

## Cepas de bacterias aisladas de esporomas de hongos ectomicorrízicos promueven el crecimiento vegetal

D.Y. Pineda-Mendoza<sup>1</sup>, J.J. Almaraz<sup>1,\*</sup>, M.E. Lara-Hernandez<sup>1</sup>,  
R. Arteaga-Garibay<sup>2</sup> y H.V. Silva-Rojas<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Edafología, Colegio de Postgraduados, Km 36,5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, Estado de México, C.P. 56230

<sup>2</sup> Centro Nacional de Recursos Genéticos, Av. Biodiversidad No. 2498, Col. Centr. Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México, C.P. 47600

### Resumen

Los bosques son una fuente de recursos microbianos con potencial biotecnológico en la agricultura. En esta investigación se aislaron seis cepas bacterianas de esporomas del hongo ectomicorrízico *Lactarius salmonicolor* R. Heim & Leclairde con el fin de estudiar su capacidad promotora de crecimiento en hortalizas usando como planta indicadora chile Serrano (*Capsicum annuum* L.). Las cepas se cultivaron en medios selectivos para determinar solubilización de fosfatos, producción de indoles, sideróforos, y actividad antifúngica; se incluyeron tres cepas como controles de comparación. Además, se estableció un experimento de invernadero para determinar el efecto de las cepas en plántulas de chile. De las seis cepas aisladas, cinco fueron del género *Pseudomonas* y otra de la especie *Rouxiella silvae*. Todas las cepas solubilizaron fosfato sobrepasando la OLSf1. En el caso de la síntesis de indoles, la mayor producción correspondió a OLSf1 y la cepa control P61. Las tres cepas control y la OLSf3 inhibieron en más de 40% el crecimiento de *Rhizoctonia* sp. y la mayoría produjeron sideróforos. La mayor germinación de semillas (70%) se tuvo con la cepa OLSf3. Se observó mayor elongación de la radícula con la cepa OLSf5. Las cepas OLSf5, OLSf1, OLSf3 y la cepa control A46 incrementaron el peso seco de plántulas en más de 60%, superando significativamente al testigo sin inoculación. Este trabajo mostró que rizobacterias aisladas de esporomas de hongos ectomicorrízicos pueden ser utilizadas en cultivos agrícolas como chile Serrano para incrementar el crecimiento de plántulas e incluso pueden superar a cepas de rizobacterias aisladas de especies vegetales cultivadas.

**Palabras clave:** Antagonismo, comunidades microbianas, *Lactarius salmonicolor*, metabolitos microbianos.

### Strains of bacteria isolated from sporomes of ectomycorrhizal fungi promote plant growth

#### Abstract

Forest ecosystems are a source of microbial resources with biotechnological potential in agriculture. In this research, six bacterial strains from sporomes of the ectomycorrhizal fungus *Lactarius salmonicolor* R. Heim & Leclairde were isolated in order to study their growth promoter capacity in vegetables using Serrano chilli (*Capsicum annuum* L.) as an indicator plant. Strains were grown in culture media to determine phosphate solubilization, indole and siderophore production, and antifungal activity, three strains

---

\* Autor para correspondencia: jalmaraz@colpos.mx

were included as comparison controls. In addition, a greenhouse experiment was established to determine the effect of the strains on chilli seedlings. Of the six isolated strains, five were species of the genus *Pseudomonas* and another was the species *Rouxiella silvae*. All strains solubilized phosphate being the best of them OLSf1. In the case of indoles, the highest production corresponded to OLSf1 and the control strain P61. The three control strains and the OLSf3 inhibited in more than 40% the growth of *Rhizoctonia* sp., most of them produced siderophores. The highest seed germination (70%) was with the strain OLSf3. Greater elongation of the radicle was observed with the strain OLSAu2.3. The OLSf5, OLSAu1, OLSAu2.3 and the control strain A46 increased the dry weight of seedlings by more than 60%, significantly exceeding the control without inoculation. This work showed that rhizobacteria isolated from sporomes of ectomycorrhizal fungi can be used in agricultural crops such as Serrano chilli to increase seedling growth and even to overcome rhizobacteria strains isolated from cultivated plant species.

**Keywords:** Antagonism, microbial communities, *Lactarius salmonicolor*, microbial metabolites.

## Introducción

Los bosques son grandes reservorios de biodiversidad de plantas, animales y microorganismos. Estos últimos desempeñan diferentes funciones que son vitales en el mantenimiento del bosque (Baldrian, 2017; Yang et al., 2017), entre las cuales se encuentran: mineralización de la materia orgánica, movilización y reciclaje de nutrientes. Muchos de ellos establecen interacciones positivas con las plantas mejorando su nutrición y crecimiento a través de diferentes mecanismos (Uroz et al., 2011; Müller et al., 2016; Baldrian, 2017). Por ejemplo, producen hormonas vegetales (auxinas, giberelinas, etileno) y diversas enzimas, aumentan la disponibilidad de nutrientes (nitrógeno, fósforo, potasio y hierro), y producen metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana (Nadeem et al., 2014; Navya et al., 2015).

Las comunidades microbianas viven en el dosel de las comunidades vegetales, en la rizosfera, el suelo e incluso en superficies rocosas (Siebyla y Hilszczanska, 2017). Algunos grupos microbianos como los hongos ectomicorrízicos establecen simbiosis con plantas forestales y crean una red de hifas que exploran el suelo más allá de las raíces e interconectan diferentes especies haciéndolas exitosas en la

adquisición de nutrientes y agua (Aspray et al., 2006; Baldrian, 2017). La red de hifas y raíces, conocida como micorrizosfera, crea un ambiente que permite el establecimiento de diversos microorganismos característicos de esta área del suelo, entre los que se encuentran las bacterias auxiliaadoras de la micorrización, que actúan como moduladores de la colonización y promoción de la simbiosis entre los hongos micorrízicos y las plantas, así como también pueden influir directamente en el crecimiento vegetal de sus hospedantes (Johansson et al., 2004; Fatemeh et al., 2014).

Las bacterias auxiliaadoras de la micorrización y promotoras del crecimiento tienen un gran potencial de uso en viveros forestales como varios estudios lo demuestran (Dominguez-Nuñez et al., 2015), y posiblemente su efecto benéfico no se restringa solo a sus hospedantes arbóreos sino que se extienda a otras especies como cultivos agrícolas. En este trabajo se estudió el potencial de un grupo de cepas de rizobacterias aisladas de esporomas del hongo ectomicorrízico *Lactarius salmonicolor* R. Heim & Leclairde para promover crecimiento, usando como planta indicadora a chile Serrano (*Capsicum annuum* L.), una hortaliza ampliamente cultivada en México y otros países del mundo.

## Materiales y métodos

### **Aislamiento de cepas de bacterias de esporomas**

Se recolectaron esporomas del hongo ectomicorrízico *Lactarius salmonicolor* en un rodal de oyamel (*Abies religiosa* (HBK) Schl. & Cham.), en el Monte Tláloc, Texcoco, Estado de México. El suelo en este rodal es un andosol de textura franca con pH de 4,9, además, tiene 14,6% de materia orgánica, 18,8 mg Kg<sup>-1</sup> de nitrógeno inorgánico y 6,2 mg Kg<sup>-1</sup> de fósforo disponible. Los esporomas colectados en el rodal de oyamel se colocaron en una hielera para mantenerlos en condiciones frescas durante el traslado al laboratorio. Se cortó finamente un gramo del esporoma y se agregó a un tubo que contenía 9 mL de agua destilada estéril, se agitó vigorosamente y de esta dilución (10<sup>-1</sup>) se realizaron diluciones decimales seriales (10<sup>-2</sup> hasta 10<sup>-6</sup>), se tomaron alícuotas de 100 µL de cada dilución y se dispersaron homogéneamente en cajas Petri con el medio de cultivo Pikovskaya (ver detalles del medio más adelante). Las cajas se incubaron a 28 °C durante 7 días. Las colonias crecidas que presentaron el mayor halo transparente fueron sembradas en agar nutritivo y conservadas hasta su utilización.

### **Identificación molecular de las cepas aisladas**

Se extrajo el DNA genómico a partir de tres colonias de las cepas aisladas con el sistema comercial EZ-10 Spin® Column Bacterial DNA mini-preps kit (Bio Basic Inc., Canadá), se verificó la integridad en un gel de agarosa al 0,8%. Se amplificó vía una PCR el gen 16S rDNA, correspondiente a las regiones hipervariables V1 a V3 que permiten la asignación de identidad de manera confiable hasta nivel de género y especie, según el grupo bacteriano. La PCR se realizó con un protocolo de

un ciclo de 2 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 57 °C, 30 ciclos de 1,3 min a 72 °C y 1 ciclo de 5 min a 72 °C. Se utilizaron los Primer 8F (5 -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 ) y el 1492R (5 -GGTACCTTGTTACGACTT-3 ). Los productos de amplificación se enviaron al servicio de secuenciación de MACROGEN (Corea del sur).

Se editaron las secuencias de las cepas con software bioinformático, se convirtieron las secuencias a formato FASTA con el programa BioEdit versión 7.0.9.0 y se analizaron las secuencias en la plataforma BLAST, se descargaron hasta 10 secuencias del GenBank con similitudes mayores al 98% para generar un alineamiento múltiple con el programa ClustalX versión 2.0, el alineamiento se editó para generar la secuencia consenso con el programa Seaview versión 4.0. Se analizó la secuencia consenso en la plataforma BLAST para generar una minería de secuencias homologas de las especies con mayor similitud; con la minería, se construyó un árbol filogenético por cada secuencia con el programa MEGA versión 6.0 (Tamura et al., 2013) para comparar la topología de la filogenia con el resultado de BLAST; el criterio de asignación de identidad fue que se tuvieran porcentajes de identidad mayores al 97% para nivel de especie, 95-96% para nivel de género y porcentajes de cobertura mayores al 85%, con base a lo descrito por Rosselló-Mora y Amann (2001).

### **Cepas de rizobacterias incluidas como control**

Para caracterizar la capacidad promotora de crecimiento de las cepas de rizobacterias aisladas de los esporomas del hongo ectomicorrízico se incluyeron tres cepas promotoras de crecimiento como referencia: P61 (*Pseudomonas tolaasii*), A46 (*P. tolaasii*) y Bsp1.1 (*Pae-nibacillus* sp.); estas cepas fueron obtenidas del laboratorio de Microbiología, del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de Mé-

xico. Las cepas produjeron indoles, solubilizaron fosfatos, incrementaron germinación de semillas y el crecimiento de plantas (datos no publicados). El hongo fitopatógeno utilizado en la prueba de antagonismo fue *Rhizoctonia* sp., aislado de chile poblano (*Capsicum annuum* L.) que fue también obtenido del laboratorio de Microbiología ya mencionado.

#### **Capacidad de solubilización de fosfato**

Las cepas de rizobacterias se sembraron en medio Pikovskaya y se incubaron durante 7 días a 28 °C en agitación. El medio contiene (por litro): 10 g de glucosa; 5 g de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ; 0,5 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,2 g de NaCl; 0,1 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,2 g de KCl; 0,5 g de extracto de levadura; 0,002 g de  $\text{MnSO}_4$  y 0,002 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; pH 7. El cultivo bacteriano se centrifugó a 7000 rpm durante 10 min; del sobrenadante se tomaron alícuotas de 150  $\mu\text{L}$  de muestra y se depositaron en microplacas de 96 pozos (microplates Costar 3591, Corning, NY); se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de molibdato y 50  $\mu\text{L}$  de vanadato, y se mezclaron. Se dejó reaccionar durante cinco minutos y después las muestras se leyeron en un espectrofotómetro (Synergy 2 microplate reader, Biotek Instruments, Inc.) a 420 nm. El fosfato soluble se cuantificó a través de una curva estándar elaborada con diferentes concentraciones de fosfato (0, 20, 40, 60, 100, 150, 200, 250, 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). El diseño experimental utilizado fue completamente al azar (tres repeticiones por cepa). Los datos se analizaron mediante el paquete estadístico SAS versión 9.0; se hizo comparación de medias (Tukey,  $P = 0,05$ ).

#### **Producción de indoles totales**

Las cepas bacterianas se cultivaron en tubos con 5 mL de medio Luria-Bertani (por litro: 10 g Triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g NaCl, 1 g de Triptófano y 20 g de agar) a 28 °C

en agitación (150 rpm). Muestras de cultivo bacteriano se obtuvieron a las 24, 48 y 72 h. Después los cultivos se centrifugaron a 7000 rpm durante 15 min; se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de sobrenadante de cada muestra y se depositaron en microplacas de 96 pozos (Microplates Costar 3591, Corning, NY); se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de solución Salkowski (2% de  $\text{FeCl}_3$  0,5 M en ácido perclórico al 35%) y se incubó durante 30 min en oscuridad. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro (Synergy 2 microplate reader, Biotek instruments, Inc.) a 530 nm. La concentración de indoles se estimó a partir de una curva estándar de concentraciones conocidas de ácido indolacético (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) que se procesaron de la misma forma que las muestras (Hynes et al., 2008). El diseño experimental utilizado fue completamente al azar (tres repeticiones por cepa). Los datos se procesaron, se analizaron estadísticamente y se determinaron las medias y el error estándar.

#### **Producción de sideróforos**

Las cepas bacterianas se sembraron en caldo nutritivo durante tres días a 28 °C en agitación. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a 7000 rpm durante 15 min y se realizaron tres lavados con agua estéril bidestilada para eliminar rastros de oligoelementos. La pastilla se resuspendió en 5 mL de agua bidestilada. La siembra se realizó agregando 10  $\mu\text{L}$  de la suspensión bacteriana en las placas con medio CAS (Schwyn y Neilands, 1987; Loudon et al., 2011). Las mediciones se realizaron una vez que se observó la formación de halos de color amarillo o naranja (se midió el diámetro de los halos). El diseño experimental utilizado fue completamente al azar (tres repeticiones por cepa). Los datos se analizaron mediante el paquete estadístico SAS versión 9.0; se hizo comparación de medias (Tukey,  $P = 0,05$ ).

### **Capacidad antagonica de rizobacterias contra *Rhizoctonia* sp.**

Las cepas bacterianas se cultivaron en caldo nutritivo (Merck), en agitación durante 3 días. La cepa de *Rhizoctonia* sp. se propagó en cajas con medio papa dextrosa agar (PDA, Merck) hasta que el hongo cubrió la superficie del medio. Las muestras de los cultivos bacterianos se tomaron con un asa y se sembraron en línea recta en un extremo de cada caja Petri con medio PDA. A las 24 h posteriores, se sembró un disco de cultivo del hongo en frente de la bacteria, a una distancia de 4 cm. A los 6 días posteriores, se midió el crecimiento radial del hongo fitopatógeno. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo mediante la fórmula: % Inhibición =  $(R - r) \times 100 / R$ , donde: R es la longitud del hongo en el testigo, r es la longitud del hongo en cada uno de los tratamientos en presencia del antagonista. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento y los datos fueron analizados con el paquete estadístico SAS versión 9.0; se realizó la comparación de medias (Tukey, P = 0,05).

### **Ensayo de germinación de semillas**

En este ensayo se utilizaron semillas de chile Serrano (*Capsicum annuum* L.), que estuvieron almacenadas durante dos años a temperatura ambiente, las cuales tenían una germinación de 20% en promedio. Las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 3% durante 5 min. Las semillas se colocaron sobre toallas de papel de 23 x 8 cm, humedecidas con agua destilada estéril, y se inocularon distribuyendo 2 mL de suspensión bacteriana con una carga de  $10^7$  células mL<sup>-1</sup> en cada toalla. Las cepas bacterianas se cultivaron previamente en caldo nutritivo durante tres días en agitación a 180 rpm. Los tratamientos consistieron en 9 cepas bac-

terianas y un testigo, con caldo nutritivo sin bacteria, establecidos en un diseño experimental completamente al azar. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones con 20 semillas cada una. Se determinó el porcentaje de semillas germinadas por tratamiento a los 5 días después de la inoculación y la longitud de la radícula a los 7 días después de la germinación. Los datos fueron analizados usando el paquete estadístico SAS versión 9.0; se realizaron análisis de varianza y pruebas de comparación de medias (Tukey, P = 0,05).

### **Inoculación de rizobacterias en plántulas de chile Serrano**

Las semillas de chile Serrano utilizadas en el experimento vienen de un lote nuevo que tenía una germinación de 95%. Estas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3% durante 5 min. Se sembraron semillas en cada charola de 30 x 20 cm, que contenían arena previamente esterilizada en autoclave durante 3 h durante 3 días consecutivos, en tres hileras de 10 semillas. Las cepas de rizobacterias se cultivaron en caldo nutritivo (Merck) durante 4 días en agitación a 180 rpm hasta obtener una concentración de  $10^9$  células mL<sup>-1</sup>; se adicionó 15 mL de inóculo bacteriano por charola, distribuyéndolo uniformemente. La humedad se mantuvo con riegos de agua destilada estéril y con aplicación de solución nutritiva Long Ashton alternadamente. La solución contiene por litro: 5 mL de KNO<sub>3</sub>; 5 mL de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 5 mL de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O; 1,34 mL de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O; micronutrientes [MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, NaCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>MO<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O] y citrato férrico (FeC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>; H<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O a pH 5,8). La solución nutritiva aplicada fue diluida en concentración de 1:10. A los 45 días se cosechó y se evaluó peso seco total de plántula. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 30 plántulas por tratamiento (10 tratamientos en total incluyendo

al testigo). Los datos fueron analizados usando el paquete estadístico SAS versión 9.0 y se realizaron análisis de varianza y comparación de medias (Tukey  $P = 0,05$ ).

## Resultados

Se aislaron seis cepas de rizobacterias de esporomas de hongos ectomicorrízicos, cinco de ellas correspondieron a tres especies de *Pseudomonas*: *P. azotoformans*, *P. yamanorum* y *P. helmanticensis*, otra más pertenece a la especie de *Rouxiella silvae*, con porcentajes de identidad entre 98,8 a 100% (Tabla 1 y Figura 1). Estas cepas fueron caracterizadas por su potencial de promover el crecimiento vegetal. Además, se incluyeron tres cepas control de referencia con características probadas como promotoras de crecimiento vegetal (P61, *Pseudomonas tolaasii*; A46, *P. tolaasii*; Bsp1.1, *Paenibacillus* sp.). En total se caracterizaron y evaluaron nueve cepas de rizobacterias.

### Capacidad de solubilización de fosfatos

En este estudio todas las cepas solubilizaron fosfatos en el medio Pikovskaya. La solubilización fue de 40,4 a 122,6  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , a los siete días de crecimiento del cultivo bacteriano. La cepa con mayor solubilización fue OLSf1 con 122,6  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , en contraste con las cepas de referencia que presentaron menores niveles (P61 con 92,3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , Bsp1.1 con 83,602  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y A46 con 59,292  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) como se muestra en la Figura 2A.

### Producción de indoles

Todas las cepas produjeron indoles, aunque la mayoría en baja cantidad. Las cepas sobresalientes en producir indoles fueron: OLSf1 con 31  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , OLSf3 con 20,26  $\mu\text{g mL}^{-1}$  am-

bas aisladas de esporomas de *Lactarius salmonicolor* y la cepa de referencia P61 con 13  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Estos niveles los alcanzaron a las 72 h. La producción de indoles fluctuó de 2,5 a 31  $\mu\text{g mL}^{-1}$  dependiendo del tiempo de crecimiento de las cepas de rizobacterias. Cinco cepas produjeron indoles en niveles inferiores a 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , que incluso tendieron a disminuir con el tiempo de incubación (Figura 2B).

### Capacidad antagónica contra *Rhizoctonia* sp.

De las nueve cepas evaluadas solo cuatro resultaron con actividad antagónica marcada contra *Rhizoctonia* sp., tres de ellas fueron las cepas de referencia y solo una fue del grupo de las aisladas de los esporomas del hongo ectomicorrízico. En el caso del testigo sin cepa rizobacteriana, el hongo creció cubriendo toda la caja con un radio frontal de 65 mm. En los tratamientos con las cepas de referencia el radio del hongo fue de 34 a 36 mm, lo que correspondió a porcentajes de inhibición entre 45 y 47%, mientras que con la cepa OLSf3 el radio del hongo fue de 40 mm, que equivale a una inhibición de 39% con respecto al testigo. Esta última cepa fue aislada de *Lactarius salmonicolor* (Tabla 2).

### Producción de sideróforos

La producción de sideróforos es una característica muy importante en cepas de rizobacterias debido a que les otorga la capacidad de establecerse en condiciones donde el hierro está en baja disponibilidad y controlar fitopatógenos al secuestrar hierro. Ocho cepas de rizobacterias evaluadas en este trabajo fueron positivas para la prueba de sideróforos, de las cuales las más sobresalientes fueron: OLSf3 con un halo de 15,2 mm de diámetro, P61 con 15 mm y OLSf2.3 con 13,2 mm. La cepa Bsp1.1 no fue capaz de crecer en el medio específico CAS (Tabla 2).

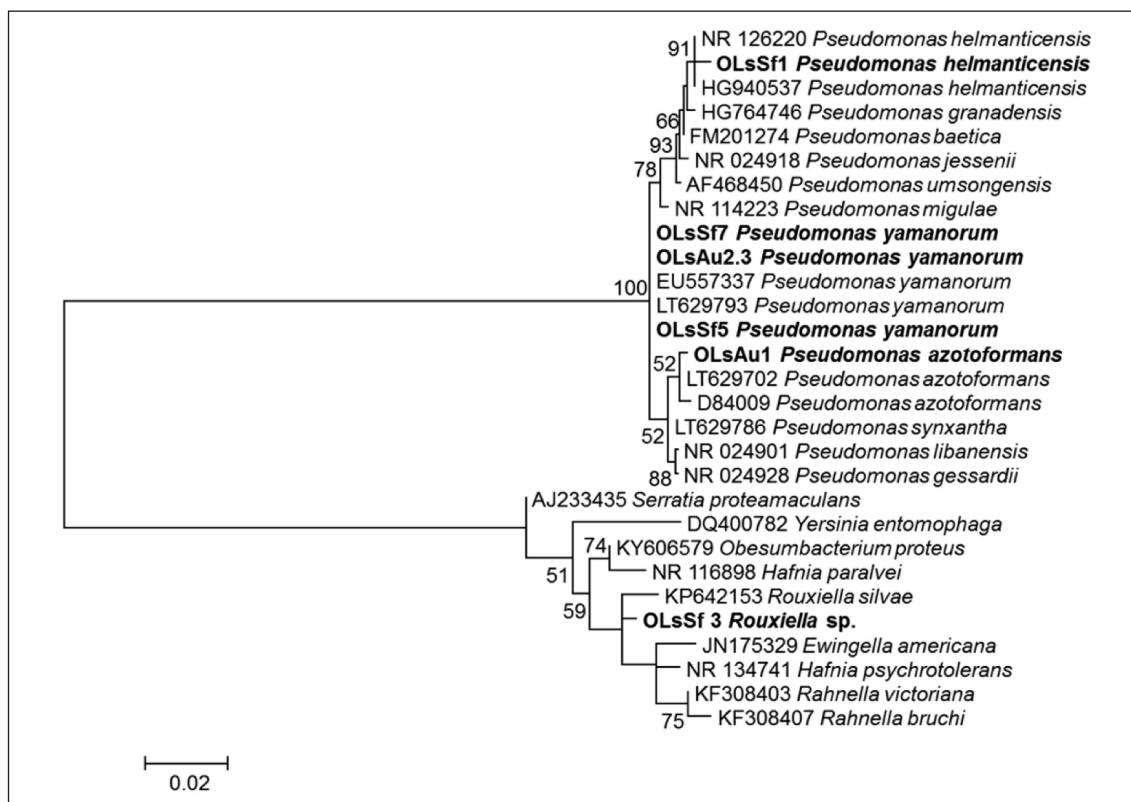


Figura 1. Árbol filogenético generado con el programa MEGA 7 utilizando el método de máxima verosimilitud y el modelo de sustitución nucleotídica HKY+G+I; los números en los nodos indican los valores de bootstrap con 1000 repeticiones.

Figure 1. Phylogenetic tree generated with the MEGA 7 program using the maximum verisimilitude method and the nucleotide substitution model HKY + G + I; the numbers on the nodes indicate the bootstrap values with 1000 repetitions.

Tabla 1. Identificación molecular de las cepas aisladas de esporoma de *Lactarius salmonicolor*.

Table 1. Molecular identification of strains isolated from *Lactarius salmonicolor* sporome.

Cepa	Identidad (%)	Numero de acceso Genbank	Secuencia referencia en el GenBank
OLSAu1	99,5	MF598585	LT629702 <i>Pseudomonas azotoformans</i>
OLSAu2.3	100,0	MF598587	EU557337 <i>Pseudomonas yamanorum</i>
OLSf1	99,5	MF598586	HG940537 <i>Pseudomonas helmanticensis</i>
OLSf3	98,8	MF598584	KP642153 <i>Rouxiella silvae</i>
OLSf5	100,0	MF598588	EU557337 <i>Pseudomonas yamanorum</i>
OLSf7	100,0	MF598589	EU557337 <i>Pseudomonas yamanorum</i>

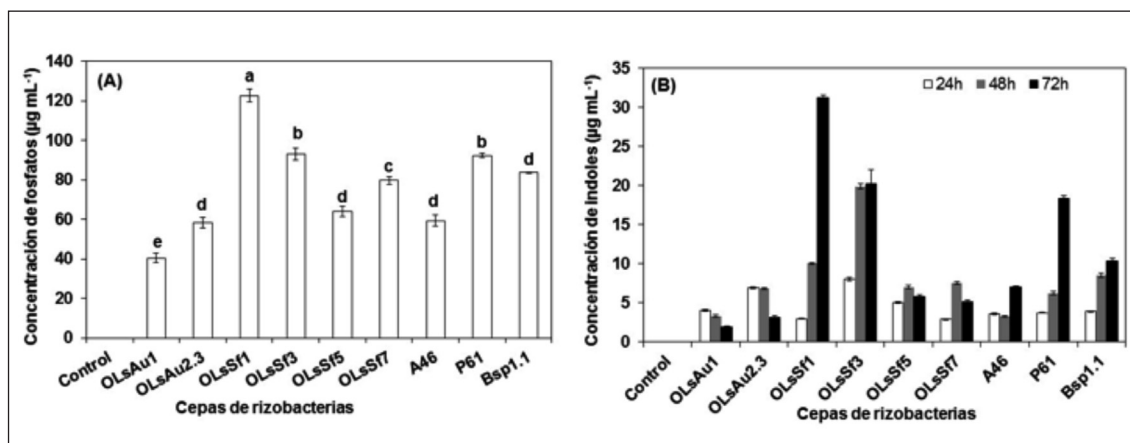


Figura 2. Solubilización de fosfatos (A) y producción de indoles (B) de cepas de rizobacterias. Letras idénticas sobre las barras no son significativamente diferentes (Tukey,  $P \leq 0,05$ ),  $n = 3$ . Las barras verticales indican el error estándar.

Figure 2. Solubilization of phosphate (A) and production of indole (B) of strains of rhizobacteria. Identical letters on the bars are not significantly different (Tukey,  $P \leq 0.05$ ),  $n = 3$ . Vertical bars indicate the standard error.

Tabla 2. Inhibición del crecimiento radial de *Rhizoctonia* sp., producción de sideróforos y efecto de diferentes cepas de rizobacterias en la germinación y longitud de la radícula en chile Serrano.  
Table 2. Inhibition of the radial growth of *Rhizoctonia* sp., production of siderophores and effect of different strains of rhizobacteria on the germination and length of the radicle in Serrano chilli.

Tratamientos	Inhibición de <i>Rhizoctonia</i> sp. (%)	Sideróforos (halo en mm)	Germinación (%)	Longitud de la radícula (mm)
Control	0 c	—	18 bc	5 cde
OLsAu1	26 b	9 abc	15 bc	4 de
OLsAu2.3	7 c	13 ab	38 abc	17 a
OLsSf1	7 c	3 de	20 bc	8 cbd
OLsSf3	39 a	15 a	7 c	5 cde
OLsSf5	7 c	5 cde	47 ab	9 bc
OLsSf7	6 c	7 bcd	70 a	11 b
A46	45 a	8 bcd	42 ab	9 cb
P61	47 a	15 a	25 bc	7 cbd
Bsp1.1	45 a	0 e	17 bc	3 e

— Sin actividad. Medias con la misma letra en cada columna no son significativamente diferentes (Tukey,  $P \leq 0,05$ ).



### Ensayo de germinación de semillas de Chile Serrano

La cepa OLSf7 tuvo el mayor porcentaje de semillas germinadas con 70%, le siguieron las cepas OLSf5 con 47% y A46 con 42% de germinación; mientras que el testigo solo tuvo 18% de germinación. En el caso de la longitud de la raíz las mejores cepas fueron: OLSAu 2.3 con 16,7 mm y OLSf7 con 10,7 mm como se muestra en el Tabla 2.

### Inoculación de rizobacterias en plántulas de Chile Serrano en invernadero

Las cepas evaluadas bajo condiciones de invernadero presentaron un efecto positivo en el peso seco total de las plántulas, las mejores fueron: OLSf5 con 27 mg, OLSAu1 con 26 mg, OLSAu2.3 con 24,7 mg todas ellas aisladas del hongo ectomicorrízico y la cepa de referencia A46 con 26 mg (Figura 3). Estas cepas incrementaron el peso seco total en más de 42% con respecto al testigo que tuvo un peso de 17 mg.

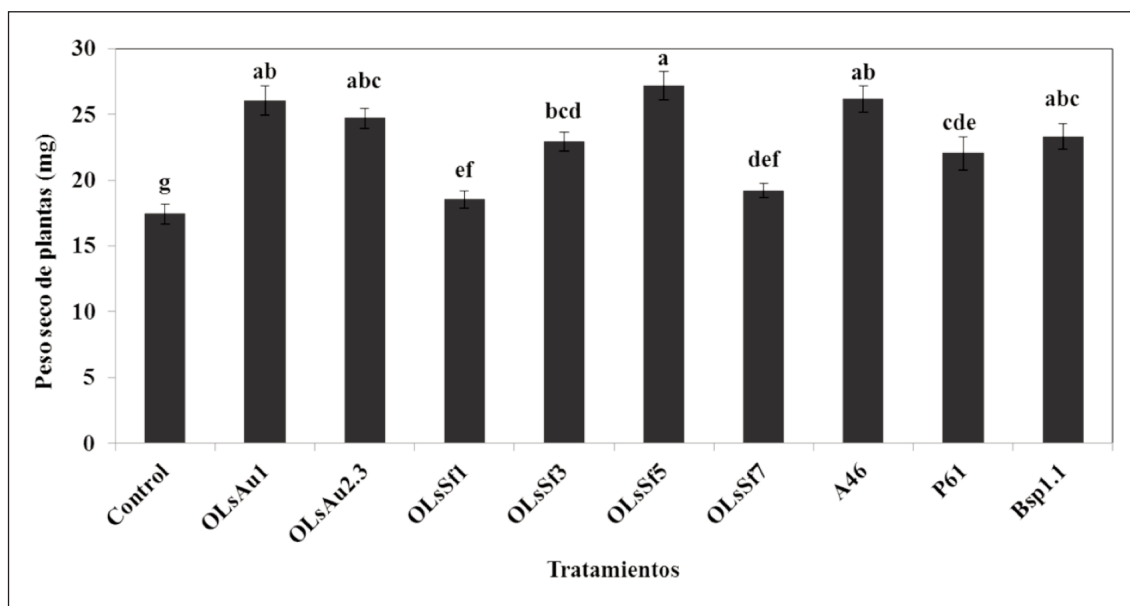


Figura 3. Crecimiento de plántulas de Chile Serrano bajo condiciones de invernadero a los 45 días después de la inoculación. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey,  $P \leq 0,05$ ),  $n = 30$ . Las barras verticales indican el error estándar.

Figure 3. Growth of Serrano pepper seedlings under greenhouse conditions at 45 days after inoculation. Means with the same letter are not significantly different (Tukey,  $P \leq 0.05$ ),  $n = 30$ . Vertical bars indicate the standard error.

## Discusión

De los esporomas de hongos ectomicorrízicos se aislaron seis cepas de rizobacterias: cinco de ellas pertenecen al grupo de las *Pseudomonas* (*P. azotoformans*, *P. yamanorum*, *P. helmanticensis*) y una cepa corresponde a *Rouxiella silvae* (Tabla 1 y Figura 1). Lo cual sugiere que el género *Pseudomonas* es común en esporomas de *Lactarius salmonicolor*. En estudios de diversidad bacteriana en esporomas de hongos ectomicorrízicos se ha observado que Proteobacteria es el Phylum predominante (Pent et al., 2017), y se han encontrado especies de bacterias de los géneros: *Burkholderia*, *Collimonas*, *Dyella*, *Mesorhizobium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sphingomonas*, *Bacillus* y *Paenibacillus* (Aspray et al., 2006; Uroz et al., 2013; Pent et al., 2017). De acuerdo a otros estudios, la especie de *Pseudomonas azotoformans* presenta tolerancia a factores de estrés como sequía, salinidad, temperatura, metales y antibióticos, además se ha reportado como promotora del crecimiento vegetal (solubilizadora de fósforo, fijadora de nitrógeno y con actividad ACC desaminasa) y biocontroladora de hongos fitopatógenos (Fang et al., 2016; Ma et al., 2017; Sritongon et al., 2017). En el caso de *P. yamanorum* y *P. helmanticensis* son especies reportadas en años recientes y que se aislaron de suelos forestales. La primera se aisló en Argentina, es tolerante a bajas temperaturas y produce antimicrobianos, La segunda fue aislada por primera vez en España y tiene capacidad de solubilizar fosfatos (Ramírez-Bahena et al., 2014; Arnau et al., 2015). La especie *Rouxiella silvae* es otra especie nueva que fue aislada de pantanos en Alemania y produce surfactantes (Le Flèche-Matéos et al., 2017). En nuestro trabajo, las cepas de *Pseudomonas* y de *Rouxiella* antes descritas, fueron aisladas de esporomas de *Lactarius salmanicolor* en bosques de *Abies religiosa* y presentaron atributos relacionados con la promoción del crecimiento vegetal y tuvieron

efecto en plántulas de chile Serrano, una hortaliza ampliamente cultivada en México.

En esta investigación, todas las cepas de rizobacterias aisladas de esporomas de hongos ectomicorrízicos solubilizaron fosfato con niveles mínimos de  $40,4 \mu\text{g mL}^{-1}$  y máximos de  $122,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 2A). Estos valores se encuentran dentro del rango reportado para otros microorganismos que solubilizan fosfatos en concentraciones de  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  hasta  $237,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , que está asociado a la producción de ácidos orgánicos (Hussein y Joo, 2015; Zeng et al., 2017). En el presente trabajo, las cepas fueron aisladas de esporomas de *Lactarius salmonicolor* colectados en un rodal de oyamel del Monte Tláloc, donde los suelos son andosoles, los cuales tienen el atributo de retener el fósforo. Probablemente, el tipo de suelo haya sido un factor que influye en la adaptación de las rizobacterias a limitantes de fósforo, por lo que todas las cepas aisladas presentaron capacidad de solubilizar fosfatos, aunque en diferente magnitud.

Una característica valiosa en rizobacterias que promueven el crecimiento vegetal es la producción de auxinas. Se conocen varios géneros de bacterias como son *Azospirillum*, *Flavobacterium* y *Streptomyces*, que bajo ciertas condiciones producen ácido indolacético. Por ejemplo, *Pseudomonas fluorescens*, aislada de la rizosfera, sintetizó de  $17,7$  a  $95,9 \mu\text{g mL}^{-1}$  de auxinas, *Azotobacter* spp. produjo auxinas en un rango de  $7,3$  a  $32,8 \text{ mg mL}^{-1}$  y tiene potencial en la agricultura (Ahmad et al., 2005; Pavlova et al., 2017). En esta investigación las cepas produjeron niveles de indoles entre  $2,5$  y  $31 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 2B) comparables con lo reportado por Hussein y Joo (2015), donde sus cepas produjeron indoles desde  $0,17 \mu\text{g mL}^{-1}$  hasta  $48 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

El antagonismo de rizobacterias hacia hongos fitopatógenos ha sido reportado por investigadores como Browsers y Parke (1993) y Alexandrova et al. (2002), quienes observa-

ron que las rizobacterias son efectivas en el control de hongos fitopatógenos. La actividad inhibitoria que ejercen las rizobacterias sobre los fitopatógenos es a través de diferentes mecanismos como la producción de antibióticos, sideróforos, enzimas líticas y competencia por espacio y nutrientes (Naing et al., 2014; Müller et al., 2016). De las nueve cepas de rizobacterias evaluadas en este trabajo solo cuatro (P61, Bsp1.1, A46 y OLSf3) fueron capaces de inhibir en más de 40% el crecimiento de *Rhizoctonia* sp. (Tabla 2).

La mayoría de las cepas tuvieron capacidad de producir sideróforos como lo indicó el ensayo en el medio de cultivo CAS (Tabla 2), se observaron diferentes tonalidades de color en los halos que fueron desde el amarillo al naranja, estos cambios de color se debieron al secuestro del hierro por los sideróforos liberados por las bacterias. Las especies de *Pseudomonas* han sido reportadas como productoras de sideróforos en otros trabajos (Maleki et al., 2010). En el presente estudio solo la cepa de rizobacterias Bsp1.1 que pertenece al grupo de *Paenibacillus* sp. no produjo sideróforos.

Cuatro cepas incrementaron la germinación de semillas y longitud de radícula, particularmente fue notorio el efecto de la cepa OLSf7 con 70% de semillas germinadas considerando que el testigo solo tuvo 18% de germinación. El incremento en la germinación se atribuye a la producción de fitohormonas, particularmente de giberelinas. La germinación es un proceso regulado principalmente por el balance entre el ácido abscísico y giberelinas. Estas últimas rompen la dormancia y estimulan la germinación, reduciendo los niveles de ácido abscísico. Aunque hay otros factores que también intervienen (especies reactivas de oxígeno, especies reactivas de nitrógeno y el etileno), estas dos se consideran hormonas clave en el proceso de germinación (Shu et al., 2016). Es muy probable que el efecto estimulador de la inoculación de las cepas de rizobacterias se deba a producción de giberelinas.

La inoculación de rizobacterias produjo mayor biomasa en plántulas de *Capsicum annuum* L., especialmente las plántulas tratadas con las cepas OLSf5, OLSAu1 y OLSAu2.3 aisladas de *Lactarius salmonicolor* y la cepa control A46 fueron las que presentaron el mayor peso seco total con valores de más de 24 mg en comparación con el testigo que tuvo 17.4 mg (Figura 3). Huang et al. (2017) reportan que el peso seco es una variable confiable para evaluar la promoción del crecimiento en plantas. Las cuatro cepas bacterianas que promovieron el crecimiento vegetal en plántulas de chile en condiciones de invernadero pertenecen al grupo de las *Pseudomonas*. Existen varios estudios que remarcan el efecto positivo de la inoculación de cepas bacterianas de *Pseudomonas*, por ejemplo, estas especies juegan un papel ecológico importante en la rizosfera de garbanzo y arroz asociadas con actividades en la producción de sideróforos, auxinas, ACC desaminasa, solubilización de fosfatos y la fijación biológica de nitrógeno (Singh, 2015; Pham et al., 2017). No obstante, en el presente trabajo se observó que las cepas que incrementaron el peso seco en plántulas de chile no fueron aquellas con los mayores niveles de solubilización de fosfatos, producción de indoles, sideróforos y actividad antagonica. El efecto de las cepas en el peso seco en plántulas de chile Serrano puede posiblemente estar relacionado con la compatibilidad entre el cultivo y la bacteria, es decir la interacción entre planta-rizobacteria. Se ha observado que los efectos positivos o negativos en la inducción del crecimiento vegetal están relacionados con la capacidad de las rizobacterias para colonizar la raíz (Maleki et al., 2010). Los efectos positivos en plántulas encontrados en este trabajo se atribuyen a las características que presentan las cepas relacionadas con la promoción de crecimiento vegetal, de acuerdo con lo reportado en otros estudios y a la compatibilidad de las rizobacterias con la especie vegetal (Prasad y Babu, 2017).

## Conclusión

Cepas de rizobacterias asociadas a esporomas de hongos ectomicorrízicos presentaron capacidad de solubilizar fosfatos, producir indoles y sideróforos e inhibir a *Rhizoctonia* sp. Así mismo, la inoculación de estas cepas favoreció la germinación de semillas y estimuló el crecimiento vegetal en plántulas de Chile Serrano. Las cepas pueden ser utilizadas en cultivos agrícolas para incrementar el crecimiento de plántulas e incluso pueden superar a cepas de rizobacterias aisladas de especies vegetales cultivadas. Este estudio muestra que los bosques son una fuente de recursos microbianos con potencial biotecnológico que pueden usarse en cultivos agrícolas.

## Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el proyecto SAGARPA-CONACYT "Mejoramiento integral de la productividad en el cultivo de Chile en México para mejorar la competitividad mediante el incremento del rendimiento y calidad" y por el Colegio de Postgraduados. El primer autor agradece la beca brindada por el Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

## Referencias bibliográficas

- Ahmad F, Ahmad I, Khan MS (2005). Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. Turkish Journal of Biology 29: 29-34.
- Alexandrova M, Bazzi C, Lameri P (2002). *Bacillus subtilis* strain BS-F3: colonization of pear organs and its action as a biocontrol agent. Acta Horticulturae 590: 291-297.
- Arnau VG, Sánchez LA, Delgado OD (2015). *Pseudomonas yamanorum* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from a subantarctic environment. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 65(2): 424-431.
- Aspray TJ, Frey-Klett P, Jones JE, Whipps JM, Garbaye J, Bending GD (2006). Mycorrhization helper bacteria: a case of specificity for altering ectomycorrhiza architecture but not ectomycorrhiza formation. Mycorrhiza 16(8): 533-541.
- Baldrian P (2017). Forest microbiome: diversity, complexity and dynamics. FEMS Microbiology Reviews 41(2): 109-130.
- Browers JH, Parke JL (1993). Epidemiology of *Pythium* damping-off and *Aphanomyces* root rot of peas after seed treatment with bacterial agents for biological control. Phytopathology 83(12): 1466-1473.
- Dominguez-Núñez JA, Medina M, Berrocal-Lobo M, Anriquez A, Albanesi A (2015). The combined effects of *Pseudomonas fluorescens* CECT 844 and the black truffle co-inoculation on *Pinus nigra* seedlings. IForest 8(5): 624-630.
- Fang Y, Wu L, Chen G, Feng G (2016). Complete genome sequence of *Pseudomonas azotoformans* S4, a potential biocontrol bacterium. Journal of Biotechnology 227: 25-26.
- Fatemeh A, Masoud T, Pejman A, Aidin H (2014). Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) and stratification on germination traits of *Crataegus pseudoheterophylla* Pojark. seeds. Scientia Horticulturae 172: 61-67.
- Huang P, De-Bashan L, Crocker T, Kloepper JW, Bashan Y (2017). Evidence that fresh weight measurement is imprecise for reporting the effect of plant growth-promoting (rhizo) bacteria on growth promotion of crop plants. Biology and Fertility of Soils 53(2): 199-208.
- Hussein KA, Joo JH (2015). Isolation and characterization of rhizomicrobial isolates for phosphate solubilization and indole acetic acid production. Applied Biological Chemistry 58(6): 847-855.
- Hynes RK, Leung GC, Hirkala DL, Nelson LM (2008). Isolation, selection, and characterization of beneficial rhizobacteria from pea, lentil, and chickpea grown in western Canada. Canadian Journal of Microbiology 54(4): 248-258.

- Johansson JF, Paul LR, Finlay RD (2004). Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiology Ecology* 48(1): 1-13.
- Le Flèche-Matéos A, Kügler JH, Hansen SH, Sylдатk C, Hausmann R, Lomppez F, Vandenbogaert M, Manuguerra JC, Grimont PA (2017). *Rouxiella badensis* sp. nov. and *Rouxiella silvae* sp. nov. isolated from peat bog soil and emendation description of the genus *Rouxiella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67(5): 1255-1259.
- Louden BC, Haarmann D, Lynne AM (2011). Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *Journal of Microbiology and Biology Education* 12(1): 51-53.
- Ma Y, Rajkumar M, Moreno A, Zhang C, Freitas H (2017). Serpentine endophytic bacterium *Pseudomonas azotoformans* ASS1 accelerates phytoremediation of soil metals under drought stress. *Chemosphere* 185: 75-85.
- Maleki M, Mostafae S, Mokhtarnejad L, Farzaneh M (2010). Characterization of *Pseudomonas fluorescens* strain CV6 isolated from cucumber rhizosphere in varamin as a potential biocontrol agent. *Australian Journal of Crop Science* 4(9): 676-683.
- Müller T, Behrendt U, Ruppel S, Von Der Waydbrink G, Müller ME (2016). *Fluorescent Pseudomonads* in the phyllosphere of wheat: Potential antagonists against fungal phytopathogens. *Current Microbiology* 72(4): 383-389.
- Nadeem SM, Ahmad M, Zahir ZA, Javaid A, Ashraf M (2014). The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnology Advances* 32(2): 429-448.
- Naing KW, Anees M, Kim SY, Nam Y, Kim YC, Kim KY (2014). Characterization of antifungal activity of *Paenibacillus ehimensis* KWN38 against soilborne phytopathogenic fungi belonging to various taxonomic groups. *Annals of Microbiology* 64: 55-63. DOI: 10.1007/s13213-013-0632-y.
- Navya HM, Naveen J, Hariprasad P, Niranjana SR (2015). Beneficial rhizospheric microorganisms mediated plant growth promotion and suppression of aflatoxigenic fungal and aflatoxin contamination in groundnut seeds. *Annals of Applied Biology* 167(2): 225-235.
- Pavlova AS, Leontieva MR, Smirnova TA, Kolomeitseva GL, Netrusov AI, Tsavkelova EA (2017). Colonization strategy of the endophytic plant growth-promoting strains of *Pseudomonas fluorescens* and *Klebsiella oxytoca* on the seeds, seedlings and roots of the epiphytic orchid, *Dendrobium nobile* Lindl. *Journal of Applied Microbiology* 123: 217-232. DOI: 10.1111/jam.13481.
- Pent M, Põldmaa K, Bahram M (2017). Bacterial communities in boreal forest mushrooms are shaped both by soil parameters and host identity. *Frontiers in Microbiology* 8: 836. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00836.
- Pham VT, Rediers H, Ghequire MG, Nguyen HH, De Mot R, Vanderleyden J, Spaepen S (2017). The plant growth-promoting effect of the nitrogen-fixing endophyte *Pseudomonas stutzeri* A15. *Archives of Microbiology* 199(3): 513-517.
- Prasad AA, Babu S (2017). Compatibility of *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in growth promotion of groundnut (*Arachis hypogea* L.). *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 89(2): 1027-1040.
- Ramírez-Bahena MH, Cuesta MJ, Flores-Félix JD, Mulas R, Rivas R, Castro-Pinto J, Brañas J, Mulas D, González-Andrés F, Velázquez E, Peix A (2014). *Pseudomonas helmanticensis* sp. nov., isolated from forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64(7): 2338-2345.
- Rosselló-Mora R, Amann R (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 25(1): 39-67.
- Schwyn B, Neilands JB (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160(1): 47-56.
- Shu K, Liu X-d, Xie Q, He Z-h (2016). Two faces of one seed: hormonal regulation of dormancy and germination. *Molecular Plant* 9(1): 34-45.
- Siebyla M, Hilszczanska D (2017). Biodiversity and the role of soil bacteria in a forest environment. *Sylwan* 161(2): 155-162.

- Singh BP (2015). Molecular and functional diversity of PGPR *fluorescent Pseudomonads* based on 16S rDNA-RFLP and RAPD markers. *Journal of Environmental Biology* 36: 1169-1178.
- Sritongon K, Mongkolthananuk W, Boonlue S, Jorgloy S, Puangbut D, Riddech N (2017). Rhizobacterial candidates isolated from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) rhizosphere for host plant growth promotion. *Chiang Mai Journal of Science* 44(1): 83-93.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30(12): 2725-2729.
- Uroz S, Oger P, Lepleux C, Collignon C, Frey-Klett P, Turpault MP (2011). Bacterial weathering and its contribution to nutrient cycling in temperate forest ecosystems. *Research in Microbiology* 162(9): 820-831.
- Uroz S, Courty PE, Pierrat JC, Peter M, Buée M, Turpault MP, Garbaye J, Frey-Klett P (2013). Functional profiling and distribution of the forest soil bacterial communities along the soil mycorrhizosphere continuum. *Microbial Ecology* 66(2): 404-415.
- Yang H, Lü G, Jiang H, Shi DN, Liu Z (2017). Diversity and distribution of soil micro-fungi along an elevation gradient on the north slope of Changbai Mountain. *Journal of Forest Research* 28(4): 831-839.
- Zeng Q, Wu X, Wen X (2017). Identification and characterization of the rhizosphere phosphate-solubilizing bacterium *Pseudomonas frederiksbergensis* JW-SD2 and its plant growth-promoting effects on poplar seedlings. *Annals of Microbiology* 67(3): 219-230.
- (Aceptado para publicación el 5 de septiembre de 2018)