

Evaluation of *Bacillus* and *Pseudomonas* to colonize the rhizosphere and their effect on growth promotion in tomato (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.)

Evaluación de *Bacillus* y *Pseudomonas* para colonizar la rizosfera y su efecto en la promoción del crecimiento en tomate (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.)

Daniel Rojas-Solís; Claudia E. Hernández-Pacheco; Gustavo Santoyo*

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Ciudad Universitaria, Edificio A1', Morelia, Michoacán, C.P. 58030, MÉXICO.

Email: gsantoyo@umich.mx (*Corresponding author).

Abstract

One of the main characteristics that plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) must have is good rhizosphere colonization. This study evaluates the ability of five PGPR separately and together (*Bacillus-Pseudomonas*), including four strains of *Pseudomonas fluorescens* (UM16, UM240, UM256 and UM270) and one of *Bacillus thuringiensis* (UM96), to colonize the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) plants. Additionally, the promoting effect of the bacterial consortium on green tomato (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) seedlings was assessed. The results showed that the five strains analyzed are highly competent to colonize the rhizosphere, in addition to not presenting antagonism *in vitro* between them. The recovered strains were analyzed by means of their natural resistance to carbenicillin and by means of random amplified polymorphic DNA. Also, by assessing the growth-promoting effect of inoculating the strains together, only the combination of *B. thuringiensis* UM96 and *P. fluorescens* UM16 significantly improved the total fresh weight of the tomato seedlings and increased hypocotyl and root length. The *P. fluorescens* strains, separately, were the only ones that showed a beneficial effect on seedling development. The results showed that only the UM96-UM16 consortium had beneficial interaction with the plant, while separately the strains showed broad potential for colonizing the rhizosphere and promoting tomato plant growth.

Keywords: plant-bacteria interaction, bioinoculant, growth-promoting effect, seedling.

Resumen

Una de las principales características que deben presentar las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) es una buena colonización de la rizosfera. En el presente trabajo se evaluó la capacidad de colonización de la rizosfera de plantas de maíz (*Zea mays* L.) con cinco RPCV por separado y en conjunto (*Bacillus-Pseudomonas*), incluyendo cuatro cepas de *Pseudomonas fluorescens* (UM16, UM240, UM256 y UM270) y una de *Bacillus thuringiensis* (UM96). Adicionalmente, se evaluó el efecto promotor del consorcio bacteriano en plántulas de tomate verde (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.). Los resultados mostraron que las cinco cepas analizadas son altamente competentes para colonizar la rizosfera, además de no presentar antagonismo *in vitro* entre ellas. Las cepas recuperadas se analizaron por medio de su resistencia natural a carbencilina y por medio de la amplificación de fragmentos al azar de polimorfismos del ADN. Asimismo, al evaluar el efecto promotor de la inoculación de las cepas en conjunto, únicamente la combinación de *B. thuringiensis* UM96 y *P. fluorescens* UM16 mejoró significativamente el peso fresco total de las plántulas de tomate e incrementó la longitud del hipocótilo y la raíz. Las cepas de *P. fluorescens*, por separado, fueron las únicas que mostraron un efecto benéfico sobre el desarrollo de las plántulas. Los resultados mostraron que solamente el consorcio UM96-UM16 tuvo interacción benéfica con la planta; mientras que por separado, las cepas presentaron amplio potencial de colonización de la rizosfera y promoción del crecimiento vegetal del tomate.

Palabras clave: interacción planta-bacteria, bioinoculante, efecto promotor, plántula.



Introduction

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) have been widely studied for their ability to improve plant health and development. The positive activities that they exert on plants can include those that are of agricultural interest, increasing production and reducing costs, in addition to not causing harm to the environment or human health. Recent studies clearly show that the use of PGPR in agricultural crops can help to reduce the use of agrochemicals (Adesemoye & Kloepper, 2009). Similarly, PGPR can exert biological control against several phytopathogens, whether fungi, insects, bacteria or other organisms, which prevents the proliferation of plant diseases (Keel et al., 1992).

It has been proposed that PGPR can exert several mechanisms from and through the colonization of the rhizosphere. These can be defined as direct or indirect (Santoyo, Orozco-Mosqueda, & Govindappa, 2012). Indirect mechanisms can include those where bacteria produce antibiotics and other metabolites with antagonistic effect towards phytopathogens (Ahmad, Ahmad, & Khan, 2008; Santoyo, Moreno-Hagelsieb, Orozco-Mosqueda, & Glick, 2016). On the other hand, direct ones are those where bacteria have a direct impact on plant growth and development through synthesis of phyto-stimulating substances (auxins, cytokinins, indoleacetic acid, etc.) and excretion of volatile organic compounds (acetoin, sulfur compounds, etc.) (Noh-Medina, Yam-Chimal, Borges-Gómez, Zúñiga-Aguilar, & Godoy-Hernández, 2014; Hernández-León et al., 2015). These mechanisms can also include the synthesis of compounds that enhance plant immunity (jasmonic acid, 2-hydroxybenzoic acid or phytoalexins) (Ahmad et al., 2008).

The rhizosphere has been described as a highly competitive environment for microorganisms due to the need to occupy spaces and obtain nutrients (Raaijmakers, Vlam, & de Souza, 2002). Therefore, those beneficial organisms or phytopathogens that are highly competitive for colonizing and obtaining nutrients are going to proliferate in that microclimate and possibly have an effect on the development and health of the plant (Haas & Keel, 2003). Unfortunately, many of the studies that attempt to use PGPR as bioinoculants do not turn out as desired, since these strains are not competent in the rhizosphere or there is some antagonism among them, producing inconsistent results in the field (Kang, Shen, Yang, Cheng, & Zhao, 2014). Similarly, few studies follow up on bacterial inoculation experiments in the analysis of survival and competition to colonize spaces.

Therefore, one of the aims of this work was to analyze the ability of selected strains of *Bacillus* and *Pseudomonas*

Introducción

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) han sido ampliamente estudiadas por su capacidad para mejorar la salud y el desarrollo de las plantas. Las actividades positivas que ejercen en las plantas pueden incluir aquellas que son de interés agrícola, incrementando la producción y reduciendo costos, además de no causar daños al ambiente o la salud humana. Estudios recientes muestran claramente que el empleo de RPCV en cultivos agrícolas puede ayudar a disminuir el uso de agroquímicos (Adesemoye & Kloepper, 2009). De igual forma, las RPCV pueden ejercer control biológico en diversos fitopatógenos, ya sean hongos, insectos, bacterias u otros organismos, lo que evita la proliferación de enfermedades vegetales (Keel et al., 1992).

Se ha propuesto que las RPCV pueden ejercer diversos mecanismos desde y a través de la colonización de la rizosfera. Éstos se pueden definir como directos o indirectos (Santoyo, Orozco-Mosqueda, & Govindappa, 2012). Los indirectos pueden incluir aquellos donde las bacterias producen antibióticos u otros metabolitos con efecto antagónico hacia los fitopatógenos (Ahmad, Ahmad, & Khan, 2008; Santoyo, Moreno-Hagelsieb, Orozco-Mosqueda, & Glick, 2016). Mientras que los directos son aquellos donde la bacteria influye directamente sobre el crecimiento y desarrollo vegetal a través de la síntesis de sustancias fitoestimuladoras (auxinas, citocininas, ácido indolacético, etc.) y excreción de compuestos orgánicos volátiles (acetoina, compuestos azufrados, etc.) (Noh-Medina, Yam-Chimal, Borges-Gómez, Zúñiga-Aguilar, & Godoy-Hernández, 2014; Hernández-León et al., 2015). En estos mecanismos también se puede incluir la síntesis de compuestos que refuerzan la inmunidad vegetal (ácido jasmónico, ácido 2-hidroxibenzoico o fitoalexinas) (Ahmad et al., 2008).

Se ha descrito que la rizosfera es un ambiente altamente competitivo para los microorganismos por la necesidad de ocupar espacios y obtener nutrientes (Raaijmakers, Vlam, & de Souza, 2002). Por lo tanto, aquellos organismos benéficos o fitopatógenos, que sean altamente competitivos para colonizar y obtener nutrientes van a proliferar en dicho microambiente y, posiblemente, ejercer un efecto en el desarrollo y salud de la planta (Haas & Keel, 2003). Desafortunadamente, muchos de los estudios que pretenden emplear RPCV como bioinoculantes no resultan como se desearía, ya que dichas cepas no son competentes en la rizosfera o existe cierto antagonismo entre ellas, llegando a producir resultados no consistentes en campo (Kang, Shen, Yang, Cheng, & Zhao, 2014). De igual forma, pocos trabajos dan seguimiento a experimentos de inoculación bacteriana en el análisis de sobrevivencia y competencia por colonizar espacios.

to colonize, survive and compete for space on maize (*Zea mays*) roots. The strains used in this experiment have been previously characterized and shown an excellent ability to improve plant growth, in addition to exhibiting antagonism towards various phytopathogens (Martínez-Absalón et al., 2012; Martínez-Absalón et al., 2014; Hernández-León et al., 2015). These experiments included monitoring the colonization in non-sterile soil of the strains, either separately or in a consortium, using the method proposed by Scher, Ziegler, and Kloepper (1984). Since the strains selected in this work have shown multiple mechanisms for plant growth promotion and biocontrol of phytopathogens, all this separately, another of the aims was to assess the promoting effect of the co-inoculation of *Bacillus* and *Pseudomonas* mixtures in green tomato plants in experiments *in vitro*.

Materials and methods

Biological material

The bacterial strains used were *Bacillus thuringiensis* UM96 and *Pseudomonas fluorescens* UM16, UM240, UM256 and UM270, which were isolated from the rhizosphere of plants and previously characterized (Martínez-Absalón et al., 2012 and 2014; Hernández-León et al., 2015; Hernández-Salmerón et al., 2016). The maize (*Zea mays*) and green tomato (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) seeds were acquired at the “Vita” commercial seed store (Morelia, Michoacán, Mexico).

Antagonism experiment between strains

Before performing bacterial co-inoculation experiments, it was determined whether there is any antagonism *in vitro* between the analyzed strains (Garbeva, Silby, Raaijmakers, Levy, & de Boer, 2011). Therefore, *B. thuringiensis* UM96 and *P. fluorescens* UM16, UM240, UM256 and UM270 were cultured for 24 h, and the optical density (OD) was measured; subsequently, $1 \times 10^6 \pm 0.1 \times 10^6$ colony forming units (CFU) of each strain were inoculated. This was done in Petri dishes with nutrient agar (NA) by way of drops, 1.5 cm apart. After the drop had dried, the specimens were incubated at 28 °C for 24 h. Three replications were performed for each treatment. Next, the growth of each dish was collected separately and dilutions were performed to determine the CFU again (Garbeva et al., 2011).

Bacterial inoculation and seed treatment

To determine the colonization ability of the bacterial strains of *B. thuringiensis* and *P. fluorescens*, the method proposed by Scher et al. (1984), with some modifications, was used. This method suggests analyzing the colonization of the root or rhizoplane;

Por lo anterior, en este trabajo uno de los objetivos fue analizar la capacidad de colonización y sobrevivencia de cepas seleccionadas de *Bacillus* y *Pseudomonas* de raíces de Maíz (*Zea mays*). Las cepas empleadas en este experimento han sido caracterizadas previamente y mostrado una excelente capacidad para mejorar el crecimiento vegetal, además de exhibir antagonismo hacia diversos fitopatógenos (Martínez-Absalón et al., 2012; Martínez-Absalón et al., 2014; Hernández-León et al., 2015). Dichos experimentos incluyeron el seguimiento de la colonización en suelo no estéril de las cepas, ya sea por separado o en consorcio, empleando el método propuesto por Scher, Ziegler, y Kloepper (1984). Debido a que las cepas seleccionadas en este trabajo han mostrado múltiples mecanismos de promoción del crecimiento vegetal, así como de biocontrol de fitopatógenos, todo esto por separado, otro de los objetivos fue evaluar el efecto promotor de la co-inoculación de mezclas de *Bacillus* y *Pseudomonas* en plantas de tomate verde en experimentos *in vitro*.

Materiales y métodos

Material biológico

Las cepas bacterianas empleadas fueron *Bacillus thuringiensis* UM96 y *Pseudomonas fluorescens* UM16, UM240, UM256 y UM270; las cuales fueron aisladas de la rizosfera de plantas y caracterizadas previamente (Martínez-Absalón et al., 2012 y 2014; Hernández-León et al., 2015; Hernández-Salmerón et al., 2016). Las semillas de maíz (*Zea mays*) y de tomate verde (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) fueron adquiridas en la casa comercial de semillas “Vita” (Morelia, Michoacán, México).

Experimento de antagonismo entre cepas

Antes de realizar experimentos de co-inoculación bacteriana, se determinó si existe antagonismo *in vitro* entre las cepas analizadas (Garbeva, Silby, Raaijmakers, Levy, & de Boer, 2011). Por lo tanto, se cultivaron *B. thuringiensis* UM96 y *P. fluorescens* UM16, UM240, UM256 y UM270 por 24 h, y se midió la densidad óptica (DO); posteriormente, se inocularon $1 \times 10^6 \pm 0.1 \times 10^6$ unidades formadoras de colonia (UFC) de cada cepa. Esto se hizo en cajas Petri con agar nutritivo (AN) a manera de gota, a 1.5 cm de distancia. Se esperó a que la gota se secara y se incubaron en 28 °C durante 24 h. Se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento. En seguida, se recogió el crecimiento de cada caja por separado y se realizaron diluciones para determinar nuevamente las UFC (Garbeva et al., 2011).

Inoculación bacteriana y tratamiento de las semillas

Para determinar la capacidad de colonización de las cepas bacterianas de *B. thuringiensis* y *P. fluorescens*, se

however, in this study, colonization of the rhizosphere is considered. From 25 to 30 *Zea mays* seeds were inoculated (per treatment) with each of the *Bacillus* and *Pseudomonas* strains, as well as the following combinations (consortia) between *B. thuringiensis* strain UM96 and each of the *P. fluorescens* strains (UM96 + UM16, UM96 + UM240, UM96 + UM256 and UM96 + UM270). Each seed was inoculated with 10^3 to 10^4 CFU of each strain, and the consortia were inoculated with 10^5 to 10^6 CFU per seed, in solution with 0.1 M of $MgSO_4$. The control seeds were inoculated with only the $MgSO_4$ solution. The standard deviation in each inoculum was never greater than 10 %. Mean CFU per seed was determined in triplicate after culturing in Petri dishes with NA at 28 °C for 48 h.

Rhizosphere colonization experiments

Once the seeds were inoculated, each one was placed in a separate 25 x 200 mm glass tube, which had previously been filled with sand (6 cm). Next, soil (4 cm) was added and they were sealed with Parafilm. The soil was collected in Zamora, Michoacán, Mexico. Its physicochemical characteristics have been previously analyzed and published (Velázquez-Sepúlveda, Orozco-Mosqueda, Prieto-Barajas, & Santoyo, 2012). The tubes were placed in a Percival growth chamber (Percival Scientific, Perry, IA USA), with a photoperiod of 16 h light: 8 h dark at 22 °C for 30 days. Three replicates were performed for each treatment.

After 30 days of incubation, the plants were carefully removed and the roots that had grown in the sand were cut and 1-g fragments obtained. Each fragment was placed in a 1-mL vial containing 0.1 M of $MgSO_4$; dilutions (in triplicate) were performed and it was plated in NA with 100 µg of carbenicillin per mL. To confirm that the recovered colonies belong to the pre-inoculated strains, random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis was carried out. For this purpose, genomic DNA was isolated (Sambrook & Russel, 2001) from randomly-chosen colonies to amplify, by polymerase chain reaction (PCR), the banding pattern of each strain with oligonucleotide OPA-02 (5'-TGCCGAGCTG-3') (Hernández-Salmerón, Prieto-Barajas, Valencia-Cantero, Moreno-Hagelsieb, & Santoyo, 2014).

Growth-promoting effect on *Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.

To determine the promoting effect of the strains separately and in a consortium, we used the Long, Schmidt, and Baldwin (2008) method of inoculating seeds (seedling vigor) on paper, with some modifications. Subsequently, green tomato seeds were sterilized and inoculated with the different bacterial culture treatments (10^8 CFU·mL⁻¹) in sterile distilled

empleó el método propuesto por Scher et al. (1984), con algunas modificaciones. Este método sugiere el análisis de colonización de raíz o rizoplaneo; sin embargo, en este trabajo se considera a la colonización como parte de la rizosfera. Se inocularon (por tratamiento) de 25 a 30 semillas de *Zea mays* con cada una de las cepas de *Bacillus* y *Pseudomonas*, así como las siguientes combinaciones (consorcios) entre la cepa *B. thuringiensis* UM96 y cada una de las *P. fluorescens* (UM96 + UM16, UM96 + UM240, UM96 + UM256 y UM96 + UM270). Cada semilla se inoculó de 10^3 a 10^4 UFC de cada cepa, y de los consorcios se inocularon de 10^5 a 10^6 UFC por semilla, en solución con 0.1 M de $MgSO_4$. Las semillas control fueron inoculadas únicamente con la solución $MgSO_4$. La desviación estándar en cada inóculo nunca fue mayor al 10 %. La media de las UFC por semilla fue determinada por triplicado después de cultivarse en cajas Petri con AN en 28 °C durante 48 h.

Experimentos de colonización rizosférica

Una vez que las semillas se inocularon, se colocó una por cada tubo de vidrio de 25 x 200 mm, los cuales habían sido previamente llenados con arena (6 cm). Después, se agregó suelo (4 cm) y se sellaron con Parafilm. El suelo se colectó en Zamora, Michoacán, México, cuyas características físicoquímicas han sido analizadas y publicadas previamente (Velázquez-Sepúlveda, Orozco-Mosqueda, Prieto-Barajas, & Santoyo, 2012). Los tubos se colocaron en una cámara de crecimiento Percival (Percival Scientific, Perry, IA USA), con fotoperiodo de 16 h luz por 8 h oscuridad a 22 °C durante 30 días. Se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento.

Después de 30 días de incubación, las plantas se removieron cuidadosamente y las raíces que crecieron en la arena se cortaron y obtuvieron fragmentos de 1 g. Cada fracción se colocó en un vial con 1 mL de 0.1 M de $MgSO_4$, se realizaron diluciones (por triplicado) y se plaquéó en AN con 100 µg de carbencilina por mL. Para corroborar que las colonias recuperadas pertenecieran a las cepas pre-inoculadas, se llevaron a cabo análisis de amplificación de fragmentos al azar de polimorfismos del ADN (*random amplified polymorphic DNA*, RAPD por sus siglas en inglés). Para tal objetivo, se aisló el ADN genómico (Sambrook, & Russel, 2001) de colonias elegidas al azar para amplificar, por reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR por sus siglas en inglés), el patrón de bandas de cada cepa con el oligonucleótido OPA-02 (5'-TGCCGAGCTG-3') (Hernández-Salmerón, Prieto-Barajas, Valencia-Cantero, Moreno-Hagelsieb, & Santoyo, 2014).

Efecto promotor del crecimiento en *Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.

Para determinar el efecto promotor de las cepas por separado y en consorcio, se empleó el método de Long,

water for 24 h. Control seeds were treated only with sterile distilled water for the same time. Subsequently, 15 to 20 treated seeds, as well as the respective controls, were placed on Whatman paper immersed in distilled water, wrapped in polyethylene to prevent drying, and incubated at 25 °C for seven days. The percentage of germinated seeds, the length of the hypocotyl and root, and the total weight of the seedlings were quantified. Three replications were performed for each treatment.

Results and discussion

Antagonism *in vitro* between strains

When attempting to perform bacterial co-inoculation experiments, one of the first aspects to be analyzed is the antagonism between strains, especially if they are of different species. Therefore, panel A (Figure 1) shows the growth of the *B. thuringiensis* and *P. fluorescens* strains, which were co-inoculated in the same Petri dish. The result shows that the development of both strains does not have any kind of antagonism, since there were no significant differences in the CFU at the end of the experiment. Panel B (Figure 1) shows the growth of the confrontation experiment where, similarly, no antagonism is observed, indicating that the growth of any *P. fluorescens* strain in the presence of *B. thuringiensis* is not affected, and vice versa.

The PGPR commonly contain an array of antimicrobial metabolites. In particular, bacteria belonging to the genera *Bacillus* and *Pseudomonas* produce compounds such as antibiotics, lipopeptides, bacteriocins and volatile compounds (Glick, 2014; Santoyo et al., 2012). The analyzed bacteria belong to gram-positive (*Bacillus*) and gram-negative (*Pseudomonas*) microorganisms, so it could be hypothesized that any antibiotic that affects the cell wall could inhibit their growth.

Other studies have shown antagonistic effects between PGPR, which are excellent bioinoculants separately, but not when they are in a consortium (Kang et al., 2014). However, in this study no *in vitro* antagonism between *Bacillus* and *Pseudomonas* strains was directly observed, so we proceeded to study whether there was some sort of synergistic effect.

Rhizosphere colonization

Having determined that there is no antagonism between the strains, we proceeded to perform the root (or rhizosphere) colonization experiment in maize plants. Table 1 shows the results. In the case of *B. thuringiensis* strain UM96, 2.6×10^3 CFU were inoculated per seed and 1.42×10^7 CFU were recovered per seed, representing a significant increase. The same was observed in all four *Pseudomonas* strains, where it increased from between 10^3 and 10^4 to between 10^6 and 10^7 , respectively.

Schmidt, y Baldwin (2008) de inoculación de semillas (vigor de plántulas) en papel, con algunas modificaciones. Posteriormente, semillas de tomate verde se esterilizaron e inocularon con los diferentes tratamientos de cultivos bacterianos (10^8 UFC·mL⁻¹) en agua destilada estéril por 24 h. Las semillas control únicamente se trataron con agua destilada estéril por el mismo tiempo. Subsiguientemente, de 15 a 20 semillas tratadas, y los respectivos controles, se colocaron en papel Whatman inmerso en agua destilada, envuelto en polietileno para evitar desecación, e incubadas en 25 °C por siete días. Se cuantificó el porcentaje de semillas germinadas, la longitud del hipocótilo y raíz, y el peso total de las plántulas. Se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento.

Resultados y discusión

Antagonismo *in vitro* entre cepas

Cuando se pretende realizar experimentos de co-inoculación bacteriana uno de los primeros aspectos a analizar es el del antagonismo entre cepas, en especial si se trata de diferentes especies. Por lo tanto, el panel A (Figura 1) muestra el crecimiento de las cepas de *B. thuringiensis* y *P. fluorescens*, las cuales fueron coinoculadas en la misma caja Petri. El resultado evidencia que el desarrollo de ambas cepas no tiene algún tipo de antagonismo, ya que no presenta diferencias significativas en las UFC al final del experimento. En el panel B (Figura 1) se exhibe el crecimiento del experimento de confrontación donde, de igual forma, no se observa antagonismo, lo que indica que no se afecta el crecimiento de alguna cepa de *P. fluorescens* en presencia de *B. thuringiensis*, y viceversa.

Las RPCV contienen comúnmente un arsenal de metabolitos antimicrobianos. En particular, las bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* producen compuestos como antibióticos, lipopéptidos, bacteriocinas y compuestos volátiles (Glick, 2014; Santoyo et al., 2012). Las bacterias analizadas pertenecen a microorganismos gram positivos (*Bacillus*) y gram negativos (*Pseudomonas*), por lo que se podría hipotetizar que algún antibiótico que afecte la pared celular podría inhibir su crecimiento.

Otros estudios han mostrado efectos antagónicos entre RPCV, las cuales por separado son excelentes bioinoculantes, pero no cuando se coinoculan (Kang et al., 2014). Sin embargo, en este trabajo no se observó de forma directa algún tipo de antagonismo *in vitro* entre cepas de *Bacillus* y *Pseudomonas*, por lo que se procedió a estudiar si existía algún tipo de efecto sinérgico.

Colonización de la rizosfera

Una vez determinado que no existía antagonismo entre las cepas, se procedió a realizar el experimento de

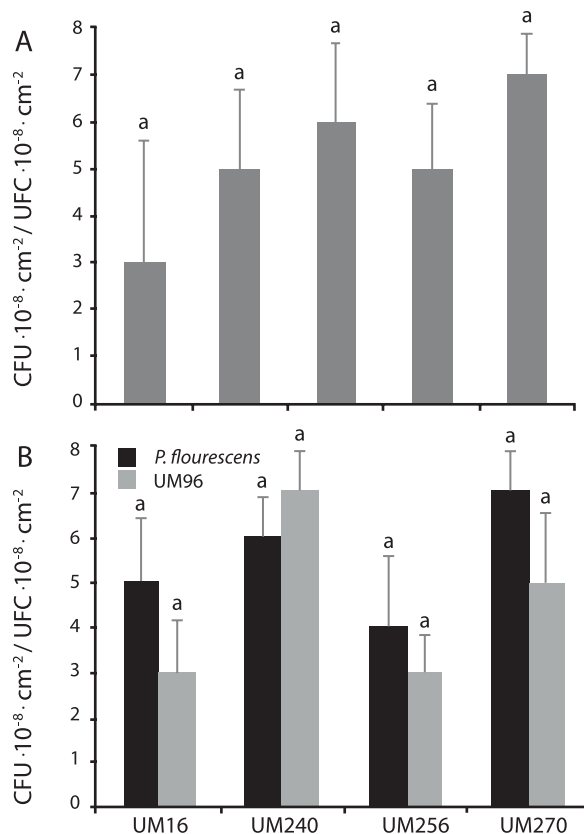


Figure 1. Competitive interaction between *Bacillus thuringiensis* UM96 and *Pseudomonas fluorescens* (UM16, UM240, UM256 and UM270). The upper panel (A) shows the growth of the strains individually in Colony Forming Units (CFU·cm⁻²), while the lower panel (B) shows the values in CFU·cm⁻² of the competition and antagonism between strains. Values shown are the mean of three independent replicates. The bars show the mean $\pm$ standard error values (n^3 15). Different letters above the bars indicate significant differences by means of Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

Figura 1. Interacción competitiva entre *Bacillus thuringiensis* UM96 y *Pseudomonas fluorescens* (UM16, UM240, UM256 y UM270). El panel superior (A) muestra el crecimiento de las cepas de forma individual en Unidades Formadoras de Colonias (UFC·cm⁻²), mientras que el panel inferior (B) muestra los valores en UFC·cm⁻² del experimento de competencia y antagonismo entre cepas. Los valores mostrados son la media de tres réplicas independientes. Las barras muestran la media $\pm$ valores de error estándar (n^3 15). Las letras diferentes encima de las barras indican diferencias significativas por medio de la prueba de rango múltiple de Duncan ($P < 0.05$).

Table 1. Individual colonization ability of the strains *Bacillus thuringiensis* UM96 and *Pseudomonas fluorescens* (UM16, UM240, UM256 and UM270).

Cuadro 1. Capacidad de colonización individual de las cepas *Bacillus thuringiensis* UM96 y *Pseudomonas fluorescens* (UM16, UM240, UM256 y UM270).

Strain/Cepa	CFU per seed/UFC por semilla	CFU·g ⁻¹ per root/UFC·g ⁻¹ por raíz
<i>B. thuringiensis</i> UM96	2.6 x 10 ³ ($\pm$ 0.23 x 10 ³)a	1.42 x 10 ⁷ ($\pm$ 0.12 x 10 ⁷)e
<i>P. fluorescens</i> UM16	1.2 x 10 ³ ($\pm$ 0.19 x 10 ³)a	4.40 x 10 ⁶ ($\pm$ 0.30 x 10 ⁶)d
<i>P. fluorescens</i> UM240	7.0 x 10 ⁴ ($\pm$ 0.63 x 10 ⁴)b	4.42 x 10 ⁷ ($\pm$ 0.48 x 10 ⁷)e
<i>P. fluorescens</i> UM256	2.0 x 10 ⁴ ($\pm$ 0.17 x 10 ⁴)b	4.07 x 10 ⁷ ($\pm$ 0.39 x 10 ⁷)e
<i>P. fluorescens</i> UM270	4.0 x 10 ⁴ ($\pm$ 0.39 x 10 ⁴)b	6.52 x 10 ⁷ ($\pm$ 0.54 x 10 ⁷)e

Values shown are the mean of three independent replicates with $n \geq 25$ seeds inoculated per replica. The standard deviation is shown in parentheses ($\pm$). Different letters indicate significant differences at $\alpha = 0.05$.

Los valores mostrados son la media de tres réplicas independientes con $n \geq 25$ semillas inoculadas por cada réplica. La desviación estándar se muestra entre paréntesis ($\pm$). El análisis estadístico señala con letras distintas diferencias significativas a un α de 0.05.

Having analyzed the colonization ability of the strains separately, the *Bacillus-Pseudomonas* consortia were studied. The experiment results showed high rhizosphere colonization ability in the four consortia (Table 2). For example, UM96 + UM16, UM96 + UM240 and UM96 + UM256 recorded an increase of two orders of magnitude in the CFU recovered per gram of root. In the case of the UM96 + UM270 consortium, 1.0×10^6 CFU were inoculated in seed and 1.9×10^7 CFU were recovered, which shows a significant increase. Thus, it can be seen that the analyzed rhizobacteria show an excellent ability to colonize the root of maize plants, either separately or in a *Bacillus-Pseudomonas* consortium. This confirms that the system proposed by Scher et al. (1984) is an excellent method to assess the colonization ability of rhizobacteria. Therefore, it was decided to assess this ability in isolated strains, whether in sterile soil or where they compete with other microorganisms.

The rhizosphere is a microecosystem where a myriad of interactions take place. This soil area, which is directly influenced by root exudates, can be divided into zones of greater interaction, such as the rhizoplane (Scher et al., 1984). The rhizoplane is the surface part of the root where various microbial species interact with the plant. They can also carry out pathogenic or beneficial interactions; therefore, if beneficial organisms have a good ability to colonize the rhizosphere, they can displace potentially pathogenic microorganisms (Santoyo et al., 2012). Therefore, one of the characteristics that strains intended for use as bioinoculants must have is a good ability to colonize the rhizosphere (Scher et al., 1984).

The bacterial species studied have previously shown excellent antagonism and biocontrol ability against

colonización de raíz (o rizosfera) en plantas de maíz. El Cuadro 1 muestra los resultados obtenidos. En el caso de la cepa *B. thuringiensis* UM96 se inocularon 2.6×10^3 UFC por semilla y se recuperaron 1.42×10^7 UFC por semilla, registrándose un incremento significativo. Lo mismo se observó en las cuatro cepas de *Pseudomonas*, en donde aumentó de entre 10^3 y 10^4 a 10^6 y 10^7 , respectivamente.

Una vez analizada la capacidad de colonización de las cepas por separado, se estudiaron los consorcios *Bacillus-Pseudomonas*. Los resultados del experimento mostraron alta capacidad de colonización de la rizosfera en los cuatro consorcios (Cuadro 2). Por ejemplo, UM96 + UM16, UM96 + UM240 y UM96 + UM256 registraron un incremento de dos órdenes de magnitud en las UFC recuperadas por gramo de raíz. En el caso del consorcio UM96 + UM270 se inocularon en semilla 1.0×10^6 y se recuperaron 1.9×10^7 UFC, lo cual muestra un incremento significativo. De esta manera, se observa que las rizobacterias analizadas muestran excelente capacidad de colonizar la raíz de plantas de maíz, ya sea por separado o en consorcio *Bacillus-Pseudomonas*. Esto confirma que el sistema propuesto por Scher et al. (1984) es un método excelente para evaluar la capacidad de colonización que puedan tener las rizobacterias. Por lo tanto, se decidió evaluar dicha capacidad en cepas aisladas, ya sea en suelo estéril o donde compitan con otros microorganismos.

La rizosfera es un microecosistema donde se llevan a cabo infinidad de interacciones. Dicha zona del suelo, la cual es influida directamente por los exudados radiculares, puede ser dividida en zonas de mayor interacción, tales como el rizoplaneo (Scher et al., 1984). El rizoplaneo es la parte superficial de la raíz donde interaccionan diversas especies microbianas con la planta. Asimismo, pueden llevarse a cabo interacciones

Table 2. Colonization ability of the consortia between *Bacillus thuringiensis* UM96 and each of the strains of *Pseudomonas fluorescens* (UM16, UM240, UM256 and UM270).

Cuadro 2. Capacidad de colonización de los consorcios entre *Bacillus thuringiensis* UM96 y cada una de las cepas de *Pseudomonas fluorescens* (UM16, UM240, UM256 y UM270).

Consortia / Consorcio	CFU per seed / UFC por semilla	CFU·g ⁻¹ per root / UFC·g ⁻¹ por raíz
UM16 + UM96	$4.0 \times 10^5 (\pm 0.38 \times 10^5)$ a	$1.4 \times 10^7 (\pm 0.07 \times 10^7)$ c
UM240 + UM96	$5.3 \times 10^5 (\pm 0.46 \times 10^5)$ a	$2.5 \times 10^7 (\pm 0.17 \times 10^7)$ c
UM256 + UM96	$4.6 \times 10^5 (\pm 0.35 \times 10^5)$ a	$3.4 \times 10^7 (\pm 0.33 \times 10^7)$ c
UM270 + UM96	$1.0 \times 10^6 (\pm 0.08 \times 10^6)$ b	$1.9 \times 10^7 (\pm 0.11 \times 10^7)$ c

Values shown are the mean of three independent replicates with $n \geq 25$ seeds inoculated per replica. The standard deviation is shown in parentheses ($\pm$). Different letters indicate significant differences at $\alpha = 0.05$.

Los valores mostrados son la media de tres réplicas independientes con $n \geq 25$ semillas inoculadas por cada réplica. La desviación estándar se muestra entre paréntesis ($\pm$). El análisis estadístico señala con letras distintas diferencias significativas a un α de 0.05.

various phytopathogens (Martínez-Absalón et al., 2012 and 2014; Hernández-León et al., 2015), including *Botrytis cinerea*, which causes gray mold in more than 200 plant species (Nambeesan et al., 2012). In the case of the *Pseudomonas* strains, it has been observed that they can promote the growth of plants such as *Medicago truncatula* through excretion of various diffusible (siderophores, HCN, 2,4-diacetylphloroglucinol, among others), and volatile metabolites, mainly sulfur compounds such as dimethyl sulfoxide (Hernández-León et al., 2015), while the strain UM96 is an excellent producer of chitinases, involved in biocontrol of the phytopathogen *B. cinerea* (Martínez-Absalón et al., 2014).

Therefore, the synthesis of multiple compounds or metabolites, by the strains analyzed, could be responsible for the high ability to colonize different areas of the rhizosphere, including the rhizoplane. This includes survival and competition in the soil where they cohabit with other microorganisms to occupy spaces, which is known as a mechanism of inhibition of phytopathogens, as well as an indirect way to induce promotion of plant growth and health. Therefore, the bacteria can access the root exudates or nutrients, and thus have beneficial effects on the plant through production of phytoestrogens (Glick, 2014; Santoyo et al., 2012).

Growth-promoting effect in seedlings of *Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.

To determine the promoting effect of the strains 9009 experiments were performed on green tomato (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) seeds. The results show that the strains did not promote germination (data not shown). However, it was observed that the *Pseudomonas* strains, separately, increased hypocotyl and root length, as well as the total fresh weight of the seedlings (Figure 2), while *B. thuringiensis* UM96 only showed significant difference for root length.

With respect to the promoting effect of the co-inoculations, Figure 3 shows the results, where it can be seen that the combinations UM96 + UM16, UM96 + UM240 and UM96 + 270 did not promote the development of the green tomato seedlings. The UM96 + UM256 consortium was the only one that showed significant increases in root and hypocotyl length, as well as the total fresh weight of the seedlings. These results show that certain combinations of *Bacillus* and *Pseudomonas* can exert a repressive effect on plant growth promotion, while some can maintain such an effect separately or in a consortium, such as the UM96 + UM256 mixture.

As far as is known, there is no information about any direct plant growth-promoting effect by *B. thuringiensis*. Therefore, it was not surprising that UM96 did not increase the growth of the tomato seedlings. However,

patógenas o benéficas; por lo tanto, si los organismos benéficos tienen buena capacidad de colonización de la rizosfera pueden desplazar a los microorganismos potencialmente patógenos (Santoyo et al., 2012). Por ello, una de las características que deben presentar las cepas que se pretenden usar como bioinoculantes es buena capacidad de colonización rizosférica (Scher et al., 1984).

Las especies bacterianas estudiadas han mostrado previamente excelente capacidad de antagonismo y biocontrol hacia diversos fitopatógenos (Martínez-Absalón et al., 2012 y 2014; Hernández-León et al., 2015), incluyendo a *Botrytis cinerea*, causante del moho gris en más de 200 especies vegetales (Nambeesan et al., 2012). En el caso de las cepas de *Pseudomonas*, se ha observado que pueden promover el crecimiento de plantas como *Medicago truncatula* a través de la excreción de diversos metabolitos difusibles (sideróforos, HCN, 2,4-diacetylphloroglucinol, entre otros) y volátiles, principalmente compuestos azufrados como el dimetilsulfóxido (Hernández-León et al., 2015); mientras que la cepa UM96 es una excelente productora de quitinasas, involucradas en el biocontrol del fitopatógeno *B. cinerea* (Martínez-Absalón et al., 2014).

Por lo tanto, la síntesis de múltiples compuestos o metabolitos, por parte de las cepas analizadas, podrían ser los responsables de la alta capacidad para colonizar las diversas zonas de la rizosfera, incluyendo el rizoplaneo. Esto incluye la sobrevivencia y competencia en el suelo donde cohabitan con otros microorganismos para ocupar espacios; lo cual es conocido como un mecanismo de inhibición de fitopatógenos, así como una forma indirecta para inducir la promoción del crecimiento y salud vegetal. Por lo tanto, las bacterias podrán acceder a los exudados radiculares o nutrientes, y así ejercer efectos benéficos sobre la planta a través de la producción de fitoestimulantes (Glick, 2014; Santoyo et al., 2012).

Efecto promotor en plántulas de *Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.

Para determinar el efecto promotor de las cepas por separado y en combinaciones, se realizaron experimentos de inoculación en semillas de tomate verde (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.). Los resultados muestran que las cepas no promovieron la germinación (datos no mostrados). Sin embargo, se observó que las cepas de *Pseudomonas*, por separado, incrementaron la longitud del hipocotilo y raíz, así como el peso fresco total de las plántulas (Figura 2), mientras que *B. thuringiensis* UM96 únicamente mostró diferencia significativa para longitud de raíz.

Con respecto al efecto promotor de las co-inoculaciones, la Figura 3 muestra los resultados donde se observa

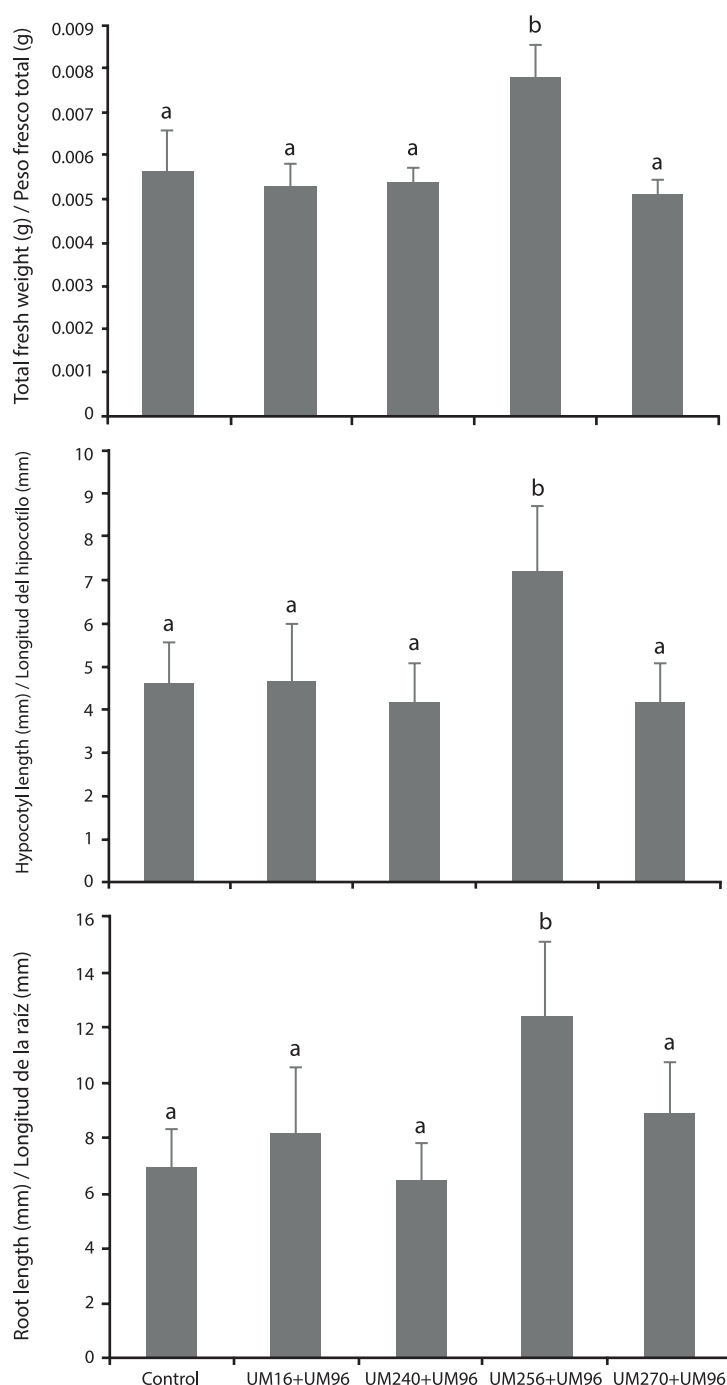


Figure 2. Individual growth-promoting effect of the strains *Bacillus thuringiensis* UM96 and *Pseudomonas fluorescens* (UM16, UM240, UM256 and UM270) on the growth of seedlings of *Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm. Values of fresh weight (g) and root and hypocotyl length (mm) are shown. Values shown are the mean of three independent replicates. The bars show the mean $\pm$ standard error values ($n \geq 15$). Different letters above the bars indicate significant differences by means of Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

Figura 2. Efecto promotor individual de las cepas *Bacillus thuringiensis* UM96 y *Pseudomonas fluorescens* (UM16, UM240, UM256 y UM270) sobre el crecimiento de plántulas de *Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm. Se muestran los valores de peso fresco (g) y longitud de raíz e hipocótilo (mm). Los valores mostrados son la media de tres réplicas independientes. Las barras muestran la media $\pm$ valores de error estándar ($n \geq 15$). Las letras diferentes encima de las barras indican diferencias significativas por medio de la prueba de rango múltiple de Duncan ($P < 0.05$).

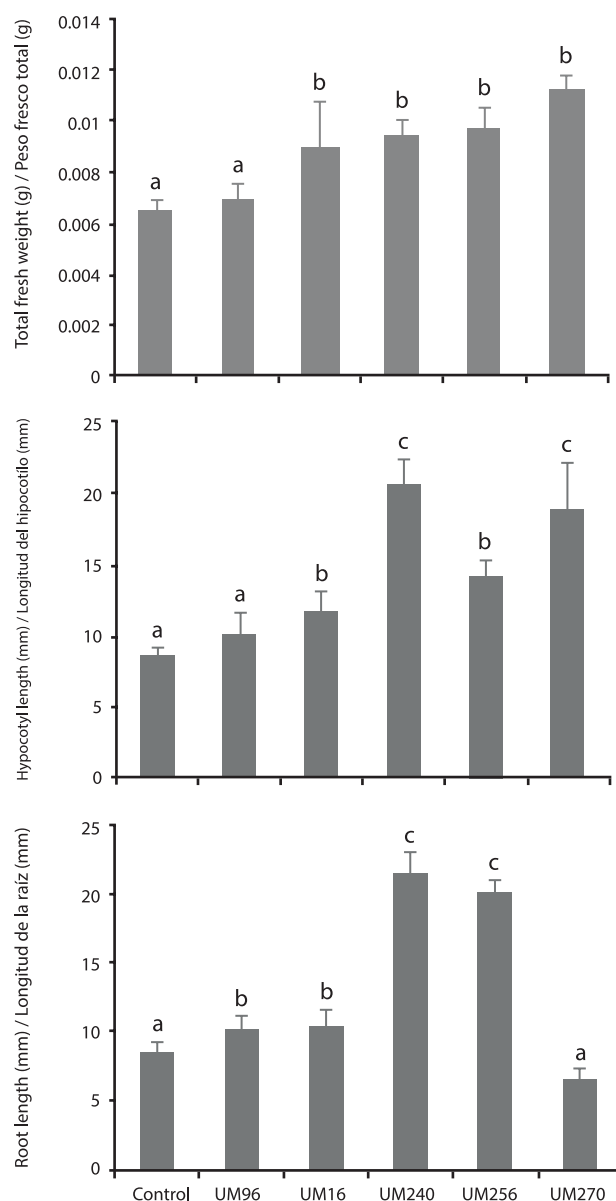


Figure 3. Growth-promoting effect of the consortia between *Bacillus thuringiensis* UM96 and each one of the strains of *Pseudomonas fluorescens* (UM16, UM240, UM256 and UM270) on the growth of seedlings of *Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm. Values of fresh weight (g) and root and hypocotyl length (mm) are shown. Values shown are the mean of three independent replicates. The bars show the mean $\pm$ standard error values ($n \geq 15$). Different letters above the bars indicate significant differences by means of Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

Figura 3. Efecto promotor de los consorcios entre *Bacillus thuringiensis* UM96 y cada una de las cepas de *Pseudomonas fluorescens* (UM16, UM240, UM256 y UM270) sobre el crecimiento de plántulas de *Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm. Se muestran los valores de peso fresco (g) y longitud de raíz e hipocótilo (mm). Los valores mostrados son la media de tres réplicas independientes. Las barras muestran la media $\pm$ valores de error estándar ($n \geq 15$). Las letras diferentes encima de las barras indican diferencias significativas por medio de la prueba de rango múltiple de Duncan ($P < 0.05$).

it is known to have the ability to produce chitinases that can restrict the development of phytopathogenic fungi and thus have an indirect beneficial effect (Martínez-Absalón et al., 2012 y 2014). This activity can supplement those mechanisms by which *P. fluorescens* strains can antagonize fungi such as *B. cinerea* (Hernández-León et al., 2015); therefore, it could be hypothesized that the co-inoculation of strain UM96 plus one of *Pseudomonas*, in a rhizospheric environment, could provide the plant with better protection against pathogen attack.

On the other hand, there are studies that propose the use of mixtures of beneficial bacteria to enhance plant growth-promoting abilities (Raupach & Kloepper, 1998). However, the results of this work show that not all *Bacillus-Pseudomonas* combinations can work, since three combinations (UM96 + UM16, UM96 + UM240, UM96 + UM270) did not promote seedling development; on the contrary, the promoting effect of *Pseudomonas* was inhibited by the presence of strain UM96. The only combination that was successful and that maintained a promoting effect was UM96 + UM256.

Kang et al. (2014) found in tomato plants that *Bacillus pumilus* WP8 and *Erwinia persicinus* RA2 strains, separately, are excellent plant growth promoters, but combined they do not have these effects and they also negatively affect biocontrol activities. By analyzing this antagonistic effect between strains in more detail, it was observed that biofilm formation was harmed in both strains. This formation is an important characteristic to colonize spaces in the rhizosphere; therefore, it has been indirectly associated with biocontrol ability and plant growth promotion (Beyeler, Keel, Michaux, & Haas 1999; Bianco et al., 2006; Duca, Lorv, Patten, Rose, & Glick, 2014). In this research, the *P. fluorescens* strains are biofilm producers (Hernández-León et al., 2015), so a similar antagonistic effect on the co-inoculations in the plant could be assumed. However, this effect was not observed in confrontation experiments, so the tomato plants could be producing a compound (root exudate) that triggers defense activities in the bacteria, as a response to competing for spaces. This is a hypothesis that deserves further laboratory work.

Conclusions

Based on the results obtained, it is concluded that the strains of *B. thuringiensis* and *P. fluorescens* have excellent colonization ability, either individually or in a consortium. Similarly, it was found that only the UM16 + UM96 mixture showed a growth-promoting effect on green tomato seedlings.

Acknowledgements

We thank Mexico's National Science and Technology Council (CONACYT, Project No. 169346) and the Scientific

que las combinaciones UM96 + UM16, UM96 + UM240 y UM96 + 270 no promovieron el desarrollo de las plántulas de tomate verde. El consorcio UM96 + UM256 fue el único que mostró incrementos significativos en la longitud de raíz y del hipocótilo, así como el peso fresco total de las plántulas. Estos resultados exponen que ciertas combinaciones de *Bacillus* y *Pseudomonas* pueden ejercer un efecto represor en la promoción del crecimiento de plantas; mientras que algunas pueden mantener dicho efecto por separado o en consorcio, como la mezcla UM96 + UM256.

Hasta donde se sabe, no existe información sobre algún efecto promotor del crecimiento vegetal directo por parte de *B. thuringiensis*. Por lo tanto, no fue sorpresivo que UM96 no incrementara el crecimiento de las plántulas de tomate. Sin embargo, se sabe que tiene la capacidad de producir quitinasas que pueden restringir el desarrollo de hongos fitopatógenos y tener un efecto benéfico de forma indirecta (Martínez-Absalón et al., 2012 y 2014). Dicha actividad puede complementar aquellos mecanismos por los cuales las cepas de *P. fluorescens* pueden antagonizar hongos como *B. cinerea* (Hernández-León et al., 2015); por lo tanto, se podría hipotetizar que la co-inoculación de la cepa UM96 más una de *Pseudomonas*, en un ambiente rizosférico, podría brindar mejor protección a la planta del ataque de patógenos.

Por otra parte, existen trabajos que proponen el uso de mezclas de bacterias benéficas para mejorar las capacidades promotoras del desarrollo vegetal (Raupach & Kloepper, 1998). Sin embargo, los resultados de este trabajo muestran que no todas las combinaciones *Bacillus-Pseudomonas* pueden funcionar, ya que tres combinaciones (UM96 + UM16, UM96 + UM240, UM96 + UM270) no promovieron el desarrollo de las plántulas; por el contrario, el efecto promotor de las *Pseudomonas* se vio inhibido por la presencia de la cepa UM96. La única combinación que resultó exitosa y que mantuvo un efecto promotor fue UM96 + UM256.

Kang et al. (2014), en plantas de tomate observaron que cepas de *Bacillus pumilus* WP8 y *Erwinia persicinus* RA2, por separado, son excelentes promotoras de crecimiento vegetal, y en mezcla no tienen estos efectos, viéndose también afectadas las actividades de biocontrol. Analizando más a detalle dicho efecto antagónico entre las cepas, se observó que la formación de biofilm se perjudicó en ambas cepas. Esta formación es una característica importante para colonizar espacios en la rizosfera; por lo tanto, se ha asociado indirectamente con la capacidad de biocontrol y promoción del crecimiento vegetal (Beyeler, Keel, Michaux, & Haas 1999; Bianco et al., 2006; Duca, Lorv, Patten, Rose, & Glick, 2014). En esta investigación, las cepas de *P. fluorescens* son productoras de biofilm (Hernández-León et al., 2015), por lo que se podría suponer un

Research Office of the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (2014-2015) for funding this project, and Sofía Martínez for carrying out the first rhizosphere colonization experiments with strain UM96. D.R-S and C.E.H-P. appreciate the Master's degree scholarships awarded by CONACYT, and the anonymous reviewers are thanked for their suggestions.

End of English version

References / Referencias

- Adesemoye, A. O., & Kloepper, J. W. (2009). Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(1), 1-12. doi: 10.1007/s00253-009-2196-0
- Ahmad, F., Ahmad, I., & Khan, M. S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163(2), 173-181. doi: 10.1016/j.micres.2006.04.001
- Beyeler, M., Keel, C., Michaux, P., & Haas, D. (1999). Enhanced production of indole-3-acetic acid by a genetically modified strain of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 affects root growth of cucumber, but does not improve protection of the plant against *Pythium* root rot. *FEMS Microbiology and Ecology*, 28(3), 225-233. doi: 10.1111/j.1574-6941.1999.tb00578.x
- Bianco, C., Imperlini, E., Calogero, R., Senatore, B., Amoresano, A., Carpentieri, A., Pucci, P., & Defez, R. (2006). Indole-3-acetic acid improves *Escherichia coli*'s defences to stress. *Archives of Microbiology*, 185(5), 373-382. doi: 10.1007/s00203-006-0103-y
- Duca, D., Lorv, J., Patten, C. L., Rose, D., & Glick, B. R. (2014). Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106(1), 85-125. doi: 10.1007/s10482-013-0095-y
- Garbeva, P., Silby, M. W., Raaijmakers, J. M., Levy, S. B., & de Boer, W. (2011). Transcriptional and antagonistic responses of *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 to phylogenetically different bacterial competitors. *The ISME journal*, 5(6), 973-985. doi: 10.1038/ismej.2010.196
- Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169(1), 30-39. doi: 10.1016/j.micres.2013.09.009
- Haas, D., & Keel, C. (2003). Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annual Review of Phytopathology*, 41, 117-153. doi: 10.1146/annurev.phyto.41.052002.095656
- Hernández-León, R., Rojas-Solís, D., Contreras-Pérez, M., Orozco-Mosqueda, M. C., Macías-Rodríguez, L. I., Reyes-de la Cruz, H., Valencia-Cantero, E., & Santoyo, G. (2015). Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas*

efecto antagónico similar en las co-inoculaciones en planta. Sin embargo, dicho efecto no se observó en experimentos de confrontación, por lo que las plantas de tomate podrían estar produciendo algún compuesto (exudado radicular) que detone actividades de defensa en las bacterias, como respuesta para competir por espacios. Esta es una hipótesis que merece más trabajo en laboratorio.

Conclusiones

Basados en los resultados obtenidos, se concluye que las cepas de *B. thuringiensis* y *P. fluorescens* tienen excelente capacidad de colonización, ya sea de forma individual o en consorcio. De igual manera, se observó que únicamente la mezcla de UM16 + UM96 mostró un efecto promotor del crecimiento en plántulas de tomate verde.

Agradecimientos

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (Proyecto No. 169346) y a la Coordinación de Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (2014-2015) por financiar este proyecto, y a Sofía Martínez por la realización de los primeros experimentos de colonización rizosférica con la cepa UM96. D.R-S y C.E.H-P. agradecen el apoyo por las becas de Maestría del CONACYT-México; así como a los revisores anónimos por sus sugerencias.

Fin de la versión en español

- fluorescens* strains. *Biological Control*, 81, 83-92. doi: 10.1016/j.biocontrol.2014.11.011
- Hernández-Salmerón, J. E., Prieto-Barajas, C. M., Valencia-Cantero, E., Moreno-Hagelsieb, G., & Santoyo, G. (2014). Isolation and characterization of the genetic variability in bacteria with β -hemolytic and antifungal activity from the rhizosphere of *Medicago truncatula* plants. *Genetics and Molecular Research*, 13(3), 4967-4975. doi: 10.4238/2014.July.4.11
- Hernández-Salmerón, J., Hernández-León, R., Orozco-Mosqueda, M. C., Moreno-Hagelsieb, G., Valencia-Cantero, E., & Santoyo, G. (2016). Draft Genome Sequence of the Biocontrol and Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* UM270. *Standards in Genomic Sciences*, 11(5). doi: 10.1186/s40793-015-0123-9.
- Kang, Y., Shen, M., Yang, X., Cheng, D., & Zhao, Q. (2014). A plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) mixture does not display synergistic effects, likely by biofilm but not growth inhibition. *Microbiology*, 83(5), 666-673. doi: 10.1134/S0026261714050166
- Keel, C., Schnider, U., Maurhofer, M., Voisard, C., Laville, J., Burger, U., Wirthner, P., Haas, D., & Defago, G.

- (1992). Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHAO: importance of bacterial secondary metabolite, 2,4-diacetylphoroglucinol. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 5(1), 4-13. Recuperado de http://www.apsnet.org/publications/mpmi/backissues/Documents/1992Articles/Microbe05_004.pdf
- Long, H. H., Schmidt, D. D., & Baldwin, I. T. (2008). Native bacterial endophytes promote host growth in a species-specific manner; phytohormone manipulations do not result in common growth responses. *PLoS One*, 3(7), e2702. doi: 10.1371/journal.pone.0002702
- Martínez-Absalón, S., Rojas-Solís, D., Hernández-León, R., Prieto-Barajas, C., Orozco-Mosqueda, M. C., Peña-Cabriales, J. J., Sakuda, S., Valencia-Cantero, E., & Santoyo, G. (2014). Potential use and mode of action of the new strain *Bacillus thuringiensis* UM96 for the biological control of the gray mold phytopathogen *Botrytis cinerea*. *Biocontrol Science and Technology*, 24(12), 1349-1362. doi: 10.1080/09583157.2014.940846
- Martínez-Absalón, S. C., Orozco-Mosqueda, M. C., Martínez-Pacheco, M. M., Farías-Rodríguez, R., Govindappa, M., & Santoyo, G. (2012). Isolation and molecular characterization of a novel strain of *Bacillus* with antifungal activity from the sorghum rhizosphere. *Genetics and Molecular Research*, 11(3), 2665-2673. doi: 10.4238/2012.July.10.15
- Nambeesan, S., AbuQamar, S., Laluk, K., Mattoo, A. K., Mickelbart, M. V., Ferruzzi, M. G., Mengiste, T., & Handa, A. K. (2012). Polyamines attenuate ethylene-mediated defense responses to abrogate resistance to *Botrytis cinerea* in tomato. *Plant Physiology*, 158(2), 1034-1045. doi: dx.doi.org/10.1104/pp.111.
- Noh-Medina, J., Yam-Chimal, C., Borges-Gómez, L., Zúñiga-Aguilar, J. J., & Godoy-Hernández, G. (2014). Aislados bacterianos con potencial biofertilizante para plántulas de tomate. *Terra Latinoamericana*, 32(4), 273-281. Recuperado de <http://132.248.10.25/terra/index.php/terra/article/view/33/29>
- Raaijmakers, J. M., Vlami, M., & de Souza, J. T. (2002). Antibiotic Production by Bacterial Biocontrol Agents. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81, 537-547. doi: 10.1023/A:1020501420831
- Raupach, G. S., & Kloepper, J. W. (1998). Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology*, 88(11), 1158-1164. doi: 10.1094/PHYTO.1998.88.11.1158
- Sambrook, J., & Russel, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd Ed. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Orozco-Mosqueda, M. C., & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183, 92-99. doi: 10.1016/j.micres.2015.11.008.
- Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, M. C., & Govindappa, M. (2012). Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Science and Technology*, 22(8), 855-872. doi: 10.1080/09583157.2012.694413
- Scher, F. M., Ziegler, J. S., & Kloepper, J. W. (1984). A method for assessing the root-colonizing capacity of bacteria on maize. *Canadian Journal of Microbiology*, 30(2), 151-157. Recuperado de <http://www.nrcresearchpress.com/doi/pdf/10.1139/m84-024>
- Velázquez-Sepúlveda, I., Orozco-Mosqueda, M. C., Prieto-Barajas, C. M., & Santoyo, G. (2012). Bacterial diversity associated with the rhizosphere of wheat plants (*Triticum aestivum*): Toward a metagenomic analysis. *Phyton, International Journal of Experimental Botany*, 81, 81-87. Recuperado de <http://www.scielo.org.ar/pdf/phyton/v81n1/v81n1a12.pdf>