamaños. Tienen de 4 a 9 operones de genes ribosomales y alrededor de 55-88 tARNs, la mayoría en el cromosoma. En estos genomas se encuentran pocas secuencias de inserción lo que sugiere que esto podría denotar una adaptación a un estilo de vida más estable con la excepción de *G. diazotrophicus* PAL5 y *A. brasilensis* B510 que tiene 223 y 280 secuencias de inserción respectivamente (Bertalan et al., 2009; Kaneko et al., 2010).

Tabla 2. Características de los genomas secuenciados de bacterias endófitas.

	<i>Azoarcus</i> sp. HB72	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5	<i>Azospirillum brasilense</i> B510	<i>Enterobacter</i> sp. 638	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 342
Tamaño del genoma	4.3 Mb	3.9 Mb	7.6 Mb	4.6 Mb	5.9 Mb
Número de replicones	1	3	7	2	3
tARN's	56	55	79		88
rARN's	4	4	9		6
Secuencias de Inserción		223	280	8	19
Flagelo	SI	SI	SI	SI	SI
SST IV	NO	SI	SI		SI
Pili tipo IV	SI			SI	SI
SST III	NO			NO	NO
Quorum Sensing (QS)	NO	SI			
Quimiotaxis	SI	SI	SI	SI	SI
Fijación de nitrógeno	Si	SI	SI	NO	SI
Acido indol acético		SI	SI	NO	
Acetoína		SI		SI	
Antimicrobianos		SI		SI	SI
ACC desaminasa	NO		SI	NO	NO
Enzimas líticas	SI	SI		SI	SI
Metales pesados	NO	NO	NO	SI	NO

En cuanto a las características que tienen en relación con la interacción planta-microorganismo se denota la presencia de muchos transportadores lo que les permite tener un rango amplio de utilización de fuentes de carbono, también hay genes presentes para la adhesión como adhesinas, la presencia de flagelo y el pili tipo IV. Algunos tienen genes para sistema de Quorum Sensing (QS) pero en *Azoarcus* este sistema está ausente (Krause et al., 2006). El sistema de secreción tipo III está ausente en los genomas de *Azoarcus* sp. BH72, *Enterobacter* sp. 638 y en *Klebsiella pneumoniae* 342 (Krause et al., 2006; Taghavi et al., 2010; Fouts et al., 2008) pero hay genes para quimiotaxis y de enzimas líticas como celulasas o glucanasas dependiendo del microorganismo. También están presentes sistemas de defensa contra microorganismos, así como las especies reactivas de oxígeno (ROS) en *K. pneumoniae*, *Enterobacter* y *G. diazotrophicus* (Taghavi et al., 2010; Fouts et al., 2008; Bertalan et al., 2009). En particular, *G. diazotrophicus* PAL5 presenta una maquinaria para tolerar pH ácidos y un sistema para la osmorregulación (Bertalan et al., 2009). En los genomas de estas bacterias también están presentes genes que promueven la salud o el crecimiento de la

planta como genes de fijación de nitrógeno. *Enterobacter* sp. 638 no tiene genes de fijación de nitrógeno pero sí genes para la síntesis de moléculas que promueven el crecimiento como el ácido indol acético (AIA) o la acetoina. Además, tiene genes que producen compuestos antimicrobianos o antifúngicos y también genes para la resistencia a metales pesados, estos últimos relacionados con el origen de su aislamiento (Taghavi et al., 2009; 2010).

La mayoría de los genes muestran las capacidades de cada microorganismo para establecer la asociación con las plantas, pero también hay genes que todavía no tienen función conocida. Los genomas de estos endófitos abren la posibilidad de realizar experimentos de transcriptómica, proteómica o metabolómica con el fin de entender mejor las interacciones planta-endófito mutualista. La secuenciación masiva abre la posibilidad de que se incremente el número de genomas conocidos de bacterias endófitas; falta por saber si existe un *core* genómico que determina el ser endófito, además de analizar si algunas de las características presentadas también están en endófitos gram positivos.

HIPOTESIS

Ya que las semillas de frijol son un nicho único se encontrarán nuevas especies de bacterias endófitas aisladas de frijol con potencial biotecnológico

OBJETIVOS

Objetivo General.

- Determinar y comparar la diversidad de bacterias endófitas provenientes de las semillas de los cultivares de *Phaseolus vulgaris* BAT 477, DOR 364, BAT 477 Nod⁻ y Negro Jamapa, en diferentes etapas del crecimiento.

Objetivos específicos.

- Aislar las bacterias presentes en los cultivares de frijol en diferentes estadíos de crecimiento.
- Caracterizar molecularmente las bacterias y comparar las poblaciones de bacterias endófitas de los cultivares de frijol.
- Determinar si los aislados presentan actividades benéficas para las plantas.

ARTICULO

Phaseolus vulgaris seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as *Rhizobium endophyticum* sp. nov.

MATERIALES Y METODOS DE RESULTADOS COMPLEMENTARIOS.

Crecimiento de plantas en condiciones gnotobióticas.

Las semillas de frijol Negro Jamapa se desinfectaron superficialmente con etanol al 70 % por 5 minutos, en hipoclorito de sodio al 1.5 % durante 15 minutos y posteriormente, se enjuagaron 8 veces consecutivas con agua destilada estéril, dicho proceso se llevó a cabo en condiciones de esterilidad. Las semillas estériles se colocaron en cajas Petri con agar-agua al 0.75 % y se incubaron a 28 °C durante 48 h.

Pasadas las 48 h., las plantas germinadas se colocaron en matraces de 250 ml conteniendo 220 ml de Fahraeus (Fahraeus, 1957) con agar al 0.75 % (Anexo), se colocó una planta por matraz. Se dejaron en oscuridad 48 h para permitir que las plantas etiolaran, después se les colocó un tapón de hule espuma para mantener la parte de la raíz en esterilidad. Las plantas crecieron en el cuarto de cultivo de plantas por 3, 12 ó 21 días a una temperatura de 28°C con un fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad.

Marcaje de una cepa de *Methylobacterium* con un gen reportero *gusA*.

Se realizó una cruce biparental con la cepa de *E. coli* como donadora, la cual presenta un vector suicida pFAJ1819A, y la cepa de *Methylobacterium* sp. CCGE 2054 como receptora. Las cepas fueron crecidas en medios LB y YM, respectivamente. Posteriormente, se resuspendieron cada una en 1 ml de agua, se tomaron 30 µl del cultivo de *E. coli* y 70 µl de la cepa de *Methylobacterium* en un tubo eppendorf y se mezclaron. Se colocaron 100 µl en una caja con PY y se incubó a 28 °C por 24 h.

Después de la incubación se resuspendió la cruce en 1 ml de agua y se realizaron diluciones seriadas desde 10^0 hasta 10^{-4} . Se platearon 100 µl de cada una de las diluciones en dos cajas de YM NaI₂₀ Nm₆₀ para seleccionar las transconjugantes ya que la cepa donadora no crece en ácido nalidixico.

Se picaron 150 colonias en medio YM NaI₂₀ Nm₆₀ X-Gluc para seleccionar aquellas colonias que expresaron de manera constitutiva el gen *gusA*. Se

seleccionaron 5 colonias que presentaron una expresión constitutiva y se estiraron 3 veces para colonia aislada obteniendo un cultivo puro de las colonias seleccionadas. Posteriormente, se inocularon las plantas de frijol para seleccionar aquellas colonias que expresaron el gen reportero en la planta.

Ensayos de inoculación de plantas de frijol.

Las semillas de frijol se esterilizaron de la manera ya mencionada. Las plantas germinadas se colocaron en matraces de 250 ml conteniendo 220 ml de Fahraeus (Fahraeus, 1957) con agar al 0.75 % teniendo una planta por matraz. La cepa de *Methylobacterium* sp. CCGE 2054 marcada con el gen *gusA* (Mut29) creció en una caja con medio YM NaI₂₀ Nm₆₀ por 72 h. Se resuspendió en agua y se ajustó a una densidad óptica (D.O.) de 0.2 a 600 nm. Se inocularon 5 plantas con 500 µl del cultivo. Plantas sin inocular fueron los controles negativos. Las plantas se crecieron en el cuarto de cultivo de plantas por 20 días a una temperatura de 28 °C con un fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad.

En otro ensayo, se inocularon la cepa de *Methylobacterium* sp. CCGE 2054 o Mut29 y la cepa de *Rhizobium etli* CFN42 a una D.O. de 0.2 de la manera ya mencionada, solas y en co-inoculación.

Actividad β–glucuronidasa.

La expresión del gen *gusA* se midió mediante la actividad β–glucuronidasa. Las raíces de las plantas no inoculadas e inoculadas con la cepa de *Methylobacterium* sp. CCGE 2054 silvestre y marcada con el gen reportero *gusA* fueron cortadas de la planta al nivel de la corona de la raíz y se colocaron en viales de antibiótico de 25 ml. Se les agregó 5 ml de la solución para actividad β–glucuronidasa (Anexo). Los frascos se taparon con tapones de goma y se colocaron en una charola, la cual se cubrió con aluminio y se incubó a 37 °C por 24 h.

Las raíces se enjuagaron con buffer de fosfatos y se fijaron con etanol al 70%. Se observaron las raíces en el microscopio estereoscópico.

Reducción de acetileno.

La raíz de cada planta se colocó en un frasco de vidrio de 30 ml. Posteriormente, se selló el frasco con un tapón de hule y se extrajo un volumen de 0.6 ml de aire que se sustituyó por un volumen igual de acetileno con la ayuda de una jeringa. Las muestras se incubaron por 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se analizó la presencia de etileno mediante un cromatógrafo de gases Varian.

Aislamiento de cepas de *Methylobacterium* a partir de nódulos.

Nódulos pequeños y grandes se esterilizaron superficialmente con un lavado de etanol 100 % por 1 minuto, un lavado de hipoclorito de sodio al 1.5 % por 1.5 o 3 minutos según el tamaño de los nódulos y después se realizaron ocho lavados con agua tridestilada estéril. Se realizó una prueba de esterilidad de superficie del nódulo en un extremo de la caja Petri con medio YM antes de ser aplastado. Las cajas se incubaron por 5 días a 28 °C.

Las cepas obtenidas de los nódulos se estriaron en medio YM para colonia aislada para obtener cultivos puros.

Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) PCR.

El ADN aislado de las cepas obtenidas a partir de los nódulos se diluyó 1:10 y se utilizó 1 µl para realizar un REP-PCR utilizando los *primers* ERIC1 y ERIC2 (Versalovic et al., 1994), también se amplificó el ADN de la cepa que se inoculó. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

Primer ERIC1 (20 pMol)	1 µl
Primer ERIC2 (20 pMol)	1 µl
dNTP's (10 mM)	3.1 µl
MgCl ₂ (50 mM)	3.8 µl
Buffer 10X	2.5 µl
DMSO	2.5 µl
ADN (1:10)	2 µl
Taq polimerasa (5 U/ µl)	0.2 µl

Amplificación y filogenia del 16S ribosomal

Se amplificó un fragmento de aproximadamente 1500 pb del gen 16S ribosomal de algunas cepas de los endófitos provenientes del hipocótilo con los oligonucleótidos fD1 y rD1 (Weisburg, 1991) bajo las siguientes condiciones:

Condiciones de la PCR del 16S ribosomal.

Primer fD1 (10 pMol.)	1 μ l
Primer rD1 (10 pMol.)	1 μ l
dNTP's (10 mM)	0.8 μ l
MgCl ₂ (50 mM)	3 μ l
Buffer 10X	10 μ l
ADN (1:10)	1 μ l
Taq polimerasa (5 U/ μ l)	0.5 μ l
H ₂ O	<u>82.7</u> μ l
	100 μ l

Programa de la PCR para el 16S ribosomal.

94 °C	3 minutos	1 ciclo
30 ciclos de...		
94 °C	1minuto	
57 °C	1minuto	
72 °C	2 minutos	
72 °C	5 minutos	1 ciclo

Los productos de la PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio. Posteriormente, se limpiaron con el kit *High Pure PCR Product Purification Kit* de Roche (No. Cat. 11 732 676 001) y se mandaron a secuenciar a Macrogen Co. (Corea).

Las secuencias se concatenaron y limpiaron manualmente utilizando el programa BioEdit 2.0 y posteriormente se alinearon con el software Clustal W. Se

realizaron árboles filogenéticos utilizando MEGA mediante el modelo Neighbor-Joining y el método Tamura-Nei con 1000 pseudoréplicas.

RESULTADOS COMPLEMENTARIOS

***Methylobacterium* como endófito.**

Con la finalidad de mostrar visualmente que uno de los aislados obtenidos era endófito, se realizó un marcaje de la cepa de *Methylobacterium* CCGE 2054 mediante una cruce biparental. Se obtuvieron en promedio 120 colonias por caja en la dilución 10^{-4} del ploteo de la cruce; de estas cajas se escogieron aleatoriamente 150 colonias para sembrarlas en cajas con medio YM Na₂0 Nm₆₀ X-Gluc y seleccionar las colonias que expresaran el gen *gusA*. Diez colonias dieron resultado positivo aunque no todas presentaban un mismo nivel de expresión. De estas 10 se tomaron 4 colonias en las que se analizó la expresión del gen *gusA* en planta. Una mostraba una expresión bastante fuerte, la cual se denominó Mut29, el resto tenía una expresión moderada y baja. La colonización de la raíz por esta bacteria fue evaluada y se observó que colonizaba la superficie y los vasos del xilema de las raíces de frijol (Fig. 1).

Posteriormente, se evaluó el posible efecto en la fijación de nitrógeno cuando se inoculó con *Methylobacterium* Mut29 y *R. etli* CFN42. Se observó que el número de nódulos en las plantas inoculadas únicamente con *R. etli* CFN42 era mayor en un 32 % que con la co-inoculación, cabe señalar que los nódulos de las plantas inoculadas con *R. etli* CFN42 fueron pequeños y aparentemente no todos eran activos. Sin embargo, en cuanto a la fijación de nitrógeno hubo un incremento del 8.2 % utilizando la co-inoculación respecto a la inoculación individual de *R. etli*, pero este incremento sutil no fue significativo. La colonización fue evaluada y se observó que aproximadamente el 1 % de los nódulos pequeños y blancos presentaban una coloración ligeramente azul en su interior (Fig. 1). Dicha coloración no se observó en plantas que sólo habían sido inoculadas con *R. etli* CFN42 ni en aquellas inoculadas con la cepa silvestre de *Methylobacterium*. Se realizó una cruce biparental entre la cepa Mut29 y *R. etli* CFN42 para evaluar la posibilidad de transferir el vector a *R. etli*. Se observó que no era posible que el transposón se hubiera transferido de una cepa a la otra por lo que todo indicaba que era Mut29, cepa que daba una señal azul en el interior de los nódulos.

Se aislaron algunas cepas de *Methylobacterium* CCGE 2054 a partir de los nódulos obtenidos por la co-inoculación de esta cepa y de *R. etli* CFN42; al realizarles una PCR con los *primers* ERIC1 y ERIC2 mostró que era la misma cepa que se había inoculado, CCGE 2054, por lo que concluimos que en el interior de algunos nódulos se encontraba *Methylobacterium*.

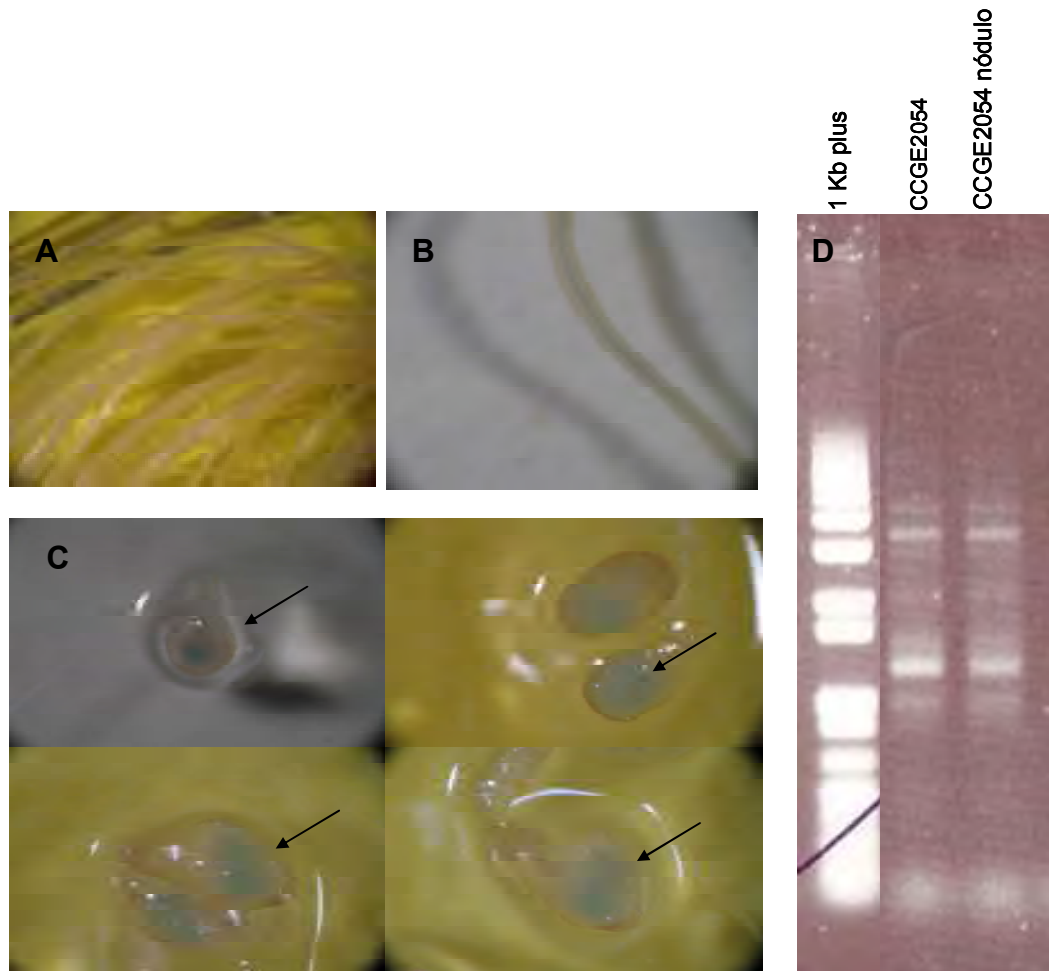


Fig. 1. Colonización de raíces de frijol por la cepa CCGE 2054 marcada con el gen reportero *gusA* (Mut29). Raíces inoculadas con la cepa silvestre CCGE 2054 **A**; colonización del interior de la raíz por Mut29 **B**; colonización de nódulos cuando Mut29 se co-inocula con *Rhizobium* CFN42, las flechas señalan la coloración azul dentro del nódulo **C**. Patrón de ERIC's de la cepa CCGE 2054 inoculada y recuperada de nódulo **D**.

Endófitos del xilema.

Se obtuvieron 100 aislados, de los cuales se seleccionaron al azar 40 aislados para extraer el ADN y secuenciar. Se recuperaron bacterias de los grupos

α , β y γ -Proteobacteria, Firmicutes y *Deinococcus*, siendo α -Proteobacteria el grupo más abundante con un 76 % de los aislados analizados, seguido por γ -Proteobacteria y Firmicutes con un 8 % cada uno y finalmente β -Proteobacteria y *Deinococcus* con un 4 % respectivamente. La mayor parte de los aislados provinieron del cultivar Negro Jamapa, sólo 16 aislados se obtuvieron a partir de BAT 477 y un aislado de DOR 364. Los controles de desinfección superficial no mostraron crecimiento bacteriano, lo que indica que el proceso de desinfección fue eficiente y sugiere que las colonias obtenidas provienen de las semillas de frijol crecidas en esterilidad. Los aislados pertenecen a los géneros *Sphingomonas*, *Brevundimonas*, *Methylobacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Deinococcus*, *Staphylococcus* y *Achromobacter*, siendo *Sphingomonas* el género más abundante. A partir del hipocótilo se recuperaron géneros que no habían sido recuperados en tejidos analizados anteriormente (raíz y semillas inmaduras) entre ellos están *Pseudomonas*, *Deinococcus* y *Achromobacter*.

Endófitos de la mutante BAT 477 Nod⁻.

Semillas de frijol de la mutante no nodulante (Nod⁻) del cultivar BAT 477 fueron esterilizadas y crecidas bajo las mismas condiciones que se mencionan en el artículo. Se analizaron solamente las raíces de plantas de 3 y 12 días. No se obtuvieron semillas inmaduras como en el caso de BAT 477 y DOR 364. Se obtuvieron 61 aislados a partir de 7 plantas; se obtuvieron 43 aislados de raíces de 12 días mientras que 18 fueron de raíces de 3 días. Se secuenciaron algunos de los aislados de manera aleatoria y el análisis de las secuencias muestra la presencia de bacterias de los géneros *Bacillus*, *Brevundimonas*, *Staphylococcus* y *Lysobacter*.

DISCUSIÓN

Las bacterias asociadas a plantas pueden localizarse sobre la superficie de la raíz y de las hojas (rizosféricas y epífitas) o en el interior de los tejidos, estas últimas son conocidas como endófitas y han sido el objeto de estudio en este trabajo. En frijol encontramos bacterias en el interior de las raíces, en semillas inmaduras y en vasos del xilema. El análisis de la diversidad de endófitos asociadas al frijol permitió la identificación de bacterias de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Methylobacterium*, *Acinetobacter*, *Kocuria*, *Leptothrix*, *Micrococcus*, *Streptomyces*, *Janibacter*, *Cohnella*, *Phyllobacterium* y *Rhizobium*. Miembros de los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus* han sido reportados como endófitos de papa, café, maíz y trébol (Berg et al., 2005; Vega et al., 2005; Rijavec et al., 2007; Sturz et al., 1997). Además se han reportado cepas de *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. mycoides*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *P. polymyxa*, *P. azotofixans* como promotores del crecimiento de las plantas (Mc Spadden Gardener 2004). Ding y colaboradores (2005) analizaron la capacidad de fijar nitrógeno de aislados de *Bacillus* y *Paenibacillus* rizosféricos y encontraron que algunas cepas reducen acetileno y presentan los genes de nitrogenasa entre ellas está *B. megaterium*, *B. cereus* y *P. massiliensis*. En este trabajo no se evaluó la fijación de nitrógeno en los endófitos debido a que la asociación *Rhizobium*-leguminosa tiene un aporte mayor de nitrógeno a la planta que lo que los endófitos pudieran dar. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que algunos de ellos pudieran estar realizando la fijación de nitrógeno.

Diferentes especies de *Methylobacterium* se obtuvieron del frijol; los cuales podrían corresponder a nuevas especies (datos no mostrados). Es interesante que cada cultivar presentó diferentes especies de *Methylobacterium*. Anteriormente este género se ha reportado asociado a plantas: *Methylobacterium populi* fue aislado de árboles de álamo (van Aken et al., 2004a; 2004b), *M. mesophilicum* a partir de soya y *M. radiotolerans*, *M. fujisawaense* y *M. oryzae* del arroz (Green y Bousfield, 1983; Madhaiyan et al., 2007).

Bacterias del género *Methylobacterium* han sido reportadas que estimulan la germinación de las semillas (Holland y Polacco, 1994), producen auxinas (Madhaiyan et al., 2006a), citocininas (Koenig et al., 2002; Madhaiyan et al., 2006a), vitamina B12 (Basile et al., 1985), algunas presentan actividad ACC desaminasa (Madhaiyan et al., 2006a, 2007), estimulan el sistema inmune de la planta y la nodulación (Madhaiyan et al., 2006b); estas funciones pueden contribuir a la promoción del crecimiento. Sin embargo, el experimento de co-inoculación de *R. etli* y *Methylobacterium* CCGE 2054 que se realizó no mostró efectos significativos de estimulación de la nodulación por la presencia de *Methylobacterium*. La obtención de una cepa de *Methylobacterium* con un gen reportero permitió evaluar la colonización en planta. La visualización de algunas bacterias de *Methylobacterium* en tejido vascular de raíces, así como la recuperación de éstas a partir de nódulo sugiere que podría ser un endófito de nódulo; sin embargo, no se conoce el mecanismo por el cual pudiera llevar a cabo dicha colonización.

Numerosos *Acinetobacter* se encontraron asociados a nódulos y tejidos de soya como endófitos y en la rizósfera de la fresa (Wong et al., 1986; Kuklinsky-Sobral et al., 2004; Berg et al., 2005b). Algunas cepas de *Acinetobacter* aisladas de la rizósfera del trigo producen auxinas y estimulan el crecimiento de la planta (Egamberdieva et al., 2008). Los aislados obtenidos de frijol están relacionados a *A. calcoaceticus*. Cinco de los aislados del cultivar BAT 477 y uno de DOR 364 fueron capaces de solubilizar fosfato, dato congruente con lo reportado en *Acinetobacter* aislado de soya (Kuklinsky-Sobral et al., 2004). Es interesante notar que el cultivar BAT 477, caracterizado por su capacidad de tolerar las deficiencias de fosfato en campo, posee un número mayor de endófitos capaces de solubilizar fosfato mineral. Es posible que endófitos como *Acinetobacter* contribuyan tanto a incrementar la nodulación como a solubilizar fosfato a nivel de campo.

Otros géneros han sido reportados como promotores del crecimiento o de la salud de la planta entre ellos está *Streptomyces*. Algunos endófitos de tomate y de papa del género *Streptomyces* fueron capaces de controlar hongos como *Fusarium oxysporum* (Cao et al., 2004; Sessitsch et al., 2004). En frijol, la cepa

CCGE 2242 presentó una capacidad importante de solubilización de fosfato mineral aunque no se evaluó su capacidad de producir metabolitos secundarios.

Algunos de los géneros encontrados en frijol como endófitos corresponden a bacterias que tienen la capacidad de formar esporas o bien resistir la desecación o altas temperaturas como lo son *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter* y *Methylobacterium*. Las semillas que se utilizaron para realizar los aislamientos tenían varios meses de almacenamiento por lo que el contenido de humedad era limitada si se compara con semillas recién obtenidas; estas condiciones pudieran favorecer un ambiente propicio para que persistan aquellos microorganismos capaces de soportar la desecación. Eso no significa que sólo deberían haber estado ese tipo de bacterias, también pudieron haber sobrevivido otros microorganismos pero sus poblaciones se vieron disminuidas. En reportes de endófitos de papa, de soya e inclusive arroz, las plantas analizadas provienen de campo y se encuentran frecuentemente bacterias de los géneros *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Pantoea* y *Stenotrophomonas* que son bacterias del suelo de vida libre y no forman esporas. Estos microorganismos deben de llevar a cabo un proceso de colonización de la planta para pasar a ser endófitas. Sería interesante analizar si en semillas de frijol crecidas en campo se encuentran este tipo de bacterias y si en el transcurso del tiempo su población disminuye al haber menos humedad en la semilla; de esta manera se podría explicar su ausencia en plántulas de tres días en condiciones gnotobióticas.

Se identificó al género *Rhizobium* como endófito de frijol. Anteriormente, se había reportado a *Rhizobium* no simbiótico en la rizósfera de frijol y por transferencia horizontal de la información simbiótica podían nodular y fijar nitrógeno (Segovia et al., 1991). La cepa CCGE 2052 fue capaz de nodular el frijol cuando adquirió el plásmido simbiótico de *R. tropici* CFN299 por conjugación. Como endófito se ha reportado a *Rhizobium* en plantas de arroz en campos con rotación de cultivo de leguminosas y en aquellos donde no existe rotación con frijol (Singh et al., 2006). También ha sido encontrado como endófito del maíz cuando éste es cultivado en el sistema de milpa (Gutiérrez-Zamora y Martínez-Romero, 2001), en caña de azúcar (Velázquez et al., 2008), en el álamo (Taghavi et al.,

2009), trébol rojo (Sturz et al., 1997) y soya (Ikeda et al., 2010). En trabajos anteriores en el laboratorio se había reportado la presencia de *Rhizobium etli* en semillas de frijol pero no en el interior de éstas (Pérez-Ramírez et al., 1998). El proceso de desinfección superficial de las semillas previo a la germinación fue evaluado y no se observó crecimiento de bacterias a partir de frijoles colocados en medio de cultivo ni tampoco del agua del último enjuague, esto sugiere que las bacterias aisladas se encontraban en el interior de las raíces. La secuencia del genoma de esta cepa permitirá conocer si presenta genes involucrados en la colonización, vías metabólicas, producción de metabolitos secundarios y de otras características comunes que se han reportado en genomas de otros endófitos. Además se podría conocer de manera más detallada los genes involucrados en el proceso de colonización endófito ya que no se sabe si están interviniendo genes del proceso de nodulación con leguminosas. Algunas otras cepas de rhizobia han sido reportados como endófitos de plantas de cereales y papa, entre ellos destacan *Bradhyrhizobium* y *Agrobacterium* (Garbeva et al., 2001; Zinniel et al., 2002; Kuklinsky-Sobral et al., 2004; Sturz et al., 2005)

En papa, caña de azúcar y soya (Reiter et al., 2002; Mendes et al., 2007; Kuklinsky-Sobral et al., 2004), se encontraron bacterias que se han reportado como patógenos oportunistas de humanos entre ellos encontramos *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*. Los aislados de *Staphylococcus* de frijol se relacionan con *S. epidermidis*, *S. pasteurii*, *S. warneri* y *S. haemolyticus*. *Staphylococcus saprophyticus* fue aislado como endófito a partir de zanahoria y también de la rizósfera de trigo (Surette et al., 2003; Egamberdieva et al., 2008). Alta resistencia a antibióticos y formación de biopelículas son características de *S. epidermidis* que ha sido aislado de pacientes en hospitales; se han reportado bacterias de *S. haemolyticus* de recién nacidos y de personas inmunodeprimidas (Takeuchi et al., 2005). No se tienen datos sobre la función de este tipo de bacterias en asociación con plantas, así como el posible riesgo en la salud que podría traer su presencia en productos vegetales para el consumo humano. Por lo cual, recomendamos trabajar los aislados de bacterias patógenas oportunistas de

humanos asociados a plantas con mucha precaución y de no contemplarlos como posibles inoculantes en la agricultura.

En chícharo, en maíz y en papa se encontraron poblaciones de endófitos asociadas a un cultivar específico (Elvira-Recuenco y van Vuurde, 2000; Rijavec et al., 2007; Manter et al., 2010). En este trabajo no se encontró especificidad por un cultivar, de alguna manera la variación individual influyó para no determinar asociaciones endófito-cultivar dependiente. No se encontraron poblaciones particulares de endófitos en los diferentes tejidos analizados con la excepción de una diversidad mayor de *Sphingomonas* en los aislados de xilema; por el contrario, en el estudio de los endófitos de papa si hubo especificidad de endófitos por tejido vegetal (Berg et al., 2005a). El análisis de los endófitos de una mutante de frijol mostró algunas diferencias al compararse con las semillas silvestres. En soya los genotipos afectados en nodulación ya sea hipernodulantes o carente de esta propiedad tenían poblaciones muy similares entre sí y diferentes al genotipo silvestre (Ikeda et al., 2010).

Endófitos de semilla.

Las bacterias tanto benéficas como patógenas al estar en el xilema pueden transportarse hasta las semillas. Sólo durante el último periodo de maduración de la semilla el flujo de xilema cesa y la semilla entra en periodo de desecación. Podríamos pensar que las bacterias quedan en los vasos del xilema “atrofiado”o que salen de éste hacia otras partes de la semilla, tal vez debajo de la testa. En las semillas se encuentra un número limitado de bacterias que fluctúa de una a varias decenas, éstas pueden ser combinaciones diferentes de bacterias heredadas. Se ha considerado que al coheredarse los simbioses (múltiples) se favorecen relaciones de cooperación entre ellos que son benéficas para el hospedero.

La falta de crecimiento en las pruebas de esterilidad sugiere que las bacterias obtenidas a partir de vainas cerradas son endófitos de la semilla y que además de la colonización de la raíz por bacterias del suelo, las bacterias en el frijol pudieran estar siendo transmitidas verticalmente como se sugiere también

para el arroz, maíz, eucalipto y café (Singh et al., 2006; Rijavec et al., 2007; Ferreira et al., 2008; Vega et al., 2005). En estas plantas se reportaron bacterias de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Enterococcus*, *Methylobacterium*, *Paracoccus*, *Frankia*, *Pantoea*, *Sphingomonas* y *Pseudomonas*. Algunos de estos géneros también se encontraron como endófitos de semillas inmaduras de frijol, además de *Kocuria*, *Micrococcus*, *Paracoccus* y *Arthrobacter*. Sin embargo, la ausencia de una prueba contundente de transmisión vertical como el recuperar una bacteria con un gen reportero o la visualización de las bacterias en la semilla no permite afirmarlo. Se realizó el seguimiento en plantas hasta la formación de semilla de *Methylobacterium* CCGE 2054 silvestre y con el gen reportero *gusA* (Mut29); sin embargo, no se recuperaron bacterias en los medios selectivos con antibiótico (datos no mostrados). Sería interesante tratar de recuperar en semillas inmaduras o recién cosechadas bacterias que fueron inoculadas para comprobar la transmisión vertical de los endófitos, mecanismo importante que no se ha probado a la fecha. Hasta el momento sólo se han visualizado en las semillas bacterias inoculadas pero no sabemos si a lo largo del tiempo éstas se mantienen (Ferreira et al., 2008).

Surgen muchas preguntas sobre los endófitos en semillas ¿Quedan las bacterias también en estado latente (esporas)?, ¿Con la germinación proliferan?, ¿Utilizan entonces las reservas de la semilla para crecer?, ¿Colonizan la superficie de la radícula dentro de la semilla para emerger con ella durante la germinación y proteger la superficie de la raíz naciente?, ¿Estas poblaciones son desplazadas por las que provienen de la rizósfera?. Al estar en la semilla podemos suponer que estas bacterias no requerirían los mecanismos de colonización necesarios de las bacterias que colonizan desde el exterior pero esto no se ha comprobado.

Se ha propuesto que las bacterias ayudan en la germinación. Es interesante notar que muchos de los bacilos, *Acinetobacter* y *Rhizobium* que aislamos de la semilla son fitasa positivos. El que bacterias del interior de semilla produzcan fitasas es una indicación de que éstas pudieran utilizar las materias de reserva de la semilla y tal vez ayudar a movilizarlas, en esto pudieran contribuir a la

germinación. La posibilidad de movilizar fitato por endófitos no ha sido considerada con anterioridad. Sería interesante probar mutantes en fitasas y evaluar la expresión de bacterias con genes reporteros en fitasa durante la germinación de semillas.

La degradación de fitato pudiera tener un valor en biotecnología. Muchos animales se alimentan con semillas y los animales monogástricos no pueden asimilar el fitato como consecuencia de esto tienen limitaciones en su ingesta de fósforo; semillas con un menor contenido de fitato pudieran tener un valor nutricional más adecuado.

Endófitos del xilema.

Básicamente, se han utilizado dos estrategias diferentes para aislar y cultivar las bacterias endofíticas. En una de ellas, con bombas de vacío se extrae el líquido del xilema el cual se cultiva en medios de laboratorio. Otra, la más común consiste en platear en medio de cultivo los triturados de raíces o tallos completos. La primera ha permitido el aislamiento de una diversidad de géneros bacterianos de caña de azúcar (Velázquez et al., 2008). La segunda estrategia es la más empleada, se obtienen bacterias de xilema pero también de espacios intercelulares. En este trabajo, se utilizó una metodología diferente, se analizaron los endófitos del xilema mediante el empleo de una sonicación indirecta de los hipocótilos del frijol, permitiendo que bacterias que se encontraban en los tubos del xilema fueran desprendidas y recuperadas. Es de destacar la presencia de una diversidad de *Sphingomonas* presentes en el xilema, además de un aislado de *Pseudomonas* y *Achromobacter*. Estos géneros presentan miembros que tienen la capacidad de estimular el crecimiento, de tener antagonismo contra hongos patógenos y de producir metabolitos secundarios con efectos de antibiosis (Sessitsch et al., 2004; Jha y Kumar 2009; Magnani et al., 2010). La evaluación de producción de metabolitos secundarios o de capacidad antagónica de estas bacterias podría ayudarnos a comprender la posible función que desarrollan en el xilema.

Podríamos preguntarnos si la composición de la savia del xilema pudiera depender de las bacterias que lo colonizan. Estas pudieran en buena medida ser las responsables de la producción de hormonas, de vitaminas, de otros metabolitos y de antimicrobianos. La estimulación de la defensa de plantas por bacterias es uno de los mecanismos de control biológico que no requieren grandes cantidades de bacterias, con sólo pocas bacterias se puede estimular la respuesta de defensa de las plantas. En el xilema, mediante microscopía de barrido se observó sólo números limitados de bacterias en microcolonias y tal vez cúmulos de bacterias. Siendo la savia del xilema tan pobre en nutrimentos es de esperar que el crecimiento bacteriano esté muy limitado; sin embargo, por xilema se transportan los ureidos producto de la fijación de nitrógeno de los nódulos.

Algunos hongos y bacterias patógenas de xilema son muy agresivos y las bacterias bloquean los vasos del xilema. Ya que los patógenos de xilema (hongos y bacterias) tienen efectos muy drásticos en mermar el rendimiento de cultivos de importancia agrícola, se han estudiado mucho más que las bacterias endofíticas. Como los endófitos y patógenos compiten por el mismo nicho, se ha considerado utilizar endófitos como una manera de controlar patógenos. Así se ha pensado en competir a la bacteria *Xylella fastidiosa*, que causa una importante infección en cítricos en Brasil, con *Methylobacterium*. Siguiendo esta línea de pensamiento se investigó y se obtuvieron decrementos en los daños causados por *Xylella fastidiosa* en plantas co-inoculadas con *Pseudomonas* en California, donde la bacteria ha causado pérdidas millonarias en los viñedos. La manipulación genética de *Pseudomonas* permitió obtener bacterias sobreproductoras de disruptores del factor DSF (Difussible Signal Factor) que afecta la virulencia de *Xylella* y de esta manera pudieron competir más eficientemente al patógeno (Newman et al., 2008).

Hay evidencia para suponer que los endófitos juegan de manera natural un papel de defensa contra patógenos, muchos pudieran producir antibióticos y fungicidas. La variación individual de plantas en respuesta a patógenos también pudiera estar incrementada por la variación en endófitos si ésta determina una diversidad de moléculas activas contra patógenos. La diversidad genética de los hospederos se potencializaría con la diversidad genética de los simbioses en la

resistencia a patógenos. Una ventaja selectiva para una población sería que los individuos tengan diferentes capacidades de producción de moléculas activas. El buscar en endófitos (tal vez en presencia de la planta) la producción de antibióticos y antifúngicos parece una perspectiva interesante a seguir. En Los Tuxtlas, Ver. existe un problema muy grave con los ataques de hongos en el cultivo del frijol, tal vez la inoculación con algunas de las bacterias obtenidas pudiera servir para controlar hongos patógenos del xilema (como *Fusarium*), muy abundantes en México.

Hasta la fecha no se conoce cómo los endófitos colonizan el xilema y tampoco se sabe qué genes de las bacterias participan en este proceso o qué genes se expresan una vez dentro del xilema, ésta es un área de investigación por explorar. Es de notar que bacterias patógenas del xilema como *Xylella fastidiosa* no tienen mecanismos para infectar por sí mismas y requieren de insectos para que los inyecten en xilema (Redak et al., 2004), no sabemos si algunas bacterias endófitas también hagan uso de vectores para su colonización.

Bacterias de plantas como modelo de otras simbiosis.

Recientemente, ha habido una explosión de publicaciones en simbiosis en una gran diversidad de organismos (Dethlefsen et al., 2007) y se reconoce que algunos simbioses (endosimbioses de insectos en especial) son indispensables para el desarrollo del hospedero.

Se considera que el entendimiento del microbioma humano requiere del conocimiento de otras simbiosis y se ha reconocido la necesidad de enriquecer la investigación de muy diversas simbiosis. Los microbiomas de las plantas al igual que el de los humanos son complejos y dependen del órgano y sitio. Al igual que en humanos, los microbiomas de plantas pueden participar en proveer nutrimentos, degradar xenobióticos, inhibir patógenos o inducir mecanismos de defensa en sus hospederos.

Se ha sugerido que la simbiosis mejor estudiada de plantas (*Rhizobium*-leguminosa) pudiera servir como un modelo de estudio de las simbiosis en humanos que arroje indicios de los mecanismos de la interacción simbiótica, sin

embargo, la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa es una simbiosis intracelular con un alto grado de especialización. La simbiosis de bacterias rizosféricas y tal vez también las del xilema pudieran ser una mejor referencia en el estudio de las simbiosis intestinales de humanos.

La raíz y el intestino son medios de transporte de nutrimentos del exterior con bacterias que los transforman y determinan en buena parte lo que pasa al organismo. La raíz y el xilema tienen, al igual que el intestino, una estructura que aumenta la superficie que podría ser colonizada por bacterias; sin embargo, el contenido de bacterias en xilema es mucho menor que en intestinos, y el xilema es muy pobre en nutrimentos. Por el xilema se transportan nutrimentos como aminoácidos, azúcares (pero en menor concentración que en el floema), ácidos orgánicos, hasta proteínas, además de minerales y agua.

No hay planta sin bacterias rizosféricas o sin bacterias endofíticas, no hay intestinos sin bacterias en condiciones naturales. Existe variación en las comunidades bacterianas en los hospederos, de especie a especie y de un individuo a individuo, pero también hay especies y géneros comunes, tanto de endófitos como de simbiosis intestinales que pudieran clasificarse como generalistas o especialistas.

A pesar de platear muestras muy diluidas de endófitos y recuperar un número pequeño de bacterias por caja, en algunos casos hemos observado que una sola colonia no está constituida por una sola especie, sino al parecer son consorcios bacterianos difíciles de separar también reconocidos como co-agregados, especialmente observados en las bacterias de la boca de los humanos (Filoche et al., 2010). El estudio de estos consorcios de los endófitos de plantas arrojará información valiosa sobre cómo se estructuran las comunidades bacterianas en plantas.

Las comunidades bacterianas asociadas a plantas y de intestino por su complejidad pudieran ser refractarias a la colonización por otras bacterias (resistencia). Sin embargo, tanto el intestino como el xilema pueden ser invadidos por nuevas bacterias y las infecciones con patógenos en xilema llevan a deshidratación y síntomas de sequía en plantas; los patógenos del xilema e

intestino pueden producir toxinas que pasan al organismo. Existe el interés de controlar estos patógenos con probióticos o bacterias endofíticas promotoras del crecimiento vegetal. Las bacterias del intestino juegan un papel determinante en la diferenciación del intestino, esto no se ha explorado en el caso de la simbiosis de xilema y sus bacterias pero sí se sabe que interacciones con bacterias estimulan respuestas de defensa en las plantas.

En plantas, las bacterias se encuentran en las semillas pero también pueden adquirirse del suelo. Esta adquisición mixta hará difícil el poder controlar las poblaciones endofíticas en plantas. Una consideración semejante se ha hecho sobre la posibilidad de manipular las poblaciones intestinales de los humanos.

CONCLUSIONES

El frijol al igual que otras plantas presenta en raíces y en semillas inmaduras una gran diversidad de bacterias endofíticas. Dentro de esta gran diversidad existen géneros de bacterias rizosféricas con capacidades de promoción del crecimiento, así como géneros de bacterias patógenas oportunistas de humanos, además de posibles nuevas especies.

La variación individual en las poblaciones endófitas de frijol es grande y no permite determinar la presencia de cepas específicas asociadas a los diferentes cultivares analizados. Además, el genotipo mutante de frijol no mostró diferencias significativas en la composición de los endófitos respecto al genotipo silvestre.

La cepa no simbiótica CCGE 2052 de *Rhizobium* aislada a partir del frijol es un taxa cercano a *R. tibeticum* y *R. gallicum* con características fenotípicas que las distinguen de éstas y se propuso como una nueva especie denominada *R. endophyticum* en relación con su origen.

En el xilema están presentes bacterias endófitas. Existen algunas diferencias entre la composición de los endófitos de raíz, semilla inmadura y xilema; por ejemplo, la presencia de una gran diversidad de *Sphingomonas* en este último es notoria.

La capacidad de solubilizar fosfato mineral y fitato por algunas bacterias endofíticas abre la posibilidad de explorar la función que éstas estuvieran desarrollando dentro de las semillas así como su aplicación como inóculo en un futuro.

El empleo de la conjugación bacteriana para introducir un plásmido con un gen reportero es una metodología eficiente para el marcaje de cepas de

Methylobacterium que permite monitorear y visualizar la colonización de la planta por bacterias y de esta manera comprobar la naturaleza endófito de los aislados.

En frijol, el empleo de la co-inoculación de *Methylobacterium* CCGE 2054 y *Rhizobium* no tiene efectos significativos en el incremento de la nodulación ni en la fijación de nitrógeno.

PERSPECTIVAS.

Analizar la capacidad antagónica de los endófitos del xilema, así como la capacidad de producir metabolitos secundarios con el objetivo de poder entender la posible aportación de estos endófitos a la planta.

Analizar y comparar el genoma de *R. endophyticum* CCGE 2052 con otros genomas de endófitos, así como con genomas de cepas simbióticas de *Rhizobium* para poder entender su naturaleza endofítica y encontrar posibles genes involucrados en la asociación endófito-planta.

Analizar el mecanismo por el cual *Methylobacterium* coloniza el interior de una porción pequeña de los nódulos de frijol cuando se co-inocula con *Rhizobium*.

Comprobar de manera visual si bacterias endofíticas de frijol de otros géneros tienen la capacidad de recolonizar la planta cuando se inoculan y si pueden ser transferidas verticalmente entre una generación y otra.

REFERENCIAS

Ahlholm J U, Helander M, Lehtimäki S, Wäli P, Saikkonen K. 2002. Vertically transmitted fungal endophytes: different responses of host-parasite systems to environmental conditions. *OIKOS*. 99: 173-183.

Andreote F D, Rocha U N, Araújo W L, van Overbeek L S. 2010. Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). *Antonie Van Leeuwenhoek*. 97: 389-399.

Araújo A P, Teixeira M G, de Almeida D L. 1998. Variability of traits associated with phosphorus efficiency in wild and cultivated genotypes of common bean. *Plant Soil*. 203: 173-182.

Araújo W L, Marcon J, Maccheroni W, Jr, van Elsas J D, van Vuuder J W and Azevedo J L. 2002. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Appl Environ Microbiol*. 68: 4906-4914.

Asraful Islam S M, Math R K, Kim J M, Yun M G, Cho J J, Kim E J, Lee Y H, Yun H D. 2010. Effect of plant age on endophytic bacterial diversity of ballon flower (*Platycodon grandiflorum*) root and their antimicrobial activities. *Curr Microbiol*. DOI 10.1007/s00284-010-9618-1

Bacilio-Jiménez M, Aguilar-Flores S, Ventura-Zapata E, Pérez-Campos E, Bouquelet S and Zenteno E. 2003. Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on chemiotactic response of endophytic bacteria. *Plant Soil*. 249: 277-277.

Barac T, Taghavi S, Borremans B, Provoost A, Oeyen L, Colpaert J V, Vangronsveld J, van der Lelie D. 2004. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile organic pollutants. *Nat Biotechnol*. 22: 583-588

Basile D V, Basile M R, Li Q-Y, and Corpe W A. 1985. Vitamin B12-stimulated growth and development of *Jungermannia leiantha* Grolle and *Gymnocolea inflata* (Huds.) Dum. (Hepaticae). *Bryologist*. 88: 77-81

Beebe S, Lynch J, Galwey N, Thome J, Ochoa I. 1997. A geographical approach to identify phosphorus-efficient genotypes among landrace and wild ancestors of common bean. *Euphytica*. 95: 325-336.

Benhamou N, Kloepper J W, Quadts-Hallman A, Tuzun S. 1996. Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. *Plant Physiol*. 112:919-929.

Berg G, Krechel A, Ditz M, Sikora R A, Ulrich A and Hallmann. 2005a. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiol Ecol.* 51: 215-229.

Berg G and Hallmann J. 2006. Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes. In *Microbial root endophytes*. Schultz, B. J. E., Boyle, C. J. C. and Sieber T. N. (eds). Springer, Germany, pp.53-66.

Berg G, Eberl L and Hartmann A. 2005b. The rhizosphere as reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environ Microbiol.* 7: 1673-1685

Bertalan M, Albano R, de Pádua V, Rouws L, Rojas C, Hemerly A, Teixeira K, Schwab S, Araujo J, Oliveira A, França L, Magalhães V, Alquéres S, Cardoso A, Almeida W, Loureiro M M, Nogueira E, Cidade D, Oliveira D, Simão T, Macedo J, Valadão A, Dreschsel M, Freitas F, Vidal M, Guedes H, Rodrigues E, Meneses C, Brioso P, Pozzer L, Figueiredo D, Montano H, Junior J, de Souza Filho G, Martin Quintana Flores V, Ferreira B, Branco A, Gonzalez P, Guillobel H, Lemos M, Seibel L, Macedo J, Alves-Ferreira M, Sachetto-Martins G, Coelho A, Santos E, Amaral G, Neves A, Pacheco AB, Carvalho D, Lery L, Bisch P, Rössle S C, Urményi T, Rael Pereira A, Silva R, Rondinelli E, von Krüger W, Martins O, Baldani J I, Ferreira PC. 2009. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. *BMC Genomics.* 10: 450.

Bloemberg G V and Camacho Carvajal M M. 2006. Microbial Interactions with plants: a hidden world? In *Microbial root endophytes*. Schltz B J E Boyle C J C and Sieber T N (eds). Springer, Germany pp.321-335.

Böhm M, Hurek T, Reinhold-Hurek B. 2007. Twitching motility is essential for endophytic rice colonization by the N₂-fixing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Mol Plant Microbe Interact.* 5: 526-533.

Burch G and Sarathchandra U. 2006. Activities and survival of endophytic bacteria in white colver (*Trifolium repens*). *Can J. Microbiol.* 52: 848-856.

Cao L, Qiu Z, You J, Tan H and Zhou S. 2004. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lypersicon esculentum*) roots. *Lett Appl Microbiol.* 39: 425-430.

Cao L, Qiu Z, You J, Tan H, Zhou S. 2005. Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of *Fusarium* wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. *FEMS Microbiol Lett.* 247: 147-152.

Castellanos J Z, Peña-Cabriales J J, Acosta-Gallegos J A. 1996. 15N-determined dinitrogen fixation capacity of common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars under water stress. *J Agri Sci.* 126: 327-333.

Chakraborty U, Chakraborty B, Basnet M. 2006. Plant growth promotion and induction of resistance in *Camellia sinensis* by *Bacillus megaterium*. J Basic Microbiol. 46: 186-95.

Chanway C P. 1996. Endophytes: they're not just fungi! Can J Bot. 74: 321-322.

Cho K M, Hong S Y, Lee S M, Kim Y H, Kahng G G, Lim Y P, Kim H, Yun H D. 2007. Endophytic bacterial communities in ginseng and their antifungal activity against pathogens. Microbial Ecol. 54: 341-351.

Cho S J, Lim W J, Hong S Y, Park S R, Yun H D. 2003. Endophytic colonization of Balloon Flower by antifungal strain *Bacillus* sp. CY22. Biosci Biotechnol Biochem. 67: 2132-2138.

Cho S J, Park S R, Kim M K, Lim W J, Ryu S K, An C L, Hong S Y, Lee Y H, Jeong S G, Cho Y U and Yun H D. 2002. Endophytic *Bacillus* sp. isolated from the interior of Balloon flower root. Biosci Biotechnol Biochem. 66: 1270-1275.

Choudhary D K and Johri B N. 2009. Interactions of *Bacillus* spp. and plants-With special reference to induced systemic resistance (ISR). Microbiol Res. 164: 493-513.

Christiansen I. Graham P H. 2002. Variation in di-nitrogen fixation among Andean bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes grown at low and high levels of phosphorus supply. Field Crops Res. 73: 133-142.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1997. Annual report, 1997. Project IP-1, Bean Improvement for Sustainable Productivity, Input use efficiency and poverty alleviation. CIAT, Cali, Colombia.

Clay K and Schardl C. 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. Am Nat. 160: S99-S127.

Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C and Barka E A. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. Appl Environ Microbiol. 71: 4951-4959.

Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA. 2007. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. Nature. 449: 811-818.

Dimijian G G. 2000a. Evolving together: the biology of symbiosis, part 1. BUMC Proc 13: 217-226.

Dimijian G G. 2000b. Evolving together: the biology of symbiosis, part 2. BUMC Proc. 13: 381-390.

Ding Y, Wang J, Liu Y, Chen S. 2005. Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. J Appl Microbiol. 99: 1271-1281.

Dörr J, Hurek T and Reinhold-Hurek B. 1998. Type IV pili are involved in plant-microbe and fungus-microbe interactions. Mol Microbiol. 30: 7-17

Elbeltagy A, Nishioka K, Sato T, Suzuki H, Ye B, Hamada T, Isawa T, Mitsui H, Minamisawa K. 2001. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by *Herbaspirillum* sp. Isolated from rice species. Appl Environ Microbiol. 67: 5285-93

Estrada De Los Santos P, Bustillos-Cristales R, Caballero-Mellado J. 2001. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. Appl Environ Microbiol. 67: 2790-2798.

Ferreira A, Quecine M C, Lacava P T, Oda S, Azevedo J L, Araújo W L. 2008. Diversity of endophytic bacteria from Eucalyptus species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. FEMS Microbiol Lett. 287: 8-14.

Filoche S, Wong L, Sissons CH. 2010. Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. J Dent Res. 89: 8-18.

Fouts D E, Tyler H L, DeBoy R T, Daugherty S, Ren Q, Badger J H, Durkin A S, Huot H, Shrivastava S, Kothari S, Dodson R J, Mohamoud Y, Khouri H, Roesch L F, Krogfelt KA, Struve C, Triplett E W, Methé B A. 2008. Complete genome sequence of the N₂-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice. PLoS Genet. 4(7):e1000141.

Fuentes-Ramírez, L. E., Caballero-Mellado, J., Sepúlveda, J. and Martínez-Romero, E. 1999. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. FEMS Microbiol Ecol. 29: 117-128.

Garbeva P, van Overbeek L S, van Vuude J W L and van Elsas J D. 2001. Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments. Microbiol Ecol. 41: 369-383.

Germaine K, Keogh E, Garcia-Cabellos G, Borremans B, Lelie D, Barac T, Oeyen L, Vangronsveld J, Moore FP, Moore ER, Campbell CD, Ryan D, Dowling DN. 2004. Colonization of poplar trees by *gfp* expressing bacterial endophytes. FEMS Microbiol Ecol. 48: 109-118.

Guanatilaka A A L. 2006. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *J Nat Prod.* 69: 509-526.

Goryluk A, Rekosz-Burgala H, Blaszczyk M. 2009. Isolation and characterization of bacterial endophytes of *Chelidonium majus* L. *Pol J Microbiol.* 58: 355-361.

Green P N and Bousfield I J. 1983. Emendation of *Methylobacterium* Patt, Cole, and Hanson 1976; *Methylobacterium rhodinum* (Heumann 1962) comb. nov. corrig.; *Methylobacterium radiotolerans* (Ito and Iizuka 1971) comb. nov. corrig.; and *Methylobacterium mesophilicum* (Austin and Goodfellow 1979) comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 33: 875–877.

Guanatilaka A A L. 2006. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *J Nat Prod.* 69: 509-526.

Guo H, Luo S, Chen L, Xiao X, Xi Q, Wei W, Zeng G, Liu C, Wan Y, Chen J, He Y. 2010. Bioremediation of heavy metals growing hyperaccumulator endophytic bacterium *Bacillus* sp. L14. *Bioresource Technol.* 101: 8599-8605.

Gutiérrez-Zamora M L and Martínez-Romero E. 2001. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). *J Biotechnol.* 91: 117-126.

Gyaneshwar P, James E K, Mathan N, Reddy P M, Reinhold-Hurek B and Ladha J. 2001. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *J Bacteriol.* 183: 2634-2645.

Hahn H P. 1997. The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*--a review. *Gene.* 192: 99-108.

Hallmann J, Berg G and Schultz C. 2006. Isolation procedures for endophytic microorganisms. In *Microbial root endophytes*. Schultz, B. J. E., Boyle, C. J. C. and Sieber T. N. (eds). Springer, Germany, pp. 299-314.

Hardarson G, Atkins C. 2003 Optimizing biological N₂ fixation by legumes in farming systems. *Plant Soil.* 252: 41-54.

Hung P Q, Kumar S M, Govindsamy V and Annapurna K. 2007. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and cultivated soybean varieties. *Biol Fert Soils.* 44: 155-162.

Hurek T, Reinhold-Hurek B. 2003. *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophyte. *J Biotechnol.* 106: 169-178.

Hurek T, Reinhold-Hurek B, van Montagu M and Kellenberger E. 1994. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. *J Bacteriol.* 176: 1913-1923.

Idris R, Trifonova R, Puschenreiter M, Wenzel W W, Sessitsch A. 2004. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. *Appl Environ Microbiol.* 70: 2667-2677.

Iñiguez A L, Dong Y, Carter H D, Ahmer B M, Stone J M, Triplett E W. 2005. Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18: 169-178.

Iñiguez A L, Dong Y, Triplett E W. 2004. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Mol Plant Microbe Interact.* 17: 1078-85

Israel D W. 1987. Investigation of the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation. *Plant Physiol.* 84: 835-840.

Izumi, H. Anderson, I. C., Killham, K. and Moore, E. R. B. 2008. Diversity of predominant endophytic bacteria in European deciduous and coniferous trees. *Can J Microbiol* 54:173-179.

James E K, Gyaneshwar P, Mathan N, Barraquio W L, Reddy P M, Iannetta P P, Olivares F L, Ladha J K. 2002. Infection and colonization of rice seedlings by the plant-growth promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Mol Plant Microbe Interact.* 15: 894-906

Jha P, Kumar A. 2009. Characterization of novel plant growth promoting endophytic bacterium *Achromobacter xyloxidans* from wheat plant. *Microb Ecol.* 58: 179-88.

Jofré, E., Lagares, A. and Mori, G. 2004. Disruption of dTDP-rhamnose biosynthesis modifies lipopolysaccharide core, exopolysaccharide production and root colonization in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol Lett* 231: 267-275.

Jones K M, Kobayashi H, Davies B W, Taga M E and Walker G C. 2007. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nature Rev.* 5: 619-633.

Kaneko T, Minamisawa K, Isawa T, Nakatsukasa H, Mitsui H, Kawaharada Y, Nakamura Y, Watanabe A, Kawashima K, Ono A, Shimizu Y, Takahashi C, Minami C, Fujishiro T, Kohara M, Katoh M, Nakazaki N, Nakayama S, Yamada M, Tabata S, Sato S. 2010. Complete genomic structure of the cultivated rice endophyte *Azospirillum* sp. B510. *DNA Res.* 17: 37-50.

Kang Y, Liu H, Genin S, Schell M A and Denny T P. 2002. *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. *Mol Microbiol.* 46: 427-437.

Kaplan L, Lynch T. 1999. *Phaseolus* (Fabaceae) in archeology: AMS radiocarbon dates and their significance for the pre-Columbian agriculture. *Econ Bot.* 53: 261-272.

Kirk J L, Beaudette L A, Hart M, Moutoglis P, Klinomos J N, Lee H and Trevors J. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *J Microbiol Methods.* 52: 169-188.

Koenig R L, Morris R O and Polacco J C. 2002. tRNA is the source of low-level trans-zeatin production in *Methylobacterium* spp. *J Bacteriol.* 184: 1832-1842

Kogel K H, Franken P, Hüchelhoven R. 2006. Endophyte or parasite-what decides? *Curr Opin Plant Biol.* 9: 358-363.

Krause A, Ramakumar A, Bartels D, Battistoni F, Bekel T, Boch J, Böhm M, Friedrich F, Hurek T, Krause L, Linke B, McHardy AC, Sarkar A, Schneiker S, Syed A A, Thauer R, Vorhölter F J, Weidner S, Pühler A, Reinhold-Hurek B, Kaiser O, Goesmann A. 2006. Complete genome of the mutualistic, N₂-fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. Strain BH72. *Nat Biotechnol.* 24: 1385-91

Krechel A, Faupel A, Hallman J, Ulrich A and Berg G. 2002. Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. *Can J Microbiol.* 48: 772-786.

Kuffner M, De María S, Puschnreiter M, Fallmann K, Weishammer G, Gorfer M, Strauss J, Rivelli A R, Sessitsch A. 2010. Culturable bacteria from Zn- and Cd-accumulating *Salix caprea* with differential effects on plant growth and heavy metals availability. *J Appl Microbiol.* 108: 1471-1484.

Lacava P T, Araújo W L, Marcon J, Maccheroni W Jr, Azevedo J L. 2004. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xilella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. *Lett Appl Microbiol.* 39: 55-59.

Lacava P T, Li W, Araújo W L, Azevedo J L, Hartung J S. 2007. The endophyte *Curtobacterium flaccumfaciens* reduces symptoms caused by *Xilella fastidiosa* in *Catharanthus roseus*. *J Microbiol.* 45: 388-393

Limpens E and Bisseling T. 2004. Signaling in symbiosis. *Curr Opin Plant Biol.* 6: 343-350.

Liu, H., Kang, K., Genin, S., Schell, M. A. and Denny, T. P. 2001. Twitching motility of *Ralstonia solanacearum* requires a type IV pilus system. *Microbiol.* 147: 3215-3229.

Liu, X., Zhao, H. and Chen, S. 2006. Colonization of maize and rice plants by strain *Bacillus megaterium* C4. *Current Microbiol.* 52: 186-190.

Loiret, F. G., Ortega, E., Kleiner, D., Ortega-Rodés, P., Rodés, R and Dong, Z. 2004. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. *J Appl Microbiol* 97: 504-511.

Lugtenberg, B. J. J., Chin-A-Woeng, T. F. C. and Bloembergen, G. V. 2002. Microbe-plant interactions: Principles and mechanisms. *Antoine van Leewenhoek.* 81: 373-383.

Madhaiyan M, Poonguzhali S, Ryu J and Sa T. 2006a. Regulation of ethylene levels in canola (*Brassica campestris*) by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-containing *Methylobacterium fujisawaense*. *Planta* 224: 268-278

Madhaiyan M, Poonguzhali S, Sa T. 2007. Influence of plant species and environmental conditions on epiphytic and endophytic pink-pigmented facultative methylotrophic bacterial populations associated with field-grown rice cultivars. *J Microbiol Biotechnol.* 17: 1645-1654.

Madhaiyan M, Suresh Reddy BV, Anandham R, Senthilkumar M, Poonguzhali S, Sundaram SP, Sa T. 2006b. Plant growth-promoting *Methylobacterium* induces defense responses in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) compared with rot pathogens. *Curr Microbiol.* 53: 270-276.

Magnani G S, Didonet C M, Cruz L M, Picheth C F, Pedroza F O, Souza E M. 2010. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. *Genet Mol Res.* 9: 250-258.

Manter D K, Delgado J A, Holm D G, Strong R A. 2010. Pyrosequencing reveals a high diverse and cultivar-specific bacterial endophyte community in potato roots. *Microb Ecol.* 60: 157-166.

Martínez, L., Caballero-Mellado, J., Orozco, J., and Martínez-Romero, E. 2003. Diazotrophic bacteria associated with banana (*Musa* spp.). *Plant Soil.* 257: 35-47.

Martínez-Romero E and Caballero-Mellado J. 1996. *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Crit Rev Plant Sci.* 15: 113-140.

Martínez-Romero E and Rosenblueth M. 1990. Increased bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodulation competitiveness of genetically modified *Rhizobium* strains. *Appl Environ Microbiol.* 56:2384-2388.

Martínez-Romero E, Hernández-Lucas I, Peña-Cabriales JJ, Castellanos JZ. 1998. Symbiotic performance of some modified *Rhizobium etli* strains in assays with *Phaseolus vulgaris* beans that have a high capacity to fix N₂. *Plant soil.* 204: 89-94.

McSpadden Gardener, B.B. 2004 Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. *Phytopathology* 94: 1252-1258.

Mendes, R., Pizzirani-Kleiner, A. A., Araujo, W. L. and Raaijmakers, J. 2007. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: Genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Appl Environ Microbiol.* 73: 7259-7267.

Miller, D. N., Bryant, J. E., Madsen, E. L. and Ghiorse, W. C. 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl Environ Microbiol.* 65: 4715-4724.

Neeraja C, Anil K, Purushotham P, Suma K, Sarma P VSRN, Moerschbacher B M, Podile A R. 2010. Biotechnological approaches to develop bacterial chitinases as a bioshield against fungal diseases of plants. *Crit Rev Biotechnol.* early on line 1-11.

Niesel KL, Eshel A, Lynch JP. 2001. The effect of phosphorus availability on the carbon economy of contrasting common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes. *J Exp Bot.* 52: 329-339.

Onofre-Lemus J, Hernández-Lucas I, Girard L, Caballero-Mellado J. 2009. ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase activity a widespread trait in *Burkholderia* species, and its growth-promoting effect on tomato plants. *Appl Environ Microbiol.* 75: 6581-6590.

Ormeño-Orrillo, E. Rosenblueth, M., Luyten, E., Vanderleyden, J. and Martínez-Romero, E. 2008. Mutations in lipopolisaccharide biosynthetic genes impair maize rhizosphere and root colonization of *Rhizobium tropici* CIAT 899. *Environ Microbiol.* 10: 1271-1284.

Pellicic, V. 2008. Type IV pili: *e pluribus unum?* *Mol Microbiol* 68:827-837.

Pérez-Ramírez N O, Rogel M A, Wang E T, Castellanos JZ and Martínez-Romero E. 1998. Seeds of *Phaseolus vulgaris* bean carry *Rhizobium etli*. *FEMS Microbiol Ecol.* 26: 289-296.

Perin L, Martínez-Aguilar L, Paredes-Valdez G, Baldani JI, Estrada-de Los Santos P, Reis VM, Caballero-Mellado J. 2006. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugarcane and maize. *Int J Syst Evol Microbiol.* 56(Pt 8):1931-7

Podolich O, Laschvskyy V, Ovcharenko L, Kozyrovska N, Pirttilä A M. 2009. *Methylobacterium* sp. resides in unculturable state in potato tissues in vitro and becomes culturable after induction by *Pseudomonas fluorescens* IMBM163. *J Appl Microbiol.* 106: 728-737.

Porteous Moore F, Barac T, Borremans B, Oeyen L, Vangronsveld J, van der Lelie D, Campbell C D, Moore E R B. 2006. Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: The characterization of isolates with potential to enhance phytoremediation. *Sys Appl Microbiol.* 29:539-56.

Quecine M C, Araujo W L, Marcon J, Gai C S, Azevedo J L, Pizzirani-Kleiner A A. 2008. Chitinolytic activity of endophytic *Streptomyces* and potential for biocontrol. *Lett Appl Microbiol.* 47: 486-91.

Raghothama KG. 1999. Phosphate acquisition. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 50: 665-693.

Ramey E B, Koutsoudis M, von Bodman S B, Fuqua C. 2004. Biofilm formation in plant-microbe associations. *Curr Opin.* 7: 602-609.

Rasche F, Leuders T, Schloter M, Schaefer S, Buegger F, Gattinger A, Hood-Nowotny R C, Sessitsch A. 2009. DNA-based stable isotope probing enables the identification of active bacterial endophytes in potatoes. *New Phytol.* 181: 802-807.

Redak RA, Puercell AH, Lopes JR, Blua MJ, Mizell RF 3rd, Andersen PC. 2004. The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. *Annu Rev Entomol.* 49: 243-270.

Reiter B, Pfeifer U, Schwab H, Sessitsch A. 2002. Response of endophytic Bacterial Communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subs. atroseptica. *Appl Environ Microbiol.* 68: 2261-2268.

Reiter, B., Wermbter, N., Gyamfi, S., Schwab, H and Sessisch, A. 2003. Endophytic *Pseudomonas* spp. Populations of pathogen-infected potato plants analysed by 16S r RNA-based denaturing gradient gel electrophoresis. *Plant Soil.* 257: 397-405.

Rengel Z, 2002. Breeding for better symbiosis. *Plant Soil.* 245: 147-162.

Rijavec, T., Lapanje, A., Dermastia, M and Rupnik, M. 2007. Isolation of bacterial endophytes from germinated maize kernels. *Can J Microbiol.* 53: 802-808.

Rodriguez-Navarro D N, Dardanelli M S, Ruíz-Saínz J E. 2007. Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiol Lett.* 272: 127-136.

Rouws L F, Meneses C H, Guedes H V, Vidal M S, Baldani J I, Schwab S. 2010. Monitoring the colonization of sugarcane and rice plants by the endophytic diazotrophic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* marked with *gfp* and *gusA* reporter genes. *Lett Appl Microbiol.* 51: 325-30.

Ryan, R. P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. and Dowling, D. N. 2008. Bacterial endophytes: Recent developments and applications. *FEMS Microbiol Lett.* 278: 1-9.

Ryu C-M, Farag M A, Hu C-H, Reddy M S, Kloepper J W and Paré P W. 2004. Bacterial volatiles induce Systemic Resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 134: 1017-1026.

Ryu, C-M., Farag, C-H., Reddy, M. S., Wei, H-X., Pare, P. W. and Kloepper, J. W. 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *PNAS.* 100: 4927-4932.

Schultz, B. and Boyle, C. 2006. What are endophytes? In *Microbial root endophytes*. Schultz, B. J. E., Boyle, C. J. C. and Sieber T. N. (eds). Springer, Germany, pp. 1-10.

Segovia L, Piñero D, Palacios R, Martínez-Romero E. Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. 1991. *Appl Environ Microbiol.* 57: 426-433.

Senthilkumar M, Swarnalakshmi K, Govindasamy V, Lee Y K, Annapurna K. 2009. Biocontrol potential of soybean bacterial endophytes against charcoal rot fungus, *Rhizoctonia bataticola*. *Curr Microbiol.* 58: 288-293.

Sessitsch A. Reiter B and Berg G. 2004. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. *Can J Microbiol.* 50: 239-249.

Sheng X-F, Xia J-J, Jiang C-Y, He L-Y, Qian M. 2008. Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) root and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environ Pollut.* 156: 1164-1170.

Shi J, Liu A, Li X, Feng S, chen W. 2010. Identification of endophytic bacterial strain MGP1 selected from papaya and its biocontrol effects on pathogens infecting harvested papaya fruit. *J Sci Food Agric.* 30: 227-232.

Siciliano SD, Fortin N, Mihoc A, Wisse G, Labelle S, Beaumier D, Ouellette D, Roy R, Whyte LG, Banks MK, Schwab P, Lee K and Greer CW. 2001. Selection of specific endophytic bacteria genotypes by response to soil contamination. *Appl Environ Microbiol.* 67: 2469-2475.

Singh SP, Terán H, Muñoz CG, Osorno JM, Takegami JM, Thung MDT. 2003. Low soil fertility tolerance in landraces and improved common bean genotypes. *Crop Sci.* 43: 110-119.

Singh, R. K., Mishra, R. P. N., Jaiswal, H. K., Kumar, V., Pandey, S. P., Rao, S. B. and Annapurna, K. 2006. Isolation and identification of natural endophytic rhizobia from rice (*Oryza sativa* L.) through rDNA PCR-RFLP and sequence analysis. *Curr Microbiol.* 52: 345-349.

Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev.* 31: 425-448.

Spiegelman D., Whissell, G. and Greer C. W. 2005. A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities. *Can J Microbiol.* 51: 355-386.

Stacey, G., Libault, M., Brechenmacher, L., Wan, J. and May, G. D. 2006. Genetics and genomics of legume nodulation. *Current Opinion Plant Biol.* 9: 110-121.

Steenhoudt, O. and Vanderleyden, J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol Rev.* 24: 487-506.

Strobel, G. A. 2003. Endophytes as resources of bioactive products. *Microbe Infect.* 5: 535-544.

Strobel, G. A., Daisy, B., Castillo, U. and Harper, J. 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *J Nat Prod.* 67: 257-268.

Strobel, G. and Daisy, B. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67: 491-502.

Sturz, A. V., Peters, R. D., Carter, M. R., Sanderson, J. B., Matheson B. G. and Christie B. R. 2005. Variation in antibiosis ability, against potato pathogens, of bacterial communities recovered from the endo- and exoroots of potato crops

produced under conventional versus minimum tillage systems. *Can J Microbiol.* 51: 643-654.

Sturz, A.V. and Christie, B.R. 1996. Endophytic bacteria of red clover as agents of allelopathic clover-maize syndromes. *Soil Biol Biochem.* 28: 583-588.

Sun, L., Qiu, F., Zhang, X., Dai, X., Dong, X. and Song, W. 2008. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microb Ecol.* 55: 415-424.

Surette M A, Sturz A V, Lada R R 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 Soil.* 253: 381-390.

Taghavi S, Barac T, Greenberg B, Borremans B, Vangronsveld J, van der Lelie. 2005. Horizontal gene transfer to endogenous endophytic bacteria from poplar improves phytoremediation of toluene. *Appl Environ Microbiol.* 71: 8500-8505.

Taghavi S, Garafola C, Monchy S, Newman L, Hoffman A, Weyens N, Barac T, Vangronsveld J, van der Lelie D. 2009. Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Appl Environ Microbiol.* 75: 748-757.

Taghavi S, van der Lelie D, Hoffman A, Zhang Y B, Walla M D, Vangronsveld J, Newman L, Monchy S. 2010. Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638. *PLoS Genet.* 6(5):e1000943.

Takeuchi F, Watanabe S, Baba T, Yuzawa H, Ito T, Morimoto Y, Kuroda M, Cui L, Takahashi M, Ankai A, Baba S-I, Fukui S, Lee J C and Hiramatsu K. 2005. Whole-genome sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing staphylococcal species. *J Bacteriol.* 187: 7292-7308.

Tapia-Hernández, A., Bustillos-Cristales, M. R., Jiménez-Salgado, T. Caballero-Mellado, J. and Fuentes-Ramírez, L. E. 2000. Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. *Microbiol Ecol.* 39: 49-55.

Timmusk S, Grantcharova N, Wagner EG. 2005. *Paenibacillus polymyxa* invades plant root forms biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 71: 7292-7300.

Tyler, H. L. and Triplett, E. W. 2008. Plants as a habitat for beneficial and/or human pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol.* 46: 53-73.

Uhlik O, Jecná K, Leigh M B, Machková M, Macek T. 2009. DNA-based stable isotope probing: a link between community structure and function. *Sci Total Environ.* 407: 3611-3619.

Vadez V, Drevon JJ. 2001. Genotypic variability in phosphorus use efficiency for symbiotic N₂ fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agronomie.* 21: 691-699.

Vadez V, Lasso JH, Beck DP, Drevon JJ. 1999. Variability on N₂-fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under P deficiency is related to use efficiency. *Euphytica.* 106: 231-242.

Van Aken B, Peres C M, Doty S L, Yoon J M, Schnoor J L. 2004b. *Methylobacterium populi* sp. Nov., a novel aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, methane-utilizing bacterium isolated from poplar trees (*Populus deltoides* x *nigra* DN34) *Int J Sys Evol Microbiol.* 54: 1191-1196.

Van Aken B, Yoon J M, Schnoor J L. 2004a. Biodegradation of nitro-substituted explosives 2, 4, 6-nitrotoluene, Hexahydro-1,3,5-Trinitro-1,3,5-Triazine, Octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5-Tetrazocine by a phytosymbiotic *Methylobacterium* sp. Associated to poplar tissues (*Populus deltoides* x *nigra* DN34) *Appl Environ Microbiol.* 70: 508-517.

Van Overbeek L, van Elsas JD. 2008. Effects of plant genotype and growth stage on the structure of bacterial communities associated with potato (*Solanum tuberosum* L.) *FEMS Microbiol Ecol.* 64: 283-296.

Van Overbeek L. S., van Vuurde, J. and van Elsas, J. D. 2006. Application of molecular fingerprinting techniques to explore the diversity of bacterial endophytic communities. In *Microbial root endophytes*. Schultz, B. J. E., Boyle, C. J. C. and Sieber T. N. (eds). Springer, Germany, pp. 337-350.

Vega FE, Pava-Ripoll M, Posada F and Buyer JS. 2005. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. *J Basic Microbiol.* 45: 371-380.

Velázquez, E., Rojas, M., Lorite, M. J., Rivas, R., Zurdo-Piñeiro, J. L., Heydrich, M. and Bedmar, E. J. 2008. Genetic diversity of endophytic bacteria which could be found in the apoplastic sap of the medullary parenchyma of the stem of healthy sugarcane plants. *J Basic Microbiol.* 48: 118-124.

Verma S C, Ladha J K and Tripathi A K. 2001. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J Biotechnol.* 91: 127-141.

Versalovic J, Schneider M, de Bruijn G J, Lupski R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol Cell Biol.* 5: 25-40.

Vinagre F, Vargas C, Schwarcz K, Cavalcante J, Nogueira EM, Baldani JI, Ferreira PC, Hemery AS. 2006. SHR5: a novel plant receptor kinase involved in plant-N₂ fixing endophytic bacteria association. *J Exp Bot.* 57: 559-569.

Wang, E. T., Tan, Z. Y., Guo, X. W., Rodríguez-Duran, R., Boll, G. and Martínez-Romero, E. 2006. Diverse endophytic bacteria isolated from a leguminous tree *Conzattia multiflora* grown in Mexico. *Arch Microbiol* 186:251-259.

Weyens N, Croes S, Dupae J, Newman L, van der Lelie D, Carleer R, Vangronsveld J. 2010. Endophytic bacteria improved phytoremediation of Ni and TCE co-contamination. *Environ Pollut.* 158: 2422-2427.

Weyens N, Taghavi S, Barac T, van der Lelie D, Boulet J, Artois T, Carleer R, Vangronsveld J. 2009a. Bacteria associated with oak and ash on a TCE contaminated site: characterization of isolates with potential to avoid evapotranspiration of TCE. *Environ Sci Pollut.* 16: 830-846.

Weyens N, Taghavi S, van der Lelie D, Newman L, Vangronsveld J. 2009d. Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation. *Cell Press.* 27: 591-598.

Weyens N, Taghavi S, van der Lelie D, Vangronsveld J. 2009c. Phytoremediation: plant-endophyte partnerships take the challenge. *Curr Opin Biotechnol.* 20: 248-254.

Weyens N, van der Lelie D, Artois T, Smeets K, Taghavi S, Newman L, Carleer R, Vangronsveld J. 2009b. Bioaugmentation with engineered endophytic bacteria improves contaminant fate in phytoremediation. *Environ Sci Technol.* 43: 9413-9418.

Wong T-Y, Graham L, O'Hara E, Maier R J. 1986. Enrichment of hydrogen-oxidizing *Acinetobacter* spp. in the rhizosphere of hydrogen-evolving soybean root nodules. *Appl Environ Microbiol.* 52: 1008-1013

Yaryura, P.M., León, M., Correa O. S., Kerber, N. L. and García, A. F. 2008. Assessment of the role of chemotaxis and biofilm formation as requirements for colonization of roots and seed of soybean plants by *Bacillus amyloliquefasciens* BNM339. *Curr Microbiol.* 56: 625-632.

Young JPW. 1996. Phylogeny and taxonomy of rhizobia. *Plant Soil.* 186: 45-52.

Zhang W H, Song Y C, Tan R X. 2006. Biology and chemistry of endophytes. *Nat Prod Rep.* 23: 753-771.

Zinniel, D. K., Lambrecht, P., Harris, B., Feng, Z., Kuczarski, D. Higley, P. Ishimaru, C. A., Arunakumari, A., Berletta, R. G. and Vidaver, A. 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl Environ Microbiol.* 68: 2198-2208.

ANEXO.

Fahraeus (Fahraeus, 1957)

	Stocks (g/l)	volumen para 1L.
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	15 g	10 ml
KH ₂ PO ₄	10 g	10 ml
CaCl ₂	10 g	10 ml
Mg SO ₄ 7H ₂ O	12 g	10 ml
Fe citrato	0.5g	10 ml
Trazas		1 ml

Stock de Trazas

H ₃ BO ₃	2.86 g
MnSO ₄ 4H ₂ O	2.03 g
ZnSO ₄ 7H ₂ O	220 mg
CuSO ₄ 5H ₂ O	80 mg
H ₂ MoO ₄ H ₂ O	80 mg
Agua	cbp 1000 ml (concentración final 1000 X)

Para Fahraeus sólido se ponen 1,5 g de agar en un matraz de 250 ml y 220 ml de Fahraeus.

Para Fahraeus con Amonio

NH₄NO₃ 8g/l se toman 10 ml.

LB

Peptona de Caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agua	cbp 1000 ml
Agar	15 g por litro

YM

K ₂ HPO ₄	500 mg
MgSO ₄ 7H ₂ O	200 mg
NaCl	100 mg
Manitol	10 g
Extracto de levadura	0.4 g
Agua	cbp 1000 ml
Agar	15 g por litro.

PY

Peptona de Caseína	5 g
Extracto de levadura	3 g
Agua	cbp 1000 ml
Agar	15 g por litro.

Una vez esterilizado el medio de cultivo se le adiciona 1 ml de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ por cada 100 ml de medio.

$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 10.47 g en 100 ml de agua.

Para pH 4

Para pH=5.5-6

Phosphate Growth Médium

Glucosa	10 g
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	5 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25 g
KCl	0.2 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5 g
Agar	15 g
Água	c.b.p. 1 litro
pH	7.0

Solución para actividad β -glucuronidasa.

Amortiguador de fosfatos	10 ml.
EDTA 100 mM	10 ml.
Tween 20	10 μl .
SDS 10%	100 μl .
Triton X100	70 μl .
X-gluc	10 mg (disuelto en 300 μl DMSO)
Agua	c.b.p. 100 ml.

Amortiguador de fosfatos preparado en agua.

	Pesar	Volumen	Concentración	Solución Stock final
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.38 g	50 ml	200 mM	39 ml
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	7-16 g	100 ml	200 mM	<u>61 ml</u>
				100 ml

OTRAS PUBLICACIONES

a) Rhizobial symbioses in Tropical Legumes and Non-legumes.

b) Rhizobial diversity in different land use systems in the rain forest of Los Tuxtlas, Mexico.