

Detección de los genes *phlD* y *hcnC* en bacterias antagonistas productoras de sideróforos asociadas a *Rubus fruticosus* L.

Detection of the *phlD* and *hcnC* genes in antagonistic siderophore producing bacteria associated to *Rubus fruticosus* L.

Gustavo Santoyo¹

Benjamín Hernández Flores¹

Julie Hernández Salmerón¹

Daniel Rojas Solís¹

Miguel Contreras Pérez¹

Pedro D. Loeza Lara²

Ma. del Carmen Orozco Mosqueda³

¹ Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas

² Universidad de La Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo, Genómica Alimentaria

³ Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”

Autora para correspondencia: Ma. del Carmen Orozco Mosqueda, E-mail:

biocarmenorozco@gmail.com

Resumen

Introducción: Las plantas albergan un microbioma que incluye bacterias promotoras del crecimiento vegetal, las cuales pueden fungir como agentes biológicos que antagonizan el crecimiento de fitopatógenos, disminuyendo o eliminando su efectos nocivos en plantas. En este trabajo se evaluó la presencia de los genes antifúngicos *phlD* y *hcnC* con la producción de sideróforos (agentes quelantes de Fe) en bacterias aisladas de la endósfera y rizósfera de plantas de zarzamora (*Rubus fruticosus* L.).

Método: Se analizaron 410 aislados bacterianos asociados a plantas de zarzamora (*Rubus fruticosus* L.), provenientes de la rizósfera (205) y endosfera (205) para la detección de los genes antimicrobianos *phlD* y *hcnC* por reacción en cadena de la polimerasa y posterior secuenciación. La búsqueda de los genes se realizó únicamente en cepas productoras de sideróforos, utilizando el medio CAS (Cromo Azurol) para su producción. De las cepas seleccionadas, se realizaron los bioensayos de antagonismo contra los patógenos de plantas *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani* y *Rhizoctonia solani*.

Resultados: Los resultados de este trabajo muestran que, de los 410 aislados bacterianos analizados (50% rizosféricos y 50% endófitos), 70 aislados fueron productores de sideróforos (24 rizosféricas y 46 endófitas). Se observó que el 70% (49/70) de las cepas productoras de sideróforos, presentaron uno o dos de los genes *phlD* y/o *hcnC*. Las secuencias nucleotídicas de los genes *phlD* y/o *hcnC* mostraron una alta identidad con genes homólogos a las especies *Pseudomonas* sp., *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. protegens*, *P. putida* y *P. brassicacearum*. La abundancia del gen *hcnC* fue mayor en los aislados endófitos y rizosféricos (36/70), con respecto al gen *phlD* (13/70). Se detectaron mayoritariamente los genes *phlD* y/o *hcnC* en cepas aisladas de la endósfera (43/70), comparado con aquellas cepas rizosféricas (6/70). Finalmente, se observó una alta relación entre la producción de sideróforos, la presencia de genes *phlD* y/o *hcnC* y la actividad antagónica hacia los fitopatógenos *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani*.

Conclusión: Estos resultados muestran el potencial de identificar de forma rápida, eficiente y a bajo costo, mecanismos de antagonismo hacia fitopatógenos en bacterias asociadas a plantas de zarzamora (*Rubus fruticosus* L.), tales como la producción de sideróforos.

Palabras clave: biocontrol; 2,4-diacetilfloroglucinol; ácido cianhídrico; *Pseudomonas*

Abstract

Introduction: The plants harbor a microbiome that includes plant growth-promoting bacteria, which can act as biological agents that antagonize the growth of phytopathogens, diminishing or eliminating their harmful effects in plants. In this work, the presence and association of the *phlD* and *hcnC* antifungal genes with the production of siderophores (Fe chelating agents) in bacteria isolated from the endosphere and rhizosphere of blackberry plants (*Rubus fruticosus* L.) was evaluated.

Method: In total, 410 bacterial isolates associated with blackberry plants (*Rubus fruticosus* L.), from the rhizosphere (205) and endosphere (205) were analyzed for the detection of the *phlD* and *hcnC* antimicrobial genes by polymerase chain reaction and subsequent sequencing. The search of the genes was carried out only in siderophore producing strains, using the CAS medium (Chromium Azurol) for its production. Of the strains selected, antagonism bioassays were carried out against the plant pathogens *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani* and *Rhizoctonia solani*.

Results: The results showed that from the 410 bacterial isolates analyzed here (50% endophytes and 50% rhizospheric), it was confirmed that 70 strains were siderophores-producing (24 from rhizosphere and 46 endophytes). It was observed that 70% (49/70) of the siderophore producing strains present either one or two of the *phlD* or *hcnC* genes. The nucleotide sequences of the *phlD* and *hcnC* genes showed high identity to homologous genes to species *Pseudomonas* sp., *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. protegens*, *P. putida* and *P. brassicacearum*. The abundance of the *hcnC* gene was also higher in the endophytic and rhizospheric isolates (36/70), with respect to the *phlD* gene (13/70). Greater detection of *phlD* or *hcnC* genes was found in strains isolated from the endosphere (43/70), compared with those of rhizospheric origin (6/70). Finally, a high ratio was observed between the production of siderophores, the presence of genes *phlD* and *hcnC* with the antagonistic activity towards important phytopathogenic fungi, like *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani*.

Conclusion: These results showed the potential to identify quickly, efficiently and at low cost, mechanisms of antagonism towards phytopatogens in bacteria associated with blackberry plants (*Rubus fruticosus* L.), such as siderophore production.

Keywords: biocontrol; 2,4-diacetylphloroglucinol; hydrogen cyanide; *Pseudomonas*

Recibido en: 04-09-2019

Aceptado en: 27-11-2019

Introducción

México es uno de los principales productores y exportadores de frutillas (o berries) en el mundo. En nuestro país existen más de 26 mil hectáreas dedicadas a la producción de berries, donde destaca la producción de zarzamora cuenta con un 47.79% de dicha superficie, la fresa con el 38.09%, la frambuesa (9.03%) y el arándano (5.09%), las cuales generaron entre 80 y 100 mil empleos durante el año 2014. Actualmente, esta tendencia productiva de frutillas sigue creciendo. Datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) destacan al Estado de Michoacán como el productor más importante, seguido de Baja California, Jalisco y Guanajuato, ingresando al país cerca de 1,000 millones de dólares por exportación de frutillas (González *et al.*, 2019; <http://infosiap.siap.gob.mx> [accesado 2019]). Lo anterior remarca la importancia económica de esta actividad agrícola en México.

Los hongos fitopatógenos causan graves pérdidas económicas en los cultivos agrícolas, incluyendo, por supuesto, la producción de berries, siendo una práctica común es el uso de fungicidas para controlarlos (Heydari y Pessarakli, 2010). Sin embargo, está ampliamente reportado que dichos compuestos químicos dañan la microbiota benéfica asociada a las plantas, contaminan el ambiente y pueden causar diversas enfermedades en humanos y animales. Además, de limitar la exportación de productos agrícolas debido a las restricciones arancelarias (Adesemoye y Kloepper, 2009). Por lo tanto, se han buscado nuevas estrategias que sean efectivas para controlar dichos patógenos de plantas, siendo el uso de agentes biológicos una de las más empleadas actualmente (Glick, 2014).

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR (por sus siglas en inglés, Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) son agentes que resaltan por sus diversos mecanismos para antagonizar y controlar el crecimiento de fitopatógenos, disminuyendo los efectos nocivos en plantas. También, se ha reportado que las PGPR pueden promover al mismo tiempo, el crecimiento y la salud de las plantas. Las actividades de promoción del crecimiento vegetal se clasifican en mecanismos directos e indirectos, y son diversos los estudios que apoyan el uso de PGPR como agentes biológicos para biocontrolar enfermedades en cultivos de interés agrícola (Coutinho *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2012; Pandya *et al.*, 2015; Rashid *et al.*, 2012; Saini *et al.*, 2015; Santoyo *et al.*, 2012). Dentro de los mecanismos directos se mencionan aquellos en los que las bacterias influyen directamente en el crecimiento de las plantas, por ejemplo: pueden estimular la adquisición de nutrientes tales como el nitrógeno, hierro o fósforo, sintetizan

compuestos que potencian la inmunidad de las plantas (Resistencia Sistémica Inducida) y/o regulan los niveles de auxinas, giberelinas y citocininas (Ahmad *et al.*, 2008; Santoyo *et al.*, 2016). Por otra parte, los mecanismos indirectos incluyen aquellos en los que las bacterias producen compuestos con actividad antibiótica hacia los patógenos de las plantas, tales como lipopéptidos, fenazinas, sideróforos, el compuesto 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) y volátiles como la dimetilhexadecilamina (DMHDA) y el ácido cianhídrico (HCN) (Hernández-León *et al.*, 2015; Velázquez-Becerra *et al.*, 2013). Estos últimos compuestos (DAPG y HCN) se han reportado en diversas especies de *Pseudomonas*, incluyendo trabajos con las cepas UM16, UM240, UM256 y UM270, las cuales producen ambos compuestos y mostraron ser agentes de biocontrol efectivos contra patógenos como *Botrytis cinerea* (Hernández-León *et al.*, 2015). *B. cinerea* es un patógeno de más de 200 especies vegetales de importancia agrícola y causante de la enfermedad del moho gris, afectando las partes aéreas de la planta y pudrición de vegetales, frutas y flores después de la cosecha, incluyendo frutillas como la zarzamora (Williamson *et al.*, 2007).

Los compuestos HCN y DAPG son ampliamente producidos por cepas PGPR, incluyendo diversas especies de *Pseudomonas* (Santoyo *et al.*, 2012; Hernández-Salmerón *et al.*, 2016). Para la producción del HCN, el gen *hcnC* es importante, ya que codifica la subunidad C de la sintasa de ácido cianhídrico (o HCN sintasa), la cual cataliza la reacción para la formación del HCN a partir del aminoácido glicina (Laville *et al.*, 1998). Por otra parte, el gen *phlD* forma parte del operón *phlACBD* que participa en la biosíntesis del compuesto DAPG (Yang y Cao, 2012). En particular, el gen *phlD* codifica para una policétido sintasa, siendo la principal responsable de la producción de monoacetilfloroglucinol (MAPG), el cual es precursor directo de 2,4-DAPG mediante una acetilación llevada a cabo por los productos de los genes *phlA*, *phlB* y *phlC* (Banger y Thomashow, 1999; Mavrodi *et al.*, 2001). En un trabajo reciente, Hernández-Salmerón *et al.* (2018), detectaron que el patógeno *B. cinerea* modula la expresión *in vitro* de los genes *phlD* y *hcnC* de la cepa biofungicida *Pseudomonas fluorescens* UM270, destacando la comunicación e importancia de estos dos elementos genéticos en la interacción antagonista-fitopatógeno.

La producción de sideróforos (agentes quelantes de hierro) producidos por bacterias PGPR fue uno de los primeros mecanismos indirectos de promoción del crecimiento vegetal en ser descrito (Kloepper *et al.*, 1980). Los autores propusieron que el hierro del suelo es captado

por los sideróforos bacterianos, los cuales actúan como sistemas de transporte del elemento hacia las bacterias y lo hacen menos disponible para los patógenos. Diversos trabajos han demostrado que mediante este mecanismo, los sideróforos restringen el crecimiento de patógenos fúngicos que causan enfermedades en plantas (Weller , 2007). Cabe mencionar que la producción de sideróforos no está relacionada con la producción de compuestos como el HCN y DAPG, ya que su síntesis involucra rutas y elementos genéticos diferentes; pero que sin embargo, han sido encontrados en el mismo genoma de varias especies de pseudomonas fluorescentes (Almario *et al.*, 2017; Ahmad *et al.*, 2018; Hernández-Salmerón *et al.*, 2016).

Debido a la importancia de generar nuevos métodos para la búsqueda de mecanismos indirectos de promoción del crecimiento vegetal (o biocontrol) en bacterias benéficas (Santoyo *et al.*, 2019), en el presente trabajo se analizó si la producción de sideróforos en aislados bacterianos de la endósfera y rizósfera de plantas de zarzamora (*Rubus fruticosus* L.) como un marcador de selección de cepas de *Pseudomonas*, los cuales a su vez puedan encontrarse con otros elementos genéticos de biocontrol de patógenos, tales como los genes antifúngicos *phlD* y *hcnC*.

Método

Bacterias endófitas y rizosféricas asociadas a *R. fruticosus*

En el presente estudio se analizaron un total de 410 aislados bacterianos asociados a la endósfera y rizósfera de plantas de *R. Fruticosus*, obtenidos por Contreras *et al.* (2016). Brevemente, para aislar los endófitos los tejidos (raíz y tallo) de plantas sanas (o asintomáticas) se sumergieron en etanol al 70% durante 3 minutos, se lavaron con solución fresca de hipoclorito de sodio durante 5 minutos, se enjuagaron con etanol al 70% durante 30 segundos y finalmente se lavaron cinco veces con agua destilada estéril. Para confirmar que el proceso de esterilización fue exitoso, las

partes alícuotas del agua destilada estéril utilizada en el enjuague final se colocaron en cajas Petri con medio agar nutritivo. Las placas se examinaron para determinar que no hubiera crecimiento bacteriano después de 5 días de crecimiento en incubación a 28°C. Los aislados rizosféricos se obtuvieron a partir del suelo que se encontraba fuertemente adherido a las raíces de las plantas, para ser colocado en medio mínimo (Contiene en g/L: 13g de KH₂PO₄; 2g de (NH₄)₂SO₄; 5mg de FeSO₄; 25mg de MgSO₄; 4g de glucosa y 15g de agar; pH 7). Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas para ser inoculadas en medio mínimo con agar e incubando durante 3 días a 28°C. Se realizaron también dos procesos de purificación con el fin de tener aislados puros. Los aislados que se obtuvieron fueron mantenidos en glicerol al 50% y resembrados de manera rutinaria en cajas Petri con agar nutritivo (el agar nutritivo se adquirió de BD Bioxon y contiene en g/L: 5 gramos de peptona, 3 g de extracto de carne y 15 g de agar, con un pH final 6.8) al 20%, las cuales se incubaron por 48 h a 30 °C, previo a cada análisis.

Identificación de cepas productoras de sideróforos

Para la determinación de la producción de sideróforos, se utilizó el medio sólido CAS (Contiene cromo azurol sulfonato) en el cual se sembraron las cepas, posteriormente se incubaron por 72 h a 30 °C. Al finalizar este periodo, se seleccionaron las bacterias productoras de sideróforos tomando en cuenta la formación de un halo (amarillo-naranja) alrededor de la colonia. La producción de sideróforos por cada cepa se realizó por triplicado. El cambio de color de azul a amarillo-naranja indica la producción de sideróforos, debido a que los sideróforos exhiben una mayor afinidad por el hierro que el cromógeno (Santoyo *et al.*, 2019).

Amplificación de los genes *phlD* y *hcnC*

El ADN genómico se obtuvo de los aislados productores de sideróforos mediante el uso del Wizard® Genomic DNA Purification Kit de Promega®. A través de la PCR se amplificaron los genes *phlD* y *hcnC*. Para la detección de los genes *phlD* se emplearon los oligonucleótidos *phl2a* 5'-GAGGACGTCGAAGACCACCA-3' y *phl2b* 5'-ACCGCAGCATCGTGTATGAG-3' (Raaijmakers *et al.*, 2001); mientras que para detectar los genes *hcnC* se usaron los oligonucleótidos *FhcnC* 5'-GCGGGGTGATTTTCTTTCGG-3' y *RhcnC* 5'-GTACAGCGCGTTGGATTGC-3', diseñados en este trabajo a través del alineamiento de múltiples secuencias *hcnC* de diversas cepas de *Pseudomonas*. Se empleó la cepa K12 de *E. coli* como control negativo para la amplificación de ambos genes; así como los respectivos controles sin ADN templado (no mostrados en el gel de la Fig. 2). Los productos de PCR se amplificaron por duplicado en cada cepa y se purificaron con un kit (Wizard® Genomic DNA Purification Kit de Promega®), se secuenciaron (Molecular Research LP, Texas, EE. UU.) y analizaron usando la herramienta BLASTn del GenBank. Las secuencias 16S de los aislados identificados se depositaron en la base de datos del GenBank con los números de accesos KP634997- KP635000 (Contreras-Pérez *et al.*, 2016).

Bioensayos de antagonismo

Los bioensayos de antagonismo fúngico se realizaron por triplicado como lo descrito por Hernández-León *et al.* (2015). Para ello, se emplearon medios con agar nutritivo. Se incubaron 24 h a una temperatura de 28 °C en oscuridad; transcurrido este tiempo se realizaron las mediciones del diámetro del crecimiento micelial de los patógenos, los cuales cumplieron 48 h en el medio, y se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de acuerdo a la siguiente fórmula: % de inhibición del crecimiento = $[(A_m - A_t) / A_m] \times 100$, donde A_m es el área micelial de control y A_t es el área micelial con tratamiento.

Resultados

En el presente trabajo se buscó la producción de sideróforos y la presencia de los genes antifúngicos *hcnC* y *phlD* en 410 aislados bacterianos asociados a plantas de *R. fruticosus* L.) de la región de Zamora, Michoacán, México. Los resultados muestran que 70 aislados produjeron sideróforos. La Fig. 1 (panel A) muestra un análisis general de los aislados que producen (o no) sideróforos en medio CAS, así como su confirmación al cultivarse en un medio con cuatro aislados (panel B).

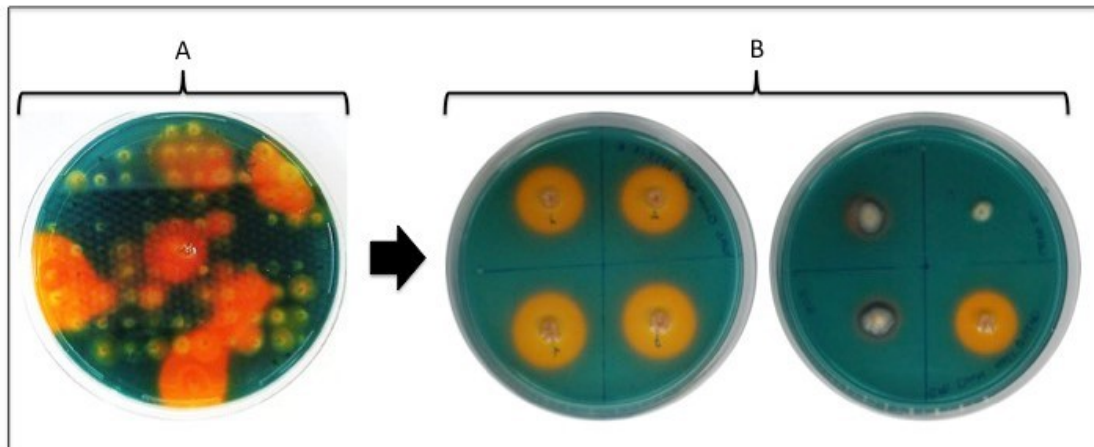


Fig. 1. Análisis de aislados asociados a *R. fruticosus* productores de sideróforos, observado como un halo de color amarillo-naranja alrededor del inóculo bacteriano. El panel A muestra una caja Petri con medio CAS (Cromo Azurol Sulfonato) con diferentes aislados. El panel B muestra la reinoculación y corroboración de aquellos aislados que producen (o no) sideróforos.

Fig. 1. Analysis of isolates associated with *R. fruticosus* producing siderophores, observed as a yellow-orange halo around the bacterial inoculum. Panel A shows a Petri dish with CAS medium (Chrome Azurol Sulfonate) with different isolates. Panel B shows the reinoculation and corroboration of those isolates that produce (or not) siderophores.

En un alto porcentaje (70%) de las cepas productoras de sideróforos, se detectaron ya sea uno o dos de los genes antifúngicos analizados (Cuadro 1); mientras que, el gen *hcnC* se detectó en el 51.4% del total de aislados productores de sideróforos analizados, siendo una mayor proporción que el gen *phlD* (19%). También, es relevante resaltar que se encontró una mayor detección de genes *phlD* y/o *hcnC* en cepas aisladas de la endósfera (43/70), comparado con aquellas cepas rizosféricas (6/70). Cabe mencionar que la producción de sideróforos fue un primer factor de selección de aquellos aislados con múltiples factores antagónicos; tales como presencia de genes *phlD* y/o *hcnC*, que podrían sintetizar HCN y DAPG, respectivamente, y que podrían ejercer un potencial papel de biocontrol hacia los patógenos probados en este trabajo.

Cuadro 1. Porcentajes y proporciones de detección de genes antifúngicos en aislados productores de sideróforos de origen endófito o rizosférico.

Table 1. Percentages and proportions of detection of antifungal genes in isolates producing siderophores of endophyte or rhizospheric origin.

Aislados/Genes	Porcentaje total	Aislados de origen endófito	Aislados de origen rizosférico
Aislados productores de sideróforos	17 % (70/410)	65.7 % (46/70)	34.2 % (24/70)
Detección de genes antifúngicos	70 % (49/70)	61.4 % (43/70)	8.5 % (6/70)
Detección del gen <i>hcnC</i>	51.4 % (36/70)	91.6 % (33/36)	8.3 % (3/36)
Detección del gen <i>phlD</i>	19 % (13/70)	27.7 % (10/36)	8.3 % (3/36)

*Números entre paréntesis muestra las proporciones de los aislados encontrados en el muestreo, ya sea totales (endófitos más rizosféricos) o analizados por origen endófito o rizosférico.

*Numbers in parentheses shows the proportions of the isolates found in the sampling, either total (endophytes plus rhizospheric) or analyzed by endophyte or rhizospheric origin.

La Fig. 2 muestra un ejemplo de los geles de agarosa en donde se amplificaron los genes *hcnC* o *phlD*. Al detectarse dos o más bandas, los experimentos se repitieron, o bien las bandas se purificaron para ser secuenciadas, corroborando por búsquedas de homología la identidad con genes *hcnC* o *phlD* ya reportados en el GenBank. Cabe destacar que las identidades de las

secuencias estuvieron entre un 99 y 100% con genes ya reportados de especies ampliamente estudiadas del género *Pseudomonas*.

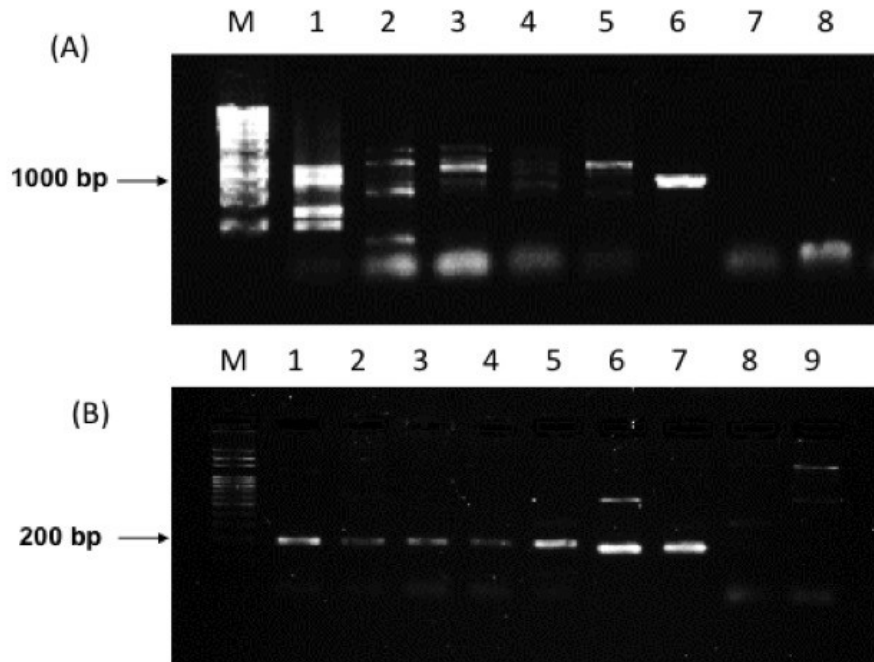


Fig. 2. Amplificación por PCR del gen *phlD* en aislados rizosféricos y endófitos (Panel A).

La imagen muestra un gel agarosa al 1% representativo. El carril M muestra el marcador de peso molecular, el carril 1 el control positivo de *P. fluorescens* UM270, mientras que del carril 2 al 7 son diferentes aislados asociados a *R. fruticosus*. El carril 8 es un control negativo (*E. coli*). El Panel B muestra un gel agarosa al 2% representativo de los genes *hcnC*. El carril M muestra el marcador de peso molecular, el carril 1 el control positivo de *P. fluorescens* UM270, mientras que del carril 2 al 8 son diferentes aislados asociados a *R. fruticosus*. El carril 9 es un control negativo sin ADN templado.

Fig. 2. PCR amplification of the *phlD* gene in rhizospheric and endophytic isolates (PanelA).

The image shows a representative 1% agarose gel. Lane M shows the molecular weight marker, lane 1 the positive control with *P. fluorescens* UM270, while lanes 2 through 7 are different isolates associated with *R. fruticosus*. Lane 8 is a negative control (*E. coli*). Panel B shows a 2% agarose gel representative of *hcnC* genes. Lane M shows the molecular weight marker, lane 1 the positive control of *P. fluorescens* UM270, while lanes 2 through 8 are different isolates associated with *R. fruticosus*. Lane 9 is a negative control without template DNA.

Finalmente, se observó una alta relación entre la producción de sideróforos, la presencia de genes *phlD* y/o *hcnC* y la actividad antagonica hacia los fitopatógenos *B. cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani* y *Rhizoctonia solani* (Cuadro 2). Como un control negativo se usó la cepa *Escherichia coli* K12, la cual no exhibe antagonismo hacia patógenos fúngicos de plantas. Por otra parte, como control positivo y comparativo del antagonismo presentado por las cepas endófitas o rizosféricas analizadas en este trabajo, se empleó la cepa *P. fluorescens* UM270, la cual ha sido anteriormente reportada por su producción de sideróforos, presencia de los operones *hcnABC* y *phlACBD*, entre otros mecanismos de biocontrol y promoción del crecimiento vegetal (Hernández-León *et al.*, 2015; Hernández-Salmerón *et al.*, 2016). Otras cepas que mostraron una tendencia a inhibir el crecimiento de los patógenos, pero que no fue significativa, no se incluyeron en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Aislados productores de sideróforos de origen endófito y rizosférico que presentaron inhibición del crecimiento del micelio de los patógenos fúngicos *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *F. solani* y *R. solani*.

Table 2. Siderophores-producing isolates of endophyte and rhizospheric origin that presented inhibition of mycelial growth of fungal pathogens *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *F. solani* and *R. solani*.

Aislado o cepa	Características	Patógenos fúngicos			
		<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
COPE63	Sid+ <i>hcnC</i>	33.9 ± 8.7b	50.9 ± 3.5c	38.9 ± 14b	44.0 ± 13b
COPE17	Sid+ <i>hcnC</i>	39.0 ± 8.9b	27.1 ± 12b	27.0 ± 6.9b	41.0 ± 12b
COPE19	Sid+ <i>hcnC</i> + <i>phlD</i>	27.0 ± 7.9b	77.1 ± 9.0c	58.8 ± 11c	29.0 ± 8.5b
COPE39	Sid+ <i>hcnC</i> + <i>phlD</i>	78.0 ± 21bc	81.1 ± 8.0c	85.2 ± 17c	58.0 ± 17bc
COPE40	Sid+ <i>hcnC</i> + <i>phlD</i>	28.0 ± 4.5b	31.0 ± 3.3b	34.2 ± 3.4b	25.8 ± 2.1b
COPE40-1	Sid+ <i>hcnC</i> + <i>phlD</i>	66.5 ± 13c	70.4 ± 8.0c	26.8 ± 3.8b	33.0 ± 5.0b
UM270	Sid+ <i>hcnC</i> + <i>phlD</i>	76.2 ± 13c	88.4 ± 9.2c	53.0 ± 15c	55.2 ± 8.8c
<i>E. coli</i> K12	Ninguna	2.11 ± 5.9a	3.08 ± 4.1a	1.22 ± 4.2a	3.31 ± 2.2a

Se muestran los porcentajes de inhibición y los valores de la desviación estándar (±) del crecimiento fúngico como la media de tres réplicas independientes medidas entre el día 5 y 7 (dependiendo del patógeno y su dinámica de crecimiento), en comparación con el experimento control (Sin bacteria). Se presentan en el Cuadro únicamente los resultados de las cepas que mostraron una inhibición del crecimiento de los patógenos estadísticamente significativa entre el tratamiento y los

experimentos de control. Los datos se analizaron estadísticamente con una prueba ANOVA y la prueba de separación de medias de Duncan para comparaciones múltiples. Las letras indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$). La cepa K12 se usó como control negativo. La cepa *P. fluorescens* UM270 se empleó como control positivo para la detección de actividad antifúngica, previamente reportada (Hernández-León *et al.*, 2015; Hernández-Salmerón *et al.*, 2016).

The percentages of inhibition and the standard deviation values (\pm) of the fungal growth are shown as the average of three independent replicates measured between day 5 and 7 (depending on the pathogen and its growth dynamics), in comparison with the control experiment (without bacteria). Only the results of the strains that showed a statistically significant pathogen growth inhibition between treatment and control experiments are presented in the Table. Data were analyzed statistically with an ANOVA test and the Duncan means separation test for multiple comparisons. The letters indicate that the means differ significantly ($p \leq 0.05$). Strain K12 was used as a negative control. The *P. fluorescens* UM270 strain was used as a positive control for the detection of antifungal activity, previously reported (Hernández-León *et al.*, 2015; Hernández-Salmerón *et al.*, 2016).

Discusión o Conclusiones

La producción de sideróforos por parte de bacterias promotoras del crecimiento vegetal es uno de los principales mecanismos de antagonismo hacia patógenos de plantas y uno de los primeros en describirse. Su acción implica la quelación de hierro en ambientes rizosféricos, haciendo este micronutriente menos disponible para los patógenos (Kloepper *et al.*, 1980). En el presente trabajo se analizó la relación entre la producción de sideróforos en cepas bacterianas y su origen de aislamiento (rizósfera o endósfera). La producción de sideróforos se ha reportado en cepas rizosféricas de diversas plantas, así como en cepas de origen endófito (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018). Interesantemente, las cepas que mostraron una producción clara de síntesis de sideróforos en medio CAS pertenecen al género *Pseudomonas* (Contreras-Pérez *et al.*, 2016), la comparación de secuencias de los genes *phlD* y *hcnC* usando la herramienta BLASTn y mostrando una alta identidad con dicho género, aunque requieren un análisis adicional para asignar la especie a la que pertenecen los aislados. En cierto sentido podría esperarse esto, ya que las *Pseudomonas* son conocidas por su capacidad de producción de sideróforos (Kloepper *et al.*,

1980), además de que son bacterias abundantes en ecosistemas como la rizósfera o la endósfera (Santoyo *et al.*, 2012; Mendes *et al.*, 2011). En contraste, Contreras y colegas (2016) reportaron que las especies del género *Pseudomonas* no fueron de las más abundantes en la endósfera de plantas de zarzamora, siendo otros géneros como *Bacillus*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia* y *Lysinibacillus* los más abundantes. Sin embargo, a diferencia de la investigación de Contreras *et al.* (2016), en este trabajo se usó como marcador selectivo la producción de sideróforos, por lo que podría esperarse una mayor selección de especies de *Pseudomonas*. Sin embargo, no se descarta que un estudio más amplio pueda detectar cepas de otros géneros, como *Burkholderia*, que son también productores de sideróforos.

La producción y excreción de sideróforos bacterianos en ambientes como la rizósfera, donde pueden quelar el hierro disponible del medio y ser nuevamente adquirido por cepas de *Pseudomonas*, es uno de los primeros mecanismos indirectos de promoción del crecimiento vegetal (Kloepper *et al.*, 1980). La clave está en hacer menos disponible dicho elemento (Fe) en la rizósfera para los potenciales patógenos fúngicos, restringiendo así su crecimiento (Santoyo *et al.*, 2010). Cabe destacar que el papel de los sideróforos producidos por bacterias endófitas no ha sido estudiado a detalle, pues su papel ha sido endocado hacia estudios de fitoextracción de compuestos tóxicos para la planta (Rajkumar *et al.*, 2010); sin embargo se sabe que dichos compuestos quelantes de hierro inducen el sistema de defensa de la planta contra potenciales patógenos, además de conferir al endófitos una ventaja para colonizar los tejidos internos de la planta y excluir otros microorganismos (Loaces *et al.*, 2011; Ramos-Solano *et al.*, 2010). Así mismo, se ha reportado que si no existe una limitante de Fe en el medio ambiente, el antagonismo se pierde (Kloepper *et al.*, 1980). Por lo tanto, aquellas cepas bacterianas que contengan no sólo la producción de sideróforos, sino que presenten otros mecanismos de antagonismos, como la producción de volátiles (*e.g.* HCN) o compuestos difusibles (*e.g.* DAPG), podrían tener mejores actividades (y oportunidades) de biocontrol de fitopatógenos en ambientes como la rizósfera y posiblemente la endósfera (Glick, 2014).

El gen *hcnC* forma parte del operón *hcnABC*, el cual es importante para la síntesis del compuesto volátil ácido cianhídrico o HCN (Laville *et al.*, 1998). Dicho compuesto se ha reportado ampliamente como antifúngico (Hernández-León *et al.*, 2015). Diversos trabajos reportaron que el compuesto HCN es responsable del antagonismo hacia patógenos fúngicos (Santoyo *et al.*, 2019). Aunque en este trabajo se reporta únicamente la amplificación de un

fragmento del gen *hcnC*, es muy probable que se encuentren presentes los demás genes del operón, así como también la posible producción del compuesto HCN; pero se requiere de trabajos adicionales para corroborar dicha hipótesis.

Como se había mencionado anteriormente, el gen *phlD* forma parte del operón *phlACBD*, que biosintetiza el compuesto 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) (Yang y Cao, 2012). El gen *phlD* codifica para una policétido sintasa, siendo la principal responsable de la producción de monoacetilfloroglucinol (MAPG), precursor directo de 2,4-DAPG mediante una acetilación llevada a cabo por las demás enzimas PhlA, PhlB y phlC (Bangera y Thomashow, 1999). Al igual que el HCN, la síntesis de DAPG ha sido reportada como una de las principales características antifúngicas y de biocontrol en cepas de *Pseudomonas* (Hernández-León *et al.*, 2015). En un trabajo realizado por Mavrodi *et al.* (2001) se reportó una amplia presencia del gen *phlD* en cepas de *Pseudomonas* de diferentes suelos. Un dato interesante que arrojó dicho trabajo fue la gran diversidad genética que existe en los genes *phlD*. Esto podría estar asociado a que en nuestro trabajo no detectamos este marcador en más cepas de *Pseudomonas*, por lo que el diseño y utilización de más oligonucleótidos, algunas con bases degeneradas, podría ayudar a detectarlo en más aislados. Otra investigación sugiere que las *Pseudomonas* productoras de DAPG no forman un sólo grupo filogenético, sino que la presencia del operón biosintético *phlACBD* podría estar distribuido en otros géneros bacterianos (Almario *et al.*, 2017). Adicionalmente, en la base de datos *Pseudomonas Genome Database* (Winsor *et al.*, 2010) se reportan cientos de genomas de especies del *Pseudomonas*, por lo que realizar una búsqueda preliminar para la detección de genes para la síntesis de sideróforos puede ser una herramienta rápida y fácil, que puede permitir la identificación de cepas con potencial para el biocontrol de fitopatógenos (aunque no todas presentan genes para la producción de sideróforos, HCN o DAPG).

En conclusión, los sideróforos son agentes quelantes de hierro y su producción por parte de cepas de *Pseudomonas* ha sido uno de los primeros mecanismos de promoción del crecimiento vegetal propuesto (Kloepper *et al.*, 1980). Sin embargo, es deseable que un biofungicida bacteriano presente dos o más características antagónicas, como la producción del volátil HCN y el compuesto difusible DAPG (Santoyo *et al.*, 2019). Así, en este trabajo se resalta la importancia de la detección inicial de actividad de producción de sideróforos en aislados asociados a plantas de zarzamora, lo cual puede ser útil para detectar múltiples mecanismos de antagonismo hacia patógenos fúngicos de plantas. Estudios adicionales con las cepas que mostraron mejores

actividades de antagonismo (e.g. EZ8 y EZ16) se están llevando a cabo para detectar la efectividad fungicida en campo.

Agradecimientos

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (Proyecto No. A1-S-15956) y a la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por apoyar los proyectos de investigación (2018-2019). Los autores también agradecen a los revisores anónimos por sus comentarios y sugerencias constructivas para mejorar el presente trabajo.

Referencias

- Adesemoye, A.O. y Kloepper, J.W. (2009). Plant–microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 1-12.
- Ahmad, F., Ahmad, I. y Khan, M.S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163, 173-181.
- Almario, J., Bruto, M., Vacheron, J., Prigent-Combaret, C., Moënne-Loccoz, Y., y Muller, D. (2017). Distribution of 2, 4-diacetylphloroglucinol biosynthetic genes among the *Pseudomonas* spp. reveals unexpected polyphyletism. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1218.
- Bangera, M.G. y Thomashow, L.S. (1999). Identification and characterization of a gene cluster for synthesis of the polyketide antibiotic 2, 4-diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2–87. *Journal of Bacteriology*, 181, 3155–3163.
- Contreras, M., Loeza, P. D., Villegas, J., Farias, R., y Santoyo, G. (2016). A glimpse of the endophytic bacterial diversity in roots of blackberry plants (*Rubus fruticosus*). *Genetics and Molecular Research*, 15, 1-10.
- Coutinho, B.G., Licastro, D., Mendonça-Previato, L., Cámara, M. y Venturi, V. (2015). Plant-influenced gene expression in the rice endophyte *Burkholderia kururiensis* M130. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28, 10-21.
- de Los Santos-Villalobos, S., Kremer, J. M., Parra-Cota, F. I., Hayano-Kanashiro, A. C., García-Ortega, L. F., Gunturu, S. K., y Peña-Cabriales, J. J. (2018). Draft genome of the fungicidal biological control agent *Burkholderia anthina* strain XXVI. *Archives of Microbiology*, 200, 803-810.

- Glick, B.R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169, 30-39.
- González, F., Rebollar, S., Hernández, J., Morales, J., Ramírez, O. (2019). Situación actual y perspectivas de la producción de berries en México. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 44, 260-272.
- Hernández-León, R., Rojas-Solís, D., Contreras-Pérez, M., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., Macías-Rodríguez, L. I., Reyes-de la Cruz, H. y Santoyo, G. (2015). Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biological Control*, 81, 83-92.
- Hernández-Salmerón, J. E., Hernández-Flores, B. R., del Carmen Rocha-Granados, M., Loeza-Lara, P. D., y Santoyo, G. (2018). Hongos fitopatógenos modulan la expresión de los genes antimicrobianos *phlD* y *hcnC* de la rizobacteria *Pseudomonas fluorescens* UM270. *Biotecnia*, 20, 110-116.
- Hernández-Salmerón, J. E., Hernández-León, R., Orozco-Mosqueda, M. D. C., Valencia-Cantero, E., Moreno-Hagelsieb, G. y Santoyo, G. (2016). Draft genome sequence of the biocontrol and plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* strain UM270. *Standards in Genomic Sciences*, 11, 5.
- Heydari, A. y Pessarakli, M. (2010). A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of Biological Sciences*, 10, 273-290.
- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., y Schroth, M. N. (1980). *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease-suppressive soils. *Current Microbiology*, 4, 317-320.
- Laville, J., Blumer, C., Von Schroetter, C., Gaia, V., Défago, G., Keel, C. y Haas, D. (1998). Characterization of the *hcnABC* gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Journal of Bacteriology*, 180, 3187-3196.
- Loaces, I., Ferrando, L., y Scavino, A.F. (2011). Dynamics, diversity and function of endophytic siderophore-producing bacteria in rice. *Microbial ecology*, 61, 606-618.
- Luo, S., Xu, T., Chen, L., Chen, J., Rao, C., Xiao, X., Wan, Y., Zeng, G., Long, F., Liu, C. y Liu, Y. (2012). Endophyte-assisted promotion of biomass production and metal-uptake of energy crop sweet sorghum by plant-growth-promoting endophyte *Bacillus* sp. SLS18. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 1745-1753.

- Mavrodi, O. V., McSpadden Gardener, B. B., Mavrodi, D. V., Bonsall, R. F., Weller, D. M., y Thomashow, L. S. (2001). Genetic diversity of *phlD* from 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 91, 35-43.
- Mendes, R., Kruijt, M., de Bruijn, I., Dekkers, E., van der Voort, M., Schneider, J. H. M. y Raaijmakers, J. M. (2011). Deciphering the Rhizosphere Microbiome for Disease-Suppressive Bacteria. *Science*, 332, 1097-1100.
- Pandya, M., Rajput, M. y Rajkumar, S. (2015). Exploring plant growth promoting potential of non rhizobial root nodules endophytes of *Vigna radiata*. *Microbiology*, 84, 80-89.
- Raaijmakers, J.M. y Weller, D.M. (2001). Exploiting genotypic diversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp.: characterization of superior root-colonizing *P. fluorescens* strain Q8r1-96. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2545–2554.
- Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M.N.V. y Freitas, H. (2010). Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in biotechnology*, 28, 142-149.
- Ramos-Solano, B., García, J.A.L., Garcia-Villaraco, A., Algar, E., Garcia-Cristobal, J. y Mañero, F.J.G. (2010). Siderophore and chitinase producing isolates from the rhizosphere of *Nicotiana glauca* Graham enhance growth and induce systemic resistance in *Solanum lycopersicum* L. *Plant and Soil*, 334, 189-197.
- Rashid, S., Charles, T.C. y Glick, B.R. (2012). Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Applied Soil Ecology*, 61, 217-224.
- Saini, R., Dudeja, S.S., Giri, R. y Kumar, V. (2015). Isolation, characterization, and evaluation of bacterial root and nodule endophytes from chickpea cultivated in Northern India. *Journal of Basic Microbiology*, 55, 74-81.
- Santoyo G., Sánchez-Yáñez J.M. y de los Santos-Villalobos S. (2019). Methods for Detecting Biocontrol and Plant Growth-Promoting Traits in Rhizobacteria. In: Reinhardt D., Sharma A. (eds) *Methods in Rhizosphere Biology Research*. Rhizosphere Biology. Springer, Singapore.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M. y Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological research*, 183, 92-99.

- Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, Ma. del C. y Govindappa, M. (2012). Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Science & Technology*, 22, 855-872.
- Santoyo, G., Valencia-Cantero, E., Orozco-Mosqueda, Ma. del C., Peña-Cabriales, J.J. y Farías-Rodríguez, R. (2010). Papel de los sideróforos en la actividad antagónica de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 hacia hongos fitopatógenos. *Terra Latinoamericana*, 28, 53-60.
- Velázquez-Becerra, C., Macías-Rodríguez, L. I., López-Bucio, J., Flores-Cortez, I., Santoyo, G., Hernández-Soberano, C. y Valencia-Cantero, E. (2013). The rhizobacterium *Arthrobacter agilis* produces dimethylhexadecylamine, a compound that inhibits growth of phytopathogenic fungi in vitro. *Protoplasma*, 250, 1251-1262.
- Weller, D. M. (2007). Pseudomonas biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology*, 97, 250-256.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., y van Kan, J.A. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8, 561-580.
- Winsor, G. L., Lam, D. K., Fleming, L., Lo, R., Whiteside, M. D., Yu, N.Y. y Brinkman, F. S. (2010). *Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. *Nucleic acids research*, 39, D596-D600.
- Yang, F. y Cao, Y. (2012). Biosynthesis of phloroglucinol compounds in microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 487-495.