

Symbiotic bacteria associated to *Prosthechea citrina*, a Mexican endemic orchid

Bacterias simbióticas asociadas a *Prosthechea citrina*, una orquídea endémica de México

Tomasita Santiago-Gerónimo, Departamento de Parasitología Agrícola¹, Departamento de Fitotecnia², Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Estado de México, CP. 56230; Héctor Lozoya-Saldaña^{2*}, María Lourdes Rodríguez-Mejía¹. *Autor para correspondencia: picti87@gmail.com.

Recibido: 02 de Abril, 2020.

Aceptado: 26 de Julio, 2020.

Santiago-Gerónimo T, Lozoya-Saldaña H and Rodríguez-Mejía ML. 2020. Symbiotic bacteria associated to *Prosthechea citrina*, a Mexican endemic orchid. Mexican Journal of Phytopathology 38(3): 398-407.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2004-2

Primera publicación DOI: 03 de Agosto, 2020.

First DOI publication: August 03, 2020.

Resumen. En el proceso de cultivo *in vitro* de tejidos de plantas, se presentan microorganismos potencialmente fitopatógenos y/o aparentemente contaminantes, que eventualmente ocasionan pérdidas de material vegetal. La presente investigación tuvo como objetivo identificar a bacterias endófitas asociadas a *Prosthechea citrina*, una orquídea endémica de México, mediante el aislamiento, cultivo *in vitro* y secuenciación del gen 16S del ARN ribosomal de las cepas bacterianas. Se identificaron a *Aeromonas hydrophila* y *Enterobacter* sp. como simbioses, no patógenos, del bulbo y de base de hoja y a *A. hydrophila* en la parte media y el ápice foliar. Se evaluaron cuatro antibióticos para su

Abstract. Along the process of *in vitro* plant tissue culture, potential plant pathogenic and/or apparent contaminant microorganisms occur, which eventually cause loss of plant material. The objective of this research was to identify endophytic bacteria in *Prosthechea citrina*, an endemic Mexican orchid, by isolating, *in vitro* culturing, and sequencing the 16S gen from ribosomal RNA of the bacterial isolates. *Aeromonas hydrophila* and *Enterobacter* sp. were identified as symbionts, non-pathogenic, from the bulb and the lower part of the leaf, and *A. hydrophila* in the middle and top of the leaf. Four antibiotics were evaluated for their *in vitro* control using the disc-plate method, quantifying the colony diameter growth. The highest statistically significant inhibition halos were obtained with Oxytetracycline for *A. hydrophila*, and with ampicillin for *Enterobacter* sp. The presence of endophytic bacteria is demonstrated, with tissue specificity location, as well as the corresponding inhibitory antibiotic.

Key words: Symbioses, endophytic bacteria, antibiotics.

control *in vitro* mediante el método de disco-placa, cuantificando el diámetro de crecimiento de la colonia. El mayor halo de inhibición, con significancia estadística, se obtuvo con oxitetraciclina para *A. hydrophila* y con ampicilina para *Enterobacter* sp. Se demuestra la presencia de bacterias endófitas, con especificidad de ubicación en el tejido, así como el antibiótico correspondiente que las inhibe.

Palabras clave: Simbiosis, bacterias endófitas, antibióticos.

La familia Orchidaceae constituye uno de los grupos de plantas más diversos. En su aprovechamiento sobresale el uso ornamental, aromatizante, medicinal, artesanal y comestible. En el proceso de cultivo *in vitro* se presentan microorganismos endófitos, contaminantes del medio de cultivo. Estos se encuentran comúnmente de forma natural en el interior de las plantas, induciendo efectos diversos, como estimulación en la germinación de las semillas y/o en el crecimiento de la planta (Tsavkelova, 2011; Wilkinson *et al.*, 1989) pero pueden ser devastadores cuando los tejidos vegetales se cultivan *in vitro*. La búsqueda de nuevas alternativas para la prevención y/o erradicación de los contaminantes resulta una labor importante (Cruz *et al.*, 2006).

Los explantes de tejido vegetal pueden llevar contaminantes en su superficie y/o en su interior. Aquellos que los llevan sobre su superficie se pueden eliminar mediante la desinfección, pero los que se encuentran dentro del tejido son difíciles de erradicar, lo que impide cumplir con uno de los requisitos básicos para el éxito de la micropropagación de cualquier especie vegetal, que es mantener los cultivos libres de microorganismos contaminantes (Ramírez-Villalobos *et al.*, 2000). No obstante, los microorganismos pudieran jugar un papel importante como antagonistas de agentes

The Orchidaceae family is one of the most diverse plant groups. Some of its most outstanding uses are ornamental, aromatic, medicinal, for craftwork and edible. In the *in vitro* planting process, there are endophytic microorganisms, which contaminate the culture medium. They are commonly found naturally inside the plants, inducing diverse effects, such as the stimulation of seed germination and/or in plant growth (Tsavkelova, 2011; Wilkinson *et al.*, 1989), yet they can be devastating when the plant tissues are planted *in vitro*. The search for new alternatives to prevent and/or eradicate the contaminants is an important task (Cruz *et al.*, 2006).

The plant tissue explants may carry contaminants in their surface and/or insides. Those which are carried on the surface can be eliminated by disinfection, but those found inside the plant are difficult to eradicate, which makes it difficult to meet the basic requirements for the success of micropropagation of any plant species, which is to keep crops free of contaminant microorganisms (Ramírez-Villalobos *et al.*, 2000). However, the microorganisms may play an important role as antagonists of pathogenic agents in plants (Ocegeda-Reyes *et al.*, 2020), although the results of *in vitro* trials may not necessarily reflect what takes place *in vivo* (Whitaker and Bakker, 2019).

The presence of microorganisms during the *in vitro* planting of plant tissues takes place, mostly, when the donating plant grows directly on the field and is exposed to pests, diseases, dust and other agents (Ramírez-Villalobos and Salazar 1997). This phenomenon is also caused by the anatomical characteristics of each species, such as the presence of trichomes on leaves and stems, which stop disinfectants from penetrating. The elimination of these microorganisms may be due to the use of inadequate aseptic techniques in the laboratory (Alvarado, 1998).

fitopatógenos (Ocegeda-Reyes *et al.*, 2020), aunque no necesariamente los resultados de los ensayos *in vitro* reflejan lo que sucede *in vivo* (Whitaker and Bakker, 2019).

La presencia de microorganismos durante el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales ocurre sobre todo cuando la planta donante crece directamente en el campo y está expuesta a plagas, enfermedades, polvo y otros agentes (Ramírez-Villalobos y Salazar 1997). También este fenómeno ocurre debido a las características anatómicas propias de la especie, tales como la presencia de tricomas en las hojas y tallos, que impiden la penetración de los desinfectantes. La eliminación de estos microorganismos puede deberse al empleo de técnicas inadecuadas de asepsia en el laboratorio (Alvarado, 1998).

Las bacterias endófitas son a menudo difíciles de detectar porque permanecen dentro del tejido del hospedante, y por no ser fitopatógenas pueden permanecer inadvertidas, con reducidas tasas de multiplicación y enraizamiento de las plantas, pudiendo inclusive morir. La presencia de microorganismos en el medio de cultivo se debe también a la deficiente desinfección o esterilización, que puede mejorarse con la manipulación apropiada de los equipos (Red y Tanprasert, 1995). Con base en lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivos identificar bacterias endófitas presentes en *Prosthechea citrina* y evaluar antibióticos para su eliminación.

Se colectaron plantas jóvenes de *Prosthechea citrina*, antes de floración, en dos localidades de un bosque de pino-encino con coordenadas 17° 20' 012" N, 96° 30' 654" O y 17° 19' 890" N, 96° 30' 774" O, para los sitios 1 y 2, respectivamente, a 2104 m, en Ixtlán de Juárez, sierra norte de Oaxaca. La desinfección se inició con un enjuague con agua destilada. A los bulbos se les retiraron las brácteas membranosas, y bajo condiciones asépticas, se

Endophytic bacteria are usually difficult to detect, since they remain inside the tissue of the host, and because they are not phytopathogenic, they may go unnoticed, with low rates of multiplication and rooting of plants, and may even lead to their deaths. The presence of microorganisms in the culture medium is also due to the inefficient disinfection or sterilization, which can be improved with the adequate handling of equipment (Red and Tanprasert, 1995). Based on the above, this investigation had the aims of identifying endophytic bacteria present in *Prosthechea citrina*, as well as to evaluate antibiotics for their elimination.

Young *Prosthechea citrina* plants were gathered before flowering in two locations of a pine-oak forest, with the coordinates 17° 20' 012" N, 96° 30' 654" W and 17° 19' 890" N, 96° 30' 774" W, for sites 1 and 2, respectively, at 2104 masl, in Ixtlán de Juárez, in the Norther Sierra of Oaxaca. The disinfection began by rinsing with distilled water. The membranous bracts were removed from the bulbs, which were then rinsed, under aseptic conditions, with 70% alcohol for one minute, followed by three rinses with sterile distilled water. They were finally submerged in a 1.5% sodium hypochlorite solution for 30 min and rinsed again, three times, with sterile distilled water.

After the disinfection, each plant was dissected into pseudobulb, base, midsection and leaf apices, in order to identify possible specific plant organs in which microorganisms could be located. To carry out the isolation, an inoculation loop was rubbed on the internal plat tissue, and planted, using cross-streaking, on plates with an LB medium (Luria Bertani: casein peptone 10 g L⁻¹, yeast extract 5 g L⁻¹, NaCl 10 g L⁻¹ and bacteriological agar 15 g L⁻¹) (Bertani, 1951), and incubated at 37 °C for 48 h. After this period, the remaining bacterial cultures were purified.

realizó un enjuague con alcohol al 70% durante un minuto, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril. Finalmente se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 1.5% durante 30 min y se volvieron a enjuagar tres veces con agua destilada estéril.

Después de la desinfestación, se diseccionó a cada planta en pseudobulbo, base, parte media y ápice de las hojas, a fin de identificar posible especificidad de órgano de la planta en donde se pudieran encontrar los microorganismos. Para su aislamiento se frotó un asa bacteriológica en el tejido vegetal interno y se sembró, por estría cruzada, sobre placas con medio LB, Luria Bertani: (peptona de caseína 10 g L⁻¹, extracto de levadura 5 g L⁻¹, NaCl 10 g L⁻¹ y agar bacteriológico 15 g L⁻¹) (Bertani, 1951) y se incubaron a 37 °C durante 48 h. Después de este período se procedió a la purificación de las colonias bacterianas resultantes.

Para la identificación no molecular se realizaron pruebas bioquímicas con base en la guía de Schaad *et al.* (2001). Con la finalidad de separar a las bacterias Gram positivas y Gram negativas se realizó la prueba Ryu (Schaad *et al.*, 2001). En un portaobjetos se colocó una gota de hidróxido de potasio al 3% y se mezcló con una colonia bacteriana, si la mezcla formaba hilo correspondían a bacterias Gram negativas, y si la mezcla no formaba hilo eran Gram positivas. Respecto a la morfología celular, se colocó en un portaobjetos una gota de agua destilada estéril y se mezcló con una pequeña cantidad de bacterias, se fijó la bacteria flameando el portaobjetos y una vez evaporada el agua se le añadió una gota de cristal violeta al 0.1 N y se observó al microscopio óptico a diferentes ampliaciones. Para determinar movilidad, después de mezclar una muestra de bacterias en una gota de agua, se colocó cuidadosamente el cubreobjetos, para ser observados al microscopio óptico. Para determinar la producción de endosporas, en un tubo

For the non-molecular identification, biochemical tests were carried out following the guidelines by Schaad *et al.* (2001). In order to separate the Gram positive and negative bacteria, we performed the Ryu test (Schaad *et al.*, 2001). A drop of 3% potassium hydroxide was placed on a microscope slide and mixed with a bacterial culture. If the mixture formed a thread, there were Gram-negative bacteria, and if the mixture formed no threads, they were Gram-positive. Regarding cell morphology, a drop of sterile distilled water was placed on a microscope slide and mixed with small amounts of bacteria, the bacteria were fixed by burning the slide, and after the water evaporated, a drop of methyl violet at 0.1 N was added and observed under an optical microscope at different magnifications. To determine mobility, after mixing a bacteria sample in a drop of water, a slide was carefully placed on top and observed under an optical microscope. To determine the production of endospores, a bacterial culture was suspended in a test tube with sterile distilled water and placed in a water bath for 30 min. Next an aliquot of the suspension was taken and planted in a Petri dish with LB medium, in order to detect if the bacteria formed endospores. To determine if the bacteria had a strict or facultative aerobic metabolism, the Hugh and Leifson medium (1953) was used. The bacterium was inoculated by puncturing and incubated under conditions of aerobiosis (without sterile mineral oil) and anaerobiosis (with sterile mineral oil). For the oxidase test, the bacteria were exposed to the reagent N,n,n,n-tetramethyl-p-phenyldiamine (or TMFD) or N,N-Dimethyl-p-phenyldiamine (or DMFD), which change color indicating that the bacteria is aerobic, or transparent if it is anaerobic. A catalase test was also performed, mixing a bacterial suspension with hydrogen peroxide to observe whether the catalase would break it. If so, oxygen bubbles would form, indicating that the bacterium is aerobic.

de ensayo con agua destilada estéril se suspendió una colonia bacteriana y se puso en baño maría durante 30 min. Posteriormente, se tomó una alícuota de la suspensión y fue sembrada en una caja de Petri con medio LB, con la finalidad de detectar si la bacteria formaba endosporas. Para determinar si las bacterias tenían un metabolismo aeróbico estricto o aeróbico facultativo se utilizó el medio de Hugh y Leifson (1953). La bacteria se inoculó por picadura con un asa de siembra, y se incubó en condiciones de aerobiosis (sin aceite mineral estéril) y de anaerobiosis (con aceite mineral estéril). Para la prueba de oxidasa, se expuso a las bacterias al reactivo N,n,n,n-tetrametil-p-fenilendiamina (o TMFD) o N,N-Dimetil-p-fenilendiamina (o DMFD), cuya coloración cambia, lo que indica que la bacteria es aeróbica, o transparente si es anaeróbica. También se hizo la prueba de la catalasa, mezclando una suspensión de bacterias con peróxido de hidrógeno para ver si la catalasa lo rompía. De ser así, se forman burbujas de oxígeno, lo que indica que la bacteria es aeróbica.

La identificación molecular se inició con la secuenciación del ADN ribosomal 16 S, que se obtuvo siguiendo lo reportado por Chye *et al.* (2013). La extracción del ADN bacteriano se llevó a cabo de acuerdo a las indicaciones del juego de extracción mini ADN easy plants, de Qiagen®, Hilden, Alemania, La cuantificación del ADN se realizó partiendo del supuesto que una unidad de absorbancia a 260 nm es igual a 50 ng μL^{-1} de ADN de doble cadena (Rickwood y Hames, 1990). La calidad del ADN fue inferida mediante el cálculo de la relación espectrofotométrica A260/A280 (Genesys 10 UV Scanning, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts). El programa de PCR fue: predesnaturalización a 94 °C por 1 min, desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineación de 40 ciclos de 10 s a 95 °C, 30 s a 55 °C, y 30 s a 72 °C y el periodo de terminación 72 °C por 10 min (Matson *et al.*, 2015). Los

Molecular identification began with the sequencing of 16 S ribosomal DNA, which was obtained following Chye *et al.* (2013). The extraction of bacterial DNA was carried out by following the instructions by the manufacturer of the DNA easy Plant Mini Kit, Qiagen®, Hilden, Germany. The DNA quantification was carried out assuming that one absorbance unit at 260 nm is equal to 50 ng μL^{-1} of double-chain DNA (Rickwood and Hames, 1990). The quality of the DNA was inferred by calculating the spectrophotometric ratio A260/A280 (Genesys 10 UV Scanning, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts). The PCR program consisted of predenaturalization at 94 °C for 1 min, denaturalization at 94 °C for 30 s, aligning of forty 10 sec cycles at 95 °C, 30 s at 55 °C, and 30 s at 72 °C and the termination period at 72 °C for 10 min (Matson *et al.*, 2015). The PCR products were sequenced in the MacroGen® laboratory (10F, 254 Beotkkot-ro, Geumcheon-gu, Seoul 08511, South Korea). The sequences obtained from the region of gene 16S of the ribosomal RNA in this study were compared with sequences of reference organisms, using the BLAST database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI, U.S.A.). The complementary of each sequence was obtained with the program CHROMAS. Later, using the program DNASTAR, the consensus sequence was obtained, and the sequences were finally run in the algorithm BLASTN of the NCBI, to determine the degree of homology they held in comparison with the sequences deposited in the database published in the GenBank.

In order to identify what can control the isolated bacteria strains, four antibiotics were evaluated using the disk-plate method: rifampicin (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$), oxytetracycline (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$), ampicillin (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and tetracyclin (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The diameters of the bacterial inhibition halos were measured after a growth period of 24 and 48 h. These data

productos de PCR se secuenciaron en el laboratorio MacroGen® (10F, 254 Beotkkot-ro, Geumcheon-gu, Seopul 08511 República de Corea del Sur). Las secuencias obtenidas de la región del gen 16S del ARN ribosomal en este estudio se compararon con secuencias de organismos de referencia, a través de la base de datos BLAST del National Center for Biotechnology Information (NCBI, Estados Unidos). A las secuencias resultantes se les obtuvo la complementaria con el programa CHROMAS. Posteriormente, con el programa DNASTAR se obtuvo la secuencia consenso y finalmente las secuencias fueron corridas en el algoritmo BLASTN del NCBI, para determinar el grado de homología que guardaban con respecto a las secuencias depositadas en la base de datos publicada en el GenBank.

Con el fin de identificar algún antibiótico que pudiera controlar las cepas bacterianas aisladas, se evaluaron cuatro antibióticos: rifampicina ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$), oxitetraciclina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), ampicilina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) y tetraciclina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), por el método de disco-placa. Se cuantificó el diámetro de los halos de inhibición bacteriana a las 24 y 48 h de crecimiento. Estos datos fueron tratados mediante un análisis de varianza de medias en un diseño completamente al azar de los cuatro tratamientos con igual número de repeticiones, considerándose como unidad experimental a un disco-placa (ANAVA, SAS). Los testigos, sin antibiótico, no se consideraron para el análisis estadístico porque fungieron únicamente como marcos de referencia de los crecimientos, al no presentar halos de inhibición en ninguno de los dos períodos de incubación.

Se obtuvieron aislamientos de diferentes partes de la planta con el fin de identificar posibles especificidades de tejido de colonización. Se encontraron siete tipos coloniales de bacterias, que se identificaron preliminarmente con letras (Cuadro 1), que fueron sometidas a las pruebas bioquímicas y a la secuenciación del gen ARNr 16S (Cuadro 2). Las

were treated using an analysis of variance, in a totally random design, of the four treatments with equal number of repetitions, considering one disk-plate as an experimental unit (ANAVA, SAS). The controls, without antibiotics, were not considered for the statistical analysis, since they served only as a reference of the growths, since they presented no inhibition halos in any of the incubation periods.

Isolations were obtained from different parts of the plant in order to identify possible tissue colonization specificities. Seven types of colonial bacteria were found, which were preliminarily identified using letters (Table 1) and underwent biochemical tests and sequencing for gene ARNr 16S (Table 2). The biochemical tests showed no differences between the isolations included in the tables; they were all Gram negative, bacilli with movement, with no production of endospores and positive for fermentation, oxidation and catalase tests (data not included), therefore they all seem to belong to one same species. However, the colonies of isolations A, B, C, D and E presented a yellowish-brown color, they were convex, bright and with a smooth surface and a foul smell, unlike the other two isolations (F and G), which helped identify the first as *Aeromonas hydrophila*. The colonies of isolations F and G displayed a beige color, they were convex, opaque in color and with an odorless, wavy edge, which was identified as belonging to the genus *Enterobacter* (Hugh and Leifson, 1953; Ramos *et al.*, 2007; Schaad *et al.*, 2001). This is backed with the comparison of the homology of sequences of rRNA 16S with the GenBank database, since it indicated that isolations A, B, C, D and E corresponded to the species of *Aeromonas hydrophila* and colonies F and G, to *Enterobacter* sp (Table 2). After molecular identification was confirmed, the colonization tissue specificity was observed, since both genera and most of the isolations were obtained from the bulb and the base

Cuadro 1. Especies bacterianas obtenidas en distintas partes de cada planta.
Table 1. Bacterial species obtained in different parts of each plant.

	Sitio 1 ^y		Sitio 2 ^y	
	Planta 1	Planta 2	Planta 1	Planta 2
Bulbo	A ^z , B, C, F, G	B, D, F, G	A, C, D, G	B, C, F, G
Base de la hoja	C, D, F, G	A, B, G	A, C, E, G	A, D, E, F
Parte media de la hoja	B, E,	A, E,	A, B	A
Ápice de la hoja	A, E,	C, D	B, C, D	A, E

(^y) Ver coordenadas en Materiales y Métodos. / See coordinates in Materials and Methods.

(^z) n=5 cajas Petri conservadas por aislamiento. A a E, *Aeromonas hydrophila*; F y G, *Enterobacter* sp. / n=5 Petri dishes conserved per isolation. A to E, *Aeromonas hydrophila*; F and G, *Enterobacter* sp.

Cuadro 2. Homologías de las secuencias de los aislamientos comparadas con la base de datos del GenBank.

Table 2. Homologies of the sequences of the isolates compared to the GenBank data base.

Aislamiento	Identidad Gen Bank	Número de acceso	Tamaño del fragmento pb (%)	% de identidad
A	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	NR_074841.1	99	100
B	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	NR_074841.1	99	99
C	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	NR_074841.1	99	100
D	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	NR_074841.1	99	99
E	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	NR_074841.1	99	100
F	<i>Enterobacter</i> sp. B15	KF010362.1	100	99
G	<i>Enterobacter</i> sp. B15	KF010362.1	100	99

pruebas bioquímicas no arrojaron diferencias entre los aislamientos incluidos en los cuadros; todas fueron Gram negativas, bacilos con movimiento, sin producción de endosporas y positivos para las pruebas de fermentación, oxidación y catalasa (datos no incluidos) por lo que aparentemente todos corresponderían a una misma especie. No obstante, las colonias de los aislamientos A, B, C, D y E, presentaron una coloración café amarillenta, convexas, brillantes y superficie lisa, con un olor fétido, diferente a los otros dos aislamientos (F y G),

of the leaf, whereas *Enterobacter* was not isolated from the middle and apical parts of the plants (Table 1). The identification was adjusted with the shapes of the colonies. That is to say that the growths of cultures A, B, C, D and E are similar to each other, belonging to *A. hydrophila*, yet different to F and G, which are also similar to each other and belong to *Enterobacter*.

Regarding the action of the antibiotics, oxytetracycline induced the highest inhibition mean in *A. hydrophila*, statistically different to the other

lo que condujo a identificar a las primeras como *Aeromonas hydrophila*. Las colonias de los aislamientos F y G mostraron una coloración beige, convexa, opaca y borde ondulado sin olor, que se identificó como del género *Enterobacter* (Hugh y Leifson, 1953; Ramos *et al.*, 2007; Schaad *et al.*, 2001). Lo anterior se respalda con la comparación de la homología de secuencias de ARNr 16S con la base de datos del GenBank, pues indicó que los aislamientos A, B, C, D y E correspondieron a la especie de *Aeromonas hydrophila* y las colonias F y G a *Enterobacter* sp (Cuadro 2). Una vez confirmada la identificación molecular, se observó la especificidad de tejido de colonización, pues los dos géneros y la mayoría de los aislamientos se obtuvieron del bulbo y de la base de la hoja, mientras que *Enterobacter* no se aisló de las partes medias y apicales de las plantas (Cuadro 1). La identificación se ajusta con las formas de las colonias. Esto es, que los crecimientos de los cultivos A, B, C, D y E son similares entre sí, correspondiendo a *A. hydrophila*, pero diferentes a F y G, que también son similares entre ellos y que corresponden a *Enterobacter*.

Respecto a la acción de los antibióticos, la oxitetraciclina indujo la media más alta de inhibición en *A. hydrophila*, estadísticamente diferente a los demás tratamientos, seguido de tetraciclina, tanto a las 24 como a las 48 h de exposición. La rifampicina y la ampicilina ejercieron inhibición limitada al crecimiento de *A. hydrophila*. En general, resalta que para los cuatro antibióticos se observó una reducción en los halos de inhibición de las 24 a las 48 h. Esto es, las colonias continuaron su crecimiento a pesar de la presencia de los antibióticos. Para *Enterobacter* sp., las medias más altas de inhibición se obtuvieron con la ampicilina, significativamente diferente a los demás, seguido de la tetraciclina, oxitetraciclina y en último lugar a la rifampicina. De igual manera que con *A. hydrophila*, los halos de inhibición redujeron de diámetro de las 24 a las 48 h (Cuadro 3).

treatments, followed by tetracycline, at both 24 and 48 h of exposure. Rifampin and ampicillin exerted a limited inhibition on the growth of *A. hydrophila*. In general, it is worth highlighting that a reduction was observed in the halos for all four antibiotics between 24 and 48 h. That is, the cultures continued growing despite the presence of the antibiotics. For *Enterobacter* sp., the highest means for inhibition were obtained with ampicillin, significantly different to the others, followed by tetracycline, oxytetracycline, and finally, rifampin. As with *A. hydrophila*, the inhibition halos decreased in diameter between 24 and 48 h (Table 3).

Reports on *Aeromonas hydrophila* as endophytic plant bacteria (Aytac and Gorris, 1994; Chye *et al.*, 2013; Ginestrea *et al.*, 2005; Pérez-Cordero *et al.*, 2014) are limited. In this investigation *A. hydrophila* is reported for the first time as associated to wild orchid *Prosthechea citrina*, without being pathogenic, since it was isolated from firm tissue, without lesions or decomposition. This association has been explained as a relationship in which *A. hydrophila* is able to solubilize phosphates (Muleta *et al.*, 2013) and/or exert biological control against phytopathogens (Gohel *et al.*, 2006). The genus *Enterobacter* has already been reported as associated to orchids and, as in this study, with tissue specificity (Fernández *et al.*, 2011; Ramos *et al.*, 2007). We conclude that two species of endophytic bacteria were found, with tissue specificity and which can be controlled with the use of antibiotics.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

Son limitados los reportes de *Aeromonas hydrophila* como bacterias endófitas de las plantas (Aytac y Gorris, 1994; Chye *et al.*, 2013; Ginestrea *et al.*, 2005; Pérez-Cordero *et al.*, 2014). En la

**Cuadro 3. Comparación de medias del diámetro de los halos de inhibición (mm) del crecimiento de las bacterias expuestas a diferentes antibióticos y tiempos de exposición.**  
**Table 3. Comparison of means of the diameter of the inhibition halos (mm) of the growth of bacteria exposed to different antibiotics and exposure times.**

| Bacterias                   | Antibiótico     | 24 horas |                     | 48 horas |                     |
|-----------------------------|-----------------|----------|---------------------|----------|---------------------|
|                             |                 | Media    | <sup>a</sup> Grupos | Media    | <sup>a</sup> Grupos |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | Rifampicina     | 3.9908   | b                   | 0.7958   | c                   |
|                             | Oxitetraciclina | 8.1958   | a                   | 3.6175   | a                   |
|                             | Ampicilina      | 2.0967   | c                   | 0.9092   | c                   |
|                             | Tetraciclina    | 4.0633   | b                   | 2.9058   | b                   |
| <i>Enterobacter</i> sp.     | Rifampicina     | 0.0      | d                   | 0.0      | c                   |
|                             | Oxitetraciclina | 1.2842   | c                   | 0.8600   | b c                 |
|                             | Ampicilina      | 4.4633   | a                   | 3.0142   | a                   |
|                             | Tetraciclina    | 3.2558   | b                   | 1.2725   | b                   |

<sup>a</sup>Cifras con la misma letra son estadísticamente iguales ( $p \leq 0.05$ ). / Figures with the same letter are statistically equal ( $p \leq 0.05$ ).

presente investigación se reporta por primera vez a *A. hydrophila* asociada a la orquídea silvestre *Prosthechea citrina*, sin ser patógena, pues se aisló de tejido firme, sin lesiones ni descomposición. Esta asociación se ha explicado como una relación en donde *A. hydrophila* tiene la capacidad de solubilizar fosfatos (Muleta *et al.*, 2013) y/o ejercer control biológico contra fitopatógenos (Gohel *et al.*, 2006). El género *Enterobacter* ya ha sido reportado como asociado a las orquídeas y al igual que en este estudio, con especificidad de tejidos (Fernández *et al.*, 2011; Ramos *et al.*, 2007). Se concluye que se encontraron dos especies de bacterias endófitas con especificidad de tejidos y que se pueden controlar con antibióticos.

## LITERATURA CITADA

- Alvarado Y. 1998. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. En: Pérez Ponce JN. (Ed), Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. pp 81-84.
- Aytac SA and Gorris LG. 1994. Survival of *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* on fresh vegetables stored under moderate vacuum. World Journal of Microbiology and Biotechnology 10: 670-672. <https://doi.org/10.1007/bf00327956>
- Bertani G. 1951. Studies on lysogenesis I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 62(3): 293-300. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC386127/?page=1>
- Chye Y, Yin Y, Rohani R, Weber JF and Bhole S. 2013. Diversity of endophytic bacteria in Malaysian plants as revealed by 16S rRNA encoding gene sequence-based method of bacterial identification. Journal Young Pharmacology 5(3):95-97. <https://doi.org/10.1016/j.jyp.2013.07.001>
- Cruz M, Acosta M, Leiva M, Alvarado Y y Lazcano M. 2006. Evaluación del efecto carbendazim-β-ciclodextrina para el control de hongos filamentosos contaminantes del cultivo *in vitro* de plantas. Biotecnología vegetal 2(2):73-76. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/137/566>
- Fernández GRJ, Pedrinho EAN, Castellane TCL and Lemos EGM. 2011. Auxin-producing bacteria isolated from the roots of *Cattleya walkeriana*, an endangered Brazilian orchid, and their role in acclimatization. Revista Brasileira de Ciências do Solo 35(3): 729-737 <https://doi.org/10.1590/s0100-06832011000300008>
- Ginestrea M, Rincón G, Romero S, Harris B, Castellano M y Colina G. 2005. Especies de *Aeromonas* en vegetales frescos que se expenden en un Mercado popular de Maracaibo. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 25: 96-99.
- Gohel V, Singh A, Vimal M, Ashwini D and Chhatpar, HS. 2006. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. African Journal of Biotechnology 5: 54-72.
- Hugh R and Leifson E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram- bacteria. Journal of Bacteriology 66:24-26. <https://doi.org/10.1128/jb.66.1.24-26.1953>

- Muleta D, Aseffa F, Borjesson E and Granhall U. 2013. Phosphate-solubilising rhizobacteria associated with *Coffea arabica* L. in natural coffee forest of southwestern Ethiopia. Journal the Saudi Society of Agricultural Sciences 12(1): 73-84. <https://doi.org/10.1016/j.jsas.2012.07.002>
- Ocegueda-Reyes MD, Casas-Solís J, Virgen-Calleros G, González-Eguiarte DR and López-Alcocer E. 2020. Isolation, identification and characterization of antagonistic rhizobacteria to *Sclerotium cepivorum*. Mexican Journal of Phytopathology 38(1): 146-159. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1911-2>
- Pérez-Cordero A, Tuberquia-Sierra A y Amell-Jiménez D. 2014. Actividad *in vitro* de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos. Agronomía Mesoamericana 25(2): 213-223. <https://doi.org/10.15517/am.v25i2.15425>
- Ramírez-Villalobos M, Santos A y Risea R. 2000. Hongos contaminantes en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Psidium guajava*. Revista de la Facultad de Agronomía 17(3): 217-225. <https://produccioncientificaluz.org/index.php/agronomia/article/view/26353>
- Ramírez-Villalobos M y Salazar E. 1997. Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava* L.). Revista de la Facultad de Agronomía. 14:497-506.
- Ramos ZE, Salgado TJ y Hernández AT. 2007. Estudio de bacterias asociadas a orquídeas (Orchidaceae). Lankesteriana 7(1-2): 322-325. <https://doi.org/10.15517/lank.v7i1-2.19556>
- Reed BM and Tanprasert P. 1995. Detection and control of bacterial contaminants of plant tissue cultures. Plant Tissue Culture and Biotechnology 1(3): 137-142. [https://www.researchgate.net/publication/222714440\\_Detection\\_and\\_control\\_of\\_bacterial\\_contaminants\\_of\\_plant\\_tissue\\_cultures\\_A\\_review\\_of\\_recent\\_literature](https://www.researchgate.net/publication/222714440_Detection_and_control_of_bacterial_contaminants_of_plant_tissue_cultures_A_review_of_recent_literature)
- Schaad NW, Johnes JB and Chun W. 2001. Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria. APS, St. Paul, Minn., USA. 373 pp.
- Tsavkelova E. 2011. Bacteria Associated with Orchid Roots. En: Maheshwari DK (Ed.). Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses. Springer-Verlag Berlin Heidelberg Pp 221-258. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-20332-9\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-642-20332-9_11)
- Whitaker BK and Bakker MG. 2019. Bacterial endophyte antagonism toward a fungal pathogen *in vitro* does not predict protection in live plant tissue. FEMS Microbiology Ecology 95(2):1-11. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy237>
- Wilkinson KG, Dixson KW and Sivasithamparam K. 1989. Interaction of soil bacteria, mycorrhizal fungi and orchid seed in relation to germination of Australian orchids. New Phytologist 112(3): 429-435 <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1989.tb00334.x>