

ORIGINAL RESEARCH

Co-inoculation of *Glomus sp* and *Methylobacterium sp* to accelerate seed germination, plant growth promotion and induction of systemic resistance in tomato (*Lycopersicum esculentum* var *verome*)

Co-inoculación de *Glomus sp* y *Methylobacterium sp* para acelerar la germinación, el desarrollo vegetal e inducir resistencia en jitomate (*Lycopersicum esculentum* var *verome*)

Sigfredo López-Díaz ^{1*}, Jesús Adrián Barajas-González.², Luis Fernando Ceja-Torres.¹
Justo Sierra 28, Col. Centro, Jiquilpan, Michoacán, México. C.P. 59510, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional-IPN¹, Av. Universidad, Núm.1115, Col. Lindavista, Ocotlán, Jalisco. México. C. P. 47820 Centro Universitario de la Ciénega-Universidad de Guadalajara². *slopezd@ipn.mx

ABSTRACT

Methylobacterium is a persistent colonizer of plant leaf surfaces, and *Glomus* is a arbuscular mycorrhiza associated with almost 90% of the terrestrial plants. It was assessed the synergistic activity of the consortium *Methylobacterium-Glomus* in plant growth development, seed germination and Induction of Defense Enzymes against *Fusarium sp* in *Lycopersicum esculentum* var *verome*. Seeds were inoculated with *Methylobacterium sp* and *Glomus sp* and seed germination was evaluated in terms of morphometric measurements, seedling growth, rate of germination (RG), and seedling vigor index (SVI). To evaluate the induced systemic resistance, it was assessed the presence of the pathogenesis related proteins (PRP) in tomato plants developed from seeds inoculated with *Methylobacterium* and the consortium *Methylobacterium-Glomus*. The consortium and *Methylobacterium* inoculation promoted seed germination and plant growth, increased plant height, plant biomass and side shoots were observed. The peroxidase activity is significant different statistically in the presence of the consortium in reference to the other treatments, however, the other enzymes and phenolic compounds, there was no difference between the treatments, but there was in reference to the control without microorganisms.

Keywords: *Methylobacterium*, *Glomus*, PR-Proteins, plant growth promotion, induced systemic resistance

RESUMEN

Methylobacterium es un colonizador persistente de las superficie de las hojas de las plantas y *Glomus* es una micorriza arbuscular que se encuentra asociada a las raíces de casi un 90% de las plantas terrestres. Se evaluó la actividad sinérgica del consorcio *Methylobacterium-Glomus*, sobre la aceleración de la germinación, la promoción del desarrollo vegetal y la inducción de enzimas de defensa contra *Fusarium sp* en *Lycopersicum esculentum* var

verome . Se inocularon las semillas y se evaluó la germinación en términos de medidas morfométricas, crecimiento vegetal, índice de germinación (R_G) e índice de vigor de las plántulas (SVI). Para estudiar la resistencia sistémica inducida, se evaluó la presencia de las proteínas relacionadas con la patogénesis (PRP) en plantas de jitomate obtenidas de semillas inoculadas *Methylobacterium* y el consorcio *Methylobacterium-Glomus*. Solamente los tratamientos inoculados con *Methylobacterium* y el consorcio promovieron la germinación de las semillas, observándose un incremento en la biomasa, altura de las plantas y brotes laterales. La actividad de la *peroxidasa* presento diferencias estadísticamente significativas en presencia del consorcio respecto a los demás tratamientos, sin embargo, en las demás enzimas y los compuestos fenólicos, no hubo diferencia entre los tratamientos pero si contra el control sin microorganismos.

Palabras clave:, *Methylobacterium*, *Glomus*, Proteínas-PR, promoción del desarrollo vegetal, resistencia sistémica inducida.

1. INTRODUCCIÓN

El tomate es una de las principales hortalizas cultivadas en el mundo, además de ser una de las de mayor valor económico. En los últimos años, la producción y el consumo mundial presentan un dinamismo destacable (Lukyanenko, 1991).

En México, el tomate es la hortaliza que mayor valor aporta a la producción agropecuaria. Asimismo, uno de los productos agrícolas que genera más divisas y que ha sido pionero en la atención del mercado de los Estados Unidos. De esta forma, hoy en día ocho de cada diez tomates que se importan por el vecino país del norte corresponden a tomates mexicanos. Uno de los principales problemas que enfrenta la producción de tomate en nuestro país es el excesivo uso de agroquímicos. Las plagas y enfermedades son uno de los principales problemas que mas impactan este cultivo incrementando los costos de producción por el uso de productos químicos para su control (Panorama Agroalimentario, 2009).

Estudios de la fisiología y bioquímica de las bacterias aerobias metilotróficas facultativas han sentado las bases para la implementación exitosa del potencial metabólico de estos microorganismos en la biotecnología. Algunas de las características de estos fitosimbiontes metilotróficos son; su capacidad de biosintetizar citocininas, auxinas y vitaminas, espectro considerablemente amplio como productores potenciales de estos biorreguladores con usos prácticos biotecnológicos en la agricultura. (Trotsenko y col. 2005). *Methylobacterium* pertenece al grupo de bacterias conocidas como metilotróficas facultativas de pigmento rosa o PPFMs por sus siglas en inglés (Austin y Goodfellow, 1979; Patt y col., 1976; Green y Bousfield, 1982, 1983). Son clasificadas como α -proteobacterias y son capaces de crecer en medios con compuestos de un solo carbono como el metanol, formaldehído y metilamina, así como en una gran variedad de compuestos C_2 , C_3 y C_4 (Lidstrom, 2001). Son muy abundantes y no patogénicas, y aunque se les conoce como bacterias de la filósfera, se encuentran distribuidas ubicuamente en la planta encontrandolas en la rizósfera, en las semillas y como endosimbiontes ya que *Methylobacterium* puede entrar a la planta a través de la raíz y sistemáticamente colonizar cada tejido, sólo unos pocos microorganismos derivados de rizosfera son capaces de colonizar las partes aéreas debido a las barreras estructurales de las plantas hospederas, como la endósfera de la raíz y

condiciones específicas, incluyendo las fluctuaciones de humedad, temperatura y radiación UV (Compant y col., 2010; Omer y col., 2004; Madhaiyan y col., 2006a). Varios estudios, muestran concluyentemente que *Methylobacterium* mejora el crecimiento de las plantas a través de la producción de la enzima ureasa o por fitohormonas como las citocininas y el ácido indol-3-acético (IAA). Además, está muy bien documentado que *Methylobacterium* produce sideróforos, produce la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminasa (ACC) la cual disminuye los niveles de etileno en las plantas (Idris y col., 2004; Madhaiyan y col., 2004; 2006b); también, se ha reportado su influencia en la germinación de semillas así como su efecto en los rasgos agronómicos como; el vigor de la plántula, incremento en el número de ramificaciones, elongación de raíces, tolerancia al frío/calor aumento de la actividad fotosintética al incrementar el número de estomas, concentración de clorofila y contenido de ácido málico (Cervantes-Martinez y col. 2004; Holland, 1997; Freyermuth y col., 1996). Una de las características importantes de esta bacteria, es que indirectamente reduce o previene los efectos dañinos de los microorganismos fitopatógenos mediante la resistencia sistémica inducida (Madhaiyan y col., 2004).

En el suelo, las micorrizas son las formas mejor conocidas de simbiosis encontradas en la rizósfera de las plantas, las cuales, son capaces de establecer una asociación con aproximadamente un 90% de las plantas terrestres (He y Nara, 2007). Las micorrizas arbusculares (AM, por sus siglas en inglés) son por mucho las más abundantes de las micorrizas. Están caracterizadas por la formación de un micelio extra-radical por la formación de estructuras haustoriales denominadas arbusculos dentro de las células corticales (Hock y Varma, 1995). Los hongos AM, están relacionados con el mejoramiento en la captación de los macro y micronutrientes, incrementar la tolerancia al estrés (afecto en el balance del agua y la resistencia a los patógenos) y alteraciones benéficas de los reguladores del crecimiento vegetal (Manjula y col., 2005)

Actualmente, se les ha dado mucha atención a los microorganismos promotores del desarrollo vegetal debido a que inducen resistencia sistémica (ISR por sus siglas en inglés), considerando que es posible darles un enfoque biológico para manejar enfermedades de una manera ecológicamente mas sostenible que el uso de productos químicos sintéticos. La resistencia sistémica inducida ha sido asociada a una gran cantidad de proteínas relacionadas con la patogénesis, (PRP, por sus siglas en inglés) incluidas la *peroxidasa*, (PO), *fenilalanina amonio liasa* (PAL, por sus siglas en inglés), *S-1,3-glucanasa* y *quitinasa*, sin embargo, el incremento en la acumulación y actividad de estas enzimas depende principalmente tanto del agente inductor como del genotipo de la planta, así como las condiciones fisiológicas del patógeno (Koch, 1992). La función colectiva de las PRP puede ser eficaz en la inhibición de crecimiento del patógeno, la multiplicación y propagación del patógeno y responsabilidad para el estado de resistencia inducida (van Loon, 1997).

El término resistencia sistémica inducida se ha adoptado de una manera general y se define como “un proceso de resistencia activa que depende de las barreras físicas o químicas la planta huésped activadas por agentes bióticos o abióticos” (Sin embargo, no es enteramente claro, ya que parece dar a entender que la resistencia estaba ausente, pero presente como resultado de la acción de un agente inductor (Kloepper y col., 1989).

Las plantas pueden presentar resistencia sistémica a enfermedades al estar en contacto con agentes biológicos; no-patógenos, patógenos que causan necrosis y a aquellas bacterias y hongos de vida libre de la rizosféra, este tipo de resistencia es inducida e intervenida a

través de la ruta jasmonato/etileno.

Los rasgos benéficos de las bacterias promotoras del desarrollo vegetal y los hongos micorrizicos arbusculares han sido estudiados de manera separada y los estudios más recientes son referidos a los efectos benéficos de las interacciones que ocurren en la zona del suelo que rodea la raíz y la hifa del hongo comúnmente referida como micorrizósfera (Artursson y col., 2006).

El actual estudio se realizó para evaluar la inducción de enzimas de defensa por la aplicación del consorcio *Methylobacterium-Glomus* sobre plantas de *Solanum lycopersicum* contra la Fusariosis considerando los siguientes objetivos:

a) Evaluar el efecto del *Methylobacterium* y el consorcio *Methylobacterium-Glomus* sobre la germinación de las semillas de *Solanum lycopersicum*.

b) Determinar la presencia de proteínas relacionadas con la patogénesis como son la *fenilalanina-amonió liasa* (PAL. EC 4.3.1.5), *Peroxidasa* (E.C. 1.11.1.7), *Quitinas* (E.C. 3.2.1.14) y la *-1,3-glucanasa* (E.C. 3.2.1.39) así como los compuestos fenólicos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Germinación de la semillas.

Se asepsizó la superficie de las semillas (100 semillas por tratamiento con tres replicas) mediante tratamiento térmico a 50°C durante 48h, y posteriormente se embebieron con la bacteria en agitación durante 5 h a temperatura ambiente de acuerdo a los siguientes tratamientos:

Tr₁) *Methylobacterium extroquens*

Tr₂) *Methylobacterium extroquens* + *Glomus clarum*

Tr₃) *Glomus clarum*

Tr₄) control sin microorganismos

Después de la imbibición, las semillas, se sembraron en macetas conteniendo una mezcla estéril de musgo de turba, perlita y vermiculita (70:20:10) y mantenidas a 20°C hasta su germinación, la medición se realizó a partir del 3er hasta el 7mo y el índice de germinación R_G (Por sus siglas en inglés) se calculo de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$R_G = \frac{N_i}{D_i}$$

Donde N_i es el número de semillas germinadas en un tiempo determinado y D_i es la unidad de tiempo (días) (Hosseini y Jafari, 2002). Para medir el desarrollo, se tomaron al azar 10 plantas de cada tratamiento al día 15 y se midieron las longitudes de las raíces y tallos, tomándose también el peso fresco, estas plantas se llevaron al horno a una temperatura de 60°C durante 48h con la finalidad de determinar el peso seco (Evans, 1972). Con los datos anteriores se calculo también el índice de vigor de la plántula (SVI por sus siglas en inglés) empleando la siguiente fórmula:

SVI = % germinación x longitud de la planta germinada (longitud del tallo + longitud de la raíz) en cm.

Los resultados fueron expresados en números enteros (Baki y Anderson, 1973).

2.2 Cepa bacteriana y condiciones de cultivo

La cepa de *Methylobacterium sp* se aisló de la filósfera de plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) empleando el medio sólido de sales minerales de amonio (AMS por sus siglas en inglés) a pH 6.8 y suplementado con metanol al 1 % y 30 µg/ml de ciclohexamida, posteriormente para poder realizar la inoculación en las plantas, la bacteria se desarrollo en AMS líquido en agitación orbital a 140 rpm y 25 °C utilizando la fase estacionaria (Whittenbery y col., 1970; Holland y col., 2000).

2.3 Cepas de los Hongos Micorrízicos Arbusculares y fitopatógeno.

Glomus clarum se obtuvo de la colección de protección vegetal del departamento de investigación del CIIDIR-IPN-Mich. En cual se mantuvo en sorgo (*Sorghum sp*) como plantas hospederas y cultivadas en macetas con 20kg de suelo. El inoculo en los tratamientos consistió en esporas y micelio tomados de raíces infectadas y suelo (20 g de inoculo por maceta, con un promedio de 50 esporas por gramo). El conteo de esporas se realizó empleando el método de tamizado y decantación en agua (Gerdemann y Nicolson 1963).

Fusarium oxysporum se obtuvo del Departamento de Fitopatología del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara el cual se mantuvo y desarrollo en medio papa dextrosa agar (PDA). Del cultivo, se obtuvieron 3 discos de 5 mm de diámetro con crecimiento fúngico, cada disco fue colocado en 1 ml de solución Ringer's con 0.02% de Tween-80 y agitados durante 10 s, el recuento de esporas se determinó empleando un hemacitómetro. Por medio de un bisturí estéril, se realizaron incisiones de 5mm en el tallo de las plantas a los que se les incorporó la suspensión de esporas con una concentración de 10⁶ esporas/mL (Hernandez-Lauzardo et al., 2009).

2.4 Evaluación de las proteínas relacionadas con la patogenicidad y los compuestos fenólicos.

Para todos los tratamientos se prepararon 40 macetas (10 macetas por tratamiento) conteniendo una mezcla de musgo de turba, perlita y vermiculita (70:20:10) se colocaron 3 plántulas por maceta. A los tratamientos Tr₁ y Tr₂ se les asperjó *Methylobacterium* en medio AMS líquido hasta la primer gota por la mañana y por la noche durante 7 días, a los tratamientos Tr₃ y Tr₄ se les asperjo hasta la primera gota solamente el medio AMS. Todos los tratamientos fueron suplementados con dos riegos diarios de 50 ml de solución nutritiva Steiner. En el día 27 se asperjaron 15 ml por planta de una suspensión de esporas de *Fusarium* y aunado a lo anterior con una jeringa se realizó daño mecánico en la base del tallo de cada planta para inocular el hongo. A partir del día 28 y hasta el 35 al inicio de la formación del fruto, se evaluaron las proteínas relacionadas con la patogénesis; 1) -1,3 glucanasa, 2) quitinasa, 3) fenilalanina amonio liasa, 4) peroxidasa y 5) compuestos fenólicos.

2.5 Extracción vegetal

Se colectaron las hojas de las plantas de jitomate de todos los tratamientos y se congelaron con nitrógeno líquido para posteriormente ser pulverizadas hasta obtener muestras

homogéneas. Se les realizaron extracciones a una temperatura de 4°C utilizando un gramo de muestra con la solución buffer conveniente para cada enzima, los homogenizados fueron centrifugados durante 20 min a 10,000 rpm. Las soluciones buffer utilizadas fueron; acetato de sodio (0.5 M; pH 5.0), citrato de sodio (0.1 M; pH 5.0), borato de sodio (0.1 M; pH 7.0) y fosfato de sodio (0.1 M; pH 7.0) para extraer respectivamente las enzimas *-1,3-glucanasa, quitinasa, fenilalanina amonio liasa y peroxidasa.*

-1,3-glucanasa. En esta prueba, se utilizó el método del ácido laminarina-dinitrosalicílico descrito por Pan y col., (1991). Para ello, se preparó una mezcla empleando 62.5 µL de laminarina al 4% y 62.5 µL del extracto vegetal, misma que fue incubada a 40°C durante 10 min. La reacción fue detenida agregando 375 µL del reactivo dinitrosalicílico (300 ml de NaOH al 4.5% en 880 ml conteniendo 8.8 g de ácido dinitrosalicílico y 22.5 g de tartrato de sodio y potasio) en un baño maría durante 5 min. La solución coloreada resultante fue diluida con 4.5 ml de agua destilada. Se midió la densidad óptica a 500 nm. La actividad enzimática se expresó como 1 nmol de sustancias reductoras min⁻¹ mg⁻¹ de peso fresco.

Quitinasa. Se midieron 10 µL de buffer de acetato de sodio 1 M (pH 4.0), 0.4 mL de extracto vegetal, y 0.1 mL quitina coloidal (1 mg), preparada de acuerdo a Berger y Reynolds (1958), y colocados en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Después de 2 h a 37°C, la reacción fue detenida mediante centrifugación a 1,000 rpm durante 30 min. Se tomó una alícuota de 0.3 ml del sobrenadante y se colocó en un tubo de vidrio que contenía 30 µL de buffer de fosfato de potasio 1 M (pH 7.1) e incubado con 20 µL enzima helicasa durante 1 h (Boller y Mauch, 1988). El monómero N-acetilglucosamina resultante (GlcNAc) se determinó de acuerdo a Reissig y col., (1959) empleando como estándar interno el GlcNAc para los cálculos. La actividad enzimática se expresó como 1 nmol de GlcNAc equivalentes liberados por min por mg de peso fresco.

Fenilalanina amonio liasa (PAL). La actividad PAL se cuantificó de acuerdo al método descrito Dickerson y col., (1984). Se utilizó una mezcla que contenía 100 µl de extracto vegetal, 500 µl de 50 mM Tris HCl (pH 8.8) y 600 µl de 1 mM L-fenilalanina, se incubó durante 60 min a temperatura ambiente, la reacción fue detenida agregando HCl 2N. Posteriormente se realizó una extracción agregando 1.5 mL de tolueno y agitando vigorosamente durante 30 seg, el tolueno se recuperó centrifugando a 1,000 rpm durante 5 min. Al tolueno recuperado que contenía ácido trans-cinámico se le midió la absorbencia a 290 nm. La actividad enzimática fue expresada como nmol de ácido trans-cinámico liberado por min⁻¹ g⁻¹ de peso fresco.

Peroxidasa. La actividad de la *peroxidasa* se determinó a 30°C por el método espectroscópico directo (Hammerschmidt y Kuc, 1982). La reacción se llevó a cabo utilizando 0.5 mL de extracto vegetal, 1.5 mL de pirogalol al 0.05 M y 0.5 mL de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 1%, la reacción fue realizada en incubación en baño de agua midiendo la absorbencia a 420 nm en intervalos de 30 s durante 30 min. La actividad enzimática se expresó como el cambio de absorbencia de la reacción min⁻¹ g⁻¹ de peso fresco.

Compuestos fenólicos. Mediante molienda se homogenizaron las hojas de las plantas de jitomate. Se tomó 1.0 g al cual se le agregaron 10 mL de metanol al 80% y se agitó durante 15 min a 70°C (Swain y Hillis, 1959). A un mililitro del extracto metanólico se le agregaron 5 mL de agua destilada y 250 µL de reactivo Folin-Ciocalteu, esta disolución se mantuvo a 25°C. Después de 3 min, se agregaron 1 mL de solución saturada de Na₂CO₃ y 1 mL de agua destilada llevando la mezcla a incubación a 25°C durante 1h. Al color

desarrollado se le midió la absorbancia a una longitud de onda de 725 nm empleando un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda II. El contenido de fenoles totales solubles, se calculó en comparación con una curva estándar obtenida por la reacción del reactivo Folin-Ciocalteu con fenol. Los resultados se expresaron como equivalentes de fenol en $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco.

2.6 Diseño experimental y análisis estadístico

Se estableció un diseño completamente aleatorizado. Los datos fueron normalizados y fueron procesados empleando el software Statgraphics Centurion XVI® para calcular el error estándar (ES) y el análisis de varianza (ANOVA) así como la prueba Fisher de la mínima diferencia significativa (LSD por sus siglas en inglés).

4. RESULTADOS

3.2 Efecto sobre la germinación de las semillas y el desarrollo vegetal

Para determinar si el consorcio de *Methylobacterium* y *Glomus* actuaban sinérgicamente para incrementar la germinación y el desarrollo vegetal de *L. esculentum* var verome, se contrastó contra *Methylobacterium* del cual ya han sido bien demostrados sus efectos en la germinación y desarrollo vegetal (Ryu y col. 2006) y *Glomus* del cual productores recomiendan recubrir las semillas con este mismo fin (comunicación personal). Todos los tratamientos presentaron diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, el grado de estimulación del consorcio *Methylobacterium* y *Glomus* mostró una diferencia estadísticamente significativa respecto a los demás tratamientos (**tabla 1**), evidenciando una articulación conjunta benéfica por la acción de la bacteria en la parte aérea de la planta y el hongo en el rizoma (**Figura 1**). De igual manera, las inoculaciones realizadas en los tratamientos Tr_1 y Tr_2 presentaron un incremento estadísticamente significativo en R_G y en el SVI con respecto al control sin microorganismos Tr_4 y al tratamiento donde se aplicó únicamente *Glomus* Tr_3 (**Tabla 1**)



Figura 1. Efecto de la presencia del consorcio *Methylobacterium* + *glomus* en el desarrollo de plantas de jitomate. **C** = control, **M+G** = *Methylobacterium* + *Glomus*, **M** = *Methylobacterium* y **G** = *Glomus*.

Tabla 1. Índice de germinación e índice de vigor de la plántula

Tratamientos	Índice de germinación (R_G)	Índice de vigor de la plántula (SVI)
Tr ₁ (<i>Methylobacterium</i>)	86.67 ^a ± 0.75	1200 ^a ± 30.00
Tr ₂ (<i>Methylobacterium</i> + <i>Glomus</i>)	92.50 ^b ± 0.12	1650 ^b ± 91.12
Tr ₃ (<i>Glomus</i>)	52.93 ^c ± 0.28	735 ^c ± 54.12
Tr ₄ Control sin microorganismos	54.28 ^d ± 0.67	691 ^d ± 48.95
LDS (P≤0.05)		

Cada valor representa la media de repeticiones. Letras diferentes en cada columna indican diferencia estadísticamente significativa de acuerdo a la prueba LSD con una significancia P≤0.05

3.2. Actividad de las Proteínas Relacionadas con la Patogénesis

Las actividades de las enzimas *-1,3 glucanasa*, *quitinasa* y *fenilalanina amonio liasa* mantuvieron valores elevados respecto al tratamiento control Tr₄, alcanzando un máximo 4 días antes del inicio de la formación del fruto, sin presentar una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos con microorganismos (**Figura 2**). Sin embargo, la actividad de la *peroxidasa*, a partir del primer día y hasta la formación del fruto para el tratamiento Tr₂ del consorcio *Methylobacterium* + *Glomus* (**Figura 2 D**), presentó una diferencia estadísticamente significativa con una P 0.05 respecto a los demás tratamientos. Por otro lado, el contenido de los compuestos fenólicos, mantuvo niveles elevados respecto al tratamiento control Tr₄, sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con microorganismos (**Figura 2 E**). Los valores de la *quitinasa* y *-1,3 glucanasa* tuvieron un incremento lento hasta alcanzar un máximo en el día 5 después de haber iniciado las mediciones (**Figura 2 A y B**).

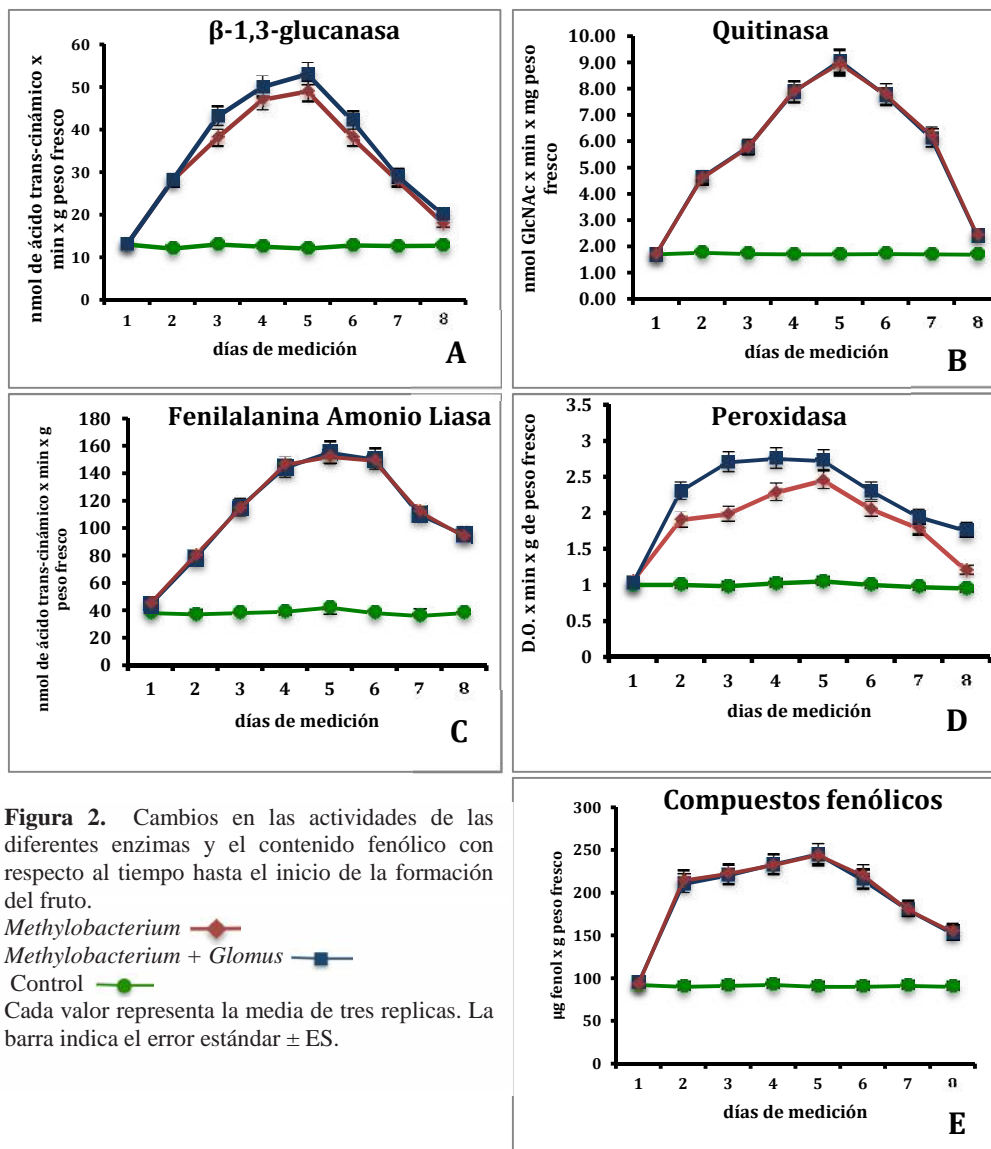


Figura 2. Cambios en las actividades de las diferentes enzimas y el contenido fenólico con respecto al tiempo hasta el inicio de la formación del fruto.

Methylobacterium —◆—
Methylobacterium + Glomus —■—
 Control —●—

Cada valor representa la media de tres replicas. La barra indica el error estándar \pm ES.

4. DISCUSIONES

Los microorganismos benéficos juegan un papel importante en la germinación de las semillas y la relación entre *Methylobacterium* y las plantas ilustran perfectamente esta relación (Holland y col., 2002). En un trabajo publicado por Holland (1997) reporto que las bacterias metilotróficas facultativas (a las que pertenece *Methylobacterium*) pueden ser utilizadas como inóculos en semillas o como recubrimiento de semillas para mejorar la germinación, almacenamiento y vigor. En este trabajo se encontró que esta bacteria puede

seguir manifestando estos efectos en presencia de micorrizas como *Glomus sp* sin menoscabo, mas bien potencializando los efectos de ambos microorganismos en beneficio de la planta. Cuando las plantas son invadidas por microorganismos o dañadas mecánicamente, generalmente se inducen enzimas de defensa y cambios fisiológicos, estas enzimas incluyen a las proteínas relacionadas con la patogénesis y se ha reportado que se acumulan con la aparición de la resistencia sistémica inducida en tratamientos con inductores bióticos y abióticos incrementando las actividades de las enzimas *quitinasa*, *-1,3-glucanasa*, *peroxidasa* y PAL. Sin embargo, las cantidades y actividades varían de acuerdo al tipo de inductor y planta hospedera (Schmid y Uldrich, 1994. Maurhofer y col. (1994) reportaron que la resistencia sistémica inducida por *Pseudomonas* en plantas de tabaco estaba asociada a las enzimas *-1,3-glucanasa* y *quitinasa*, estas enzimas de defensa tienen el potencial para hidrolizar los componentes principales de las paredes celulares de los hongos (Ham y col., 1991; Ren y West, 1992), posteriormente Madhaiyan y col., (2006) investigaron la actividad de estas enzimas al inocular *Methylobacterium* en plantas de cacahuete (*Arachis hypogaea* L.), encontrando un incremento en la actividad enzimática, pero sin diferencias estadísticamente significativas entre los dos fitopatógenos ensayados. Las peroxidases han sido implicadas en un gran número de funciones fisiológicas que pueden contribuir a la resistencia incluida la oxidación del alcohol hidroxycinamil a radicales libres intermediarios (Schmid y Feucht, 1980), lignificación (Walter, 1992), y la deposición de material fenólico en las paredes de las células vegetales durante la interacción de resistencia (Graham y Graham, 1991).

La actividad de la resistencia sistémica inducida en las plantas de jitomate por la presencia tanto de *Methylobacterium* como del consorcio *Methylobacterium-Glomus* nos presenta una opción viable como control biológico.

Este trabajo enfatiza la importancia de considerar consorcios de microorganismos que puedan trabajar de manera sinérgica para beneficio de los cultivos comerciales y atenuar el impacto de los agroquímicos en los ecosistemas y la salud humana.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Al-Karaki GN. 2006. Nursery inoculation of tomato with arbuscular mycorrhizal fungi and subsequent performance under irrigation with saline water. *Sci Hort* 109:1–7.

Artursson V, Finlay RD, Jansson JK. 2006. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environ Microbiol* 8:1–10.

Austin, B. and M. Goodfellow. 1979. *Pseudomonas mesophilica*, a new species of pink bacteria isolated from leaf surfaces. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 29: 373.

Baki, A.A. and J.D. Anderson. 1973. Vigour determination in soybean seed by multiple criteria. *Crop Sci.* 13: 630-632.

- Berger, L.R. and D.M. Reynolds. 1958. The chitinase system of a strain of *Streptomyces griseus*. *Biochem. Biophys. Acta.* 29: 522-534.
- Boller, T. and F. Mauch. 1988. Colorimetric assay for chitinase. *Meth. Enzymol.* 161: 430-435.
- Cervantes-Martinez, J.; Lopez-Diaz, S. and Rodriguez-Garay, B. 2004. Detection of the effects of *Methylobacterium* in *Agave tequilana* Weber var. azul by laser-induced fluorescence. *Plant Sci* 166: 889–892.
- Compant S, Nowak J, Coenye T, Clement C, Ait Barka E. 2010. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. *FEMS Microbiol Rev* 32:607– 626.
- Dickerson, D.P., S.F. Pascholati, A.E. Hagerman, L.G. Butler, and R.L. Nicholson. 1984. Phenylalanine ammonia-lyase and hydroxycinnamate: CoA ligase in maize mesocotyls inoculated
- Freyermuth, S.; Long, R. and Mathur, S. 1996. Metabolic aspects of plant interaction with commensal methylotrophs. In: Lidstrom ME, Tabita FR (eds) *Microbial growth on C1 compounds*. Kluwer, Dordrecht, pp 277–284.
- Gan, S., and Amasino, R. M. (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* 270: 1986–1988. Itai, C., and Vaadia, Y. (1971) Cytokinin activity in water-stressed shoots. *Plant Physiol.* 47: 87–90.
- Gerdemann JW, Nicolson TH (1963) Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans Br Mycol Soc* 46(2):235–244
- Graham, M.Y. and T.L. Graham. 1991. Rapid accumulation of anionic peroxidases and phenolic polymers in soybean cotyledon tissues following treatment with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* wall glucan. *Plant Physiol.* 97: 1445-1456.
- Green, P.N. and I.J. Bousfield. 1982. A taxonomic study of some Gram-negative facultatively methylotrophic bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 128: 623.
- Green, P.N. and I.J. Bousfield. 1983. Emendation of *Methylobacterium* Patt, Cole and Hanson 1976, *Methylobacterium rhodium* (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.
- Ham, K.S., S. Kauffmann, P. Albersheim, and A.G. Darvil. 1991. A soybean pathogenesis-related protein with -1,3- glucanase activity releases phytoalexin elicitor-active heatstable fragments from fungal cell walls. *Mol. Pl. Microbe Interact.* 4: 545-552.
- Hammerschmidt, R. and J.A. Kuc. 1982. Lignification as a mechanism for induced

systemic resistance in cucumber. *Physiol. Pl. Pathol.* 20: 61-71.

He, X. and Nara, K. 2007. Element biofortification: can mycorrhizas potentially offer a more effective y sustainable pathway to curb human malnutrition? *Trends Plant Sci* 12:331–333.

Hernández-Lauzardo, A.N.; Velázquez-del Valle, M.G.; Vernanza-Castelán, L.; Melo Giorgana, G.E. y M.G. Guerra-Sánchez. 2009. Effect of chitosan on three isolates of *Rhizopus stolonifer* obtained from peach, papaya and tomato. *Fruits*. 65:245-253pp.

Hock, B. and Varma, A. 1995. *Mycorrhiza structure, function, molecular biology and biotechnology*. Springer, Berlin.

Holland, M. 1997. Occams razor applied to hormonology. Arecytokinins produced by plants? *Plant Physiol* 115:865–868.

Holland, M, Davis R, Moffitt S, O’Laughlin K, Peach D, Sussan S, Wimbrow L and Tayman B. 2000. Using “Leaf Prints” to invetigate common bacterium. *Am. Biol. Teacher*. 62:128-131.

Holland, M.A., R.L.G. Long, and J.C. Polacco. 2002. *Methylobacterium* spp.: phylloplane bacteria involved in cross-talk with the plant host?. In S. E. Lindow, E. I. Hecht- Poinar, and V. J. Elliot (eds.), *Phyllosphere Microbiology*, APS Press, St. Paul, Minn., pp. 125-135.

Hosseini, S.Z. and M. Jafari. 2002. Investigation on effect of salinity stress on germination of three accessions of tall wheat grass (*Agropyron elongatum*). Paper no. 2289, 17th WCSS, 14-21 August 2002, Thailand.

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

Kloepper, J. W., R. Lifshitz, and R. M. Zablotowicz. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* 7: 39–44.

Koch E, Meier BM, Eiben HG, Slusarenko A. 1992. A lipoxygenase from leaves of tomato (*Lycopersicom esculentum* Mill) is induced in response to plant pathogenic pseudomonads. *Plant Physiol* 99:571–576.

Letham, D. S. (1974) Regulators of cell division in plant tissues XX. The cytokinins of coconut milk. *Physiol. Plant.* 32: 66–70.

Lukyanenko, A.N. 1991. Disease resistance. In: *Monographs on theoretical and applied genetics* -14. (Ed.G.Kello). Springer Verlag, Berlin Heidelberg, pp.99-119.

Madhaiyan M, Poonguzhali S, Ryu JH, Sa TM. 2006^a 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, Senthilkumar M, Seshadri S, Chung HY, Yang JC, Sundaram SP, Sa TM. 2004. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. *Bot Bull Acad Sin* 45:315–324.

Madhaiyan M, Poonguzhali S, Senthilkumar M, Seshadri S, Chung HY, Yang JC, et al. 2004. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 45:315–324.

Madhaiyan, M.; Poonguzhali, S.; Senthilkumar, M.; Seshadri, S.; Chung, H.; Yang, J.; Sundaram, S. and Sa, T. 2004. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. *Bot Bull Acad Sin* 45:315–324.

Manjula, G.; Pfeiffer, P.; Hairu, J.; Jehad, A.; Douds, D.; Allen, J.; Buching, H.; Peter, J. and Yair, S. 2005. Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature* 453:819–823.

Maurhofer, M., C. Hase, P. Meuwly, T.P. Mettraux, and G. Defago. 1994. Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO: influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology* 84: 139- 146.

Miller, C. O., Skoog, F., Von Saltza, M. H., and Strong, F. 1955. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 77: 1392–1393.

Omer, Z.S., R. Tombolini, and B. Gerhardson. 2004. Plant colonization by pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria (PPFMs). *FEMS Microbiol. Ecol.* 47: 319-326.

Pan, S.Q., X.S. Ye, and J. Kuc. 1991. Association of α -1,3- glucanase activity and isoform pattern with systemic resistance to blue mould in tobacco induced by stem injection with *Pernospora tabacina* or leaf inoculation with tobacco mosaic virus. *Physiol. Molec. Pl. Pathol.* 39: 25-39.

Patt, T.E., G.C. Cole, and R.S. Hanson. 1976. *Methylobacterium*, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 26: 226-229.

Reissig, J.L., J.L. Stromer, and L.F. Leloir. 1959. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl sugars. *J. Biol. Chem.* 217: 959-962.

Ren, Y.Y. and C.A. West. 1992. Elicitation of diterpene biosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) by chitin. *Pl. Physiol.* 9: 1169-1178.

Ryu, J., Munusamy M., SelvAradj P., Woojong Y., Pandiyan I., Kyounga K., Rangasamy A., Jongchul Y., Kye H. K. and Ngmin S. 2006. Plant Growth Substances Produced by

Methylobacterium spp. and Their Effect on Tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) and Red Pepper (*Capsicum annuum* L.) Growth *J Microbial. Biotechnol.* (2006), 16: 1622-1628

Schmid, P.S. and W. Feucht. 1980. Tissue specific oxidation of browning of polyphenols by peroxidase in cherry shoots. *Gartenbauwissenschaft* 45: 68-73.

Schmid, P.S. and W.R. Ullrich. 1994. Differential induction of resistance and enhanced enzyme activities in cucumber and tobacco caused by treatment with various abiotic and biotic inducers. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 45: 291-304.

Swain, T. and W.E. Hillis. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica* I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* 10: 63-68.

Trotsenko, Y., Doronina, N. and Khmelenina V. 2005. Biotechnological Potential of Aerobic Methylophilic Bacteria: A Review of Current State y Future Prospects *Applied Biochemistry y Microbiology.* 41 433–441.

Van Loon LC, Bakker PA & Pieterse CMJ. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Ann Rev Phyto* 36: 453–483.

Walter, M.H. 1992. Regulation of lignification in defense. In T. Boller. and F. Meins (eds.), *Genes Involved in Plant Defenses*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, pp. 327-352.

Werner, T., Motyka, V., Strnad, M., and Schmülling, T. 2001. Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 10487–10492.

Whittenbury, R., S.L. Davies, and J.F. Wilkinson. 1970. Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 61: 205-218.