



## AISLAMIENTO DE BACTERIAS ENDOFITAS DE ARROZ CON ACTIVIDADES PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL

FÉLIX MORONTA-BARRIOS

Centro de Microbiología y Biología Celular. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Caracas, Venezuela. fmoronta@ivic.gov.ve

### RESUMEN

Las bacterias endófitas son ubicuas de todos los tejidos vegetales terrestres y son conocidas por influenciar directa o indirectamente el desarrollo de las plantas. Sin embargo, el repertorio endofítico capaz de promover el crecimiento de las plantas es ampliamente inexplorado, incluso en cultivos de importancia estratégica como el arroz. Es por ello que nos planteamos el objetivo de obtener aislados bacterianos endófitos prometedores para la formulación de biofertilizantes. Para ello se obtuvieron muestras de raíces de dos cultivares venezolanos de arroz, Pionero210FL y SD20A, de cuyas raíces se lograron aislar en total 112 bacterias endófitas. Se determinaron para todos los aislados algunas actividades promotoras del crecimiento vegetal como: producción de ácido indol acético y crecimiento en medios de cultivos sin nitrógeno. Ello permitió seleccionar algunos aislados para proceder con la identificación molecular. Los resultados preliminares arrojan que los aislados autóctonos pertenecen a los géneros: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Chryseobacterium*, *Agrobacterium* y *Bacillus*. Estos aislados resultan atractivos para aplicaciones agrobiotecnológicas como el desarrollo de biofertilizantes, cuyo uso tiene un aumento sostenido del 10 % a nivel mundial. El desarrollo de esta biotecnología basada en bacterias endófitas permitirá avanzar hacia una agricultura más ecológica y sustentable.

**Palabras claves:** Agricultura, Biotecnología, Endofitas, Microbiología.

### 1. INTRODUCCIÓN

La habilidad de las plantas terrestres de colonizar y crecer en un ambiente particular está influenciada por las condiciones de sus alrededores. Además de sus requerimientos de irrigación, también limitan su crecimiento bajos contenidos de nitrógeno y fósforo, alta salinidad, presencia de parásitos nocivos y contaminación del suelo por actividades antrópicas [1]. Las prácticas agrícolas convencionales buscan compensar alguna de estas limitaciones mediante la adición de fertilizantes y el uso de pesticidas para controlar las malezas y los microorganismos patógenos [2]. Sin embargo, estas prácticas no solo son insuficientes para

el mejoramiento sustentable del rendimiento de los cultivos, sino que además incrementan los costos de producción y suelen tener impactos negativos sobre el medio ambiente y la salud [3]. En vista de ello, actualmente se están explorando diferentes aproximaciones para potenciar el crecimiento vegetal sin las desventajas antes mencionadas. Tales estrategias se concentran en incrementar el potencial natural de la adquisición de nutrientes en el suelo agrícola [4], en el fortalecimiento del control biológico de enfermedades y malezas y en la búsqueda de estimuladores biológicos (bioinoculantes) del crecimiento vegetal y de tolerancia al estrés [5].



Los microorganismos que viven en estrecha interacción con las plantas pueden ejercer distintas clases de efectos positivos sobre su crecimiento [6]. Los efectos de la microbiota que coloniza los tejidos de las plantas incluyen un aumento en la disponibilidad de nutrientes (biofertilización), la capacidad de competir, eliminar o disminuir el efecto de potenciales organismos patógenos (biocontrol), la capacidad de estimular químicamente el crecimiento del hospedero y/o su tolerancia al estrés abiótico (fitoestimulación) y también la capacidad de inactivar o degradar sustancias tóxicas existentes en el suelo (biorremediación) [7]. Las bacterias que habitan el suelo que está en contacto íntimo con las raíces, la rizósfera, son capaces de realizar alguna o varias de estas funciones. Estas son habitualmente conocidas como rizobacterias promotoras del crecimiento o PGPR [8]. Dentro de este grupo, merecen especial atención aquellas bacterias capaces de atravesar la superficie de las raíces y colonizar sus tejidos internos (nicho conocido como endorizósfera) para ejercer su efecto beneficioso [9]. Se ha reportado que estas bacterias son capaces de prevalecer en la competencia por los recursos con el resto de la comunidad microbiana rizosférica, superar las defensas de la planta y establecerse como habitantes permanentes de los tejidos internos sin generar efectos adversos para el hospedero [10]. Las bacterias endófitas son capaces de disparar cambios fisiológicos drásticos que modulan el crecimiento y el desarrollo de la planta [14]. Se cree que las bacterias que colonizan los tejidos interiores de las plantas podrían interactuar más de cerca con su huésped vegetal, tendrían menos competencia por los nutrientes y vivirían en un entorno más protegido [11]. Estas

características hacen de los endófitos bacterianos unos candidatos atractivos para el desarrollo de bioinoculantes [12] [13] [14]. Más de la mitad de la población mundial utiliza el arroz como un alimento básico. Para mantener la seguridad alimentaria, el Instituto Internacional de Investigación del Arroz estima que la producción anual de arroz se debe aumentar en hasta 10 millones de toneladas de con menos tierra y menos agua, en sistemas más amigable con el medio ambiente [15] [16]. En este trabajo, se aislaron bacterias endófitas de dos cultivares de Venezuela. Los aislados han sido caracterizados según su capacidad de producir hormonas vegetales, crecer en medios carentes de nitrógeno y de solubilizar fosfatos inorgánicos; principales rasgos bacterianos promotores del crecimiento vegetal.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Muestreo e aislamiento de bacterias. Plantas de dos cultivares de arroz (*Oryza sativa* cv. PioneroFL210 y *Oryza sativa* cv. SD20A) fueron colectadas en Acarigua, Estado Portuguesa, Venezuela. La superficie de las raíces fue esterilizada con etanol 70% por 1 minuto y agitadas en una solución de hipoclorito de sodio 1.2% durante 15 minutos. Las muestras luego fueron lavadas tres veces con agua destilada estéril. Cinco gramos de las muestras estériles fueron maceradas en un mortero estéril con 5 mililitros de solución salina estéril (NaCl 0.85%). El macerado se diluyó serialmente hasta  $10^{-8}$ . Cien microlitros de cada dilución fueron sembrados en medio rico YEM compuesto por: manitol 10 g, extracto de levadura 1 g,  $K_2HPO_4$  0.5 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 g, NaCl 0.1 g,  $Ca_2CO_3$  1 g y agar 1.5 g por litro. El crecimiento se llevó a cabo durante 48 horas a 30 °C.



## 2.2 Fijación de nitrógeno.

Los aislados obtenidos fueron crecidos en 3 mL del medio de cultivo respectivo, luego se sedimentaron las células mediante centrifugación (2000 x g, 5 min) y se realizaron 3 levados con solución salina estéril. Finalmente se resuspendieron las células en 100 µL de solución salina estéril y se sembraron gotas de 10 µL de cada cultivo sobre placas con medio de cultivo Burk. Este medio carece de nitrógeno y comprende: glucosa 10 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.41 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.52 g,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0.05 g,  $\text{CaCl}_2$  0.2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.005 g,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.0025 g y agar 1.8 g por litro. Las placas fueron cultivadas a 30 °C durante 10 días.

## 2.3 Producción de ácido indol acético.

Los aislados fueron cultivados en 20 mL de medio YEM (YEMA sin agar) suplementado con triptófano 0.1% durante 4 días en agitación constante y 30 °C. El sobrenadante de los cultivos fue obtenido por centrifugación a 4 °C durante 15 min a 8000 rpm. Luego, el reactivo de Salkowski ( $\text{HClO}_4$  35% 50 mL,  $\text{FeCl}_3$  0.5M 1 mL) y el sobrenadante fueron mezclados en una relación 2:1 e incubados en oscuridad durante 30 min. Después de la reacción, la absorbancia de las mezclas fue estimada a 540 nm y expresadas según el peso seco de la biomasa.

## 2.4 Identificación molecular.

La identificación molecular consistió en la secuenciación parcial del gen ribosomal 16S. El ADN se obtuvo hirviendo en 100 µL de agua destilada una cierta cantidad de biomasa endófito durante 5 min y 1 µL fue usado como molde en las reacciones de PCR. Las condiciones de las reacciones fueron: 30 s a 94 °C, 30 s a 57 °C, 1 min a 72 °C durante 40 ciclos. Los oligonucleótidos fueron: fD1 (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y rP2

(ACGGCTACCTTGTTACGACTT). El tamaño esperado fue de 1.4 kb y la enzima Taq Polimerasa (Invitrogen, EE.UU.). Las reacciones de PCR fueron purificadas usando un kit de purificación (Qiagen, Países Bajos). La secuencia nucleotídica fue determinada por MacroGen (Corea del Sur). La secuencia de los genes 16S de los endófitos fue comparada con aquellas depositadas en NCBI BLAST.

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Aislamiento de bacterias endófitas.

El conteo de unidades formadoras de colonias resultó en 717550 UFC/mL de macerado. Según la diversidad de morfología de las colonias, fueron arbitrariamente escogidas 65 colonias para continuar con el análisis.

### 3.2 Crecimiento en medio de cultivo carente de nitrógeno.

La capacidad de fijar nitrógeno atmosférico se estimó cualitativamente según la capacidad de los aislados en crecer en el medio Burk, el cual no posee fuente de nitrógeno. De los 65 aislados, 53 mostraron un crecimiento significativo en el medio. La apariencia de este ensayo se muestra en la figura 1. En el centro de placa se sembró *Escherichia coli* DH5α como control negativo.

### 3.3 Producción de ácido indol acético.

La producción bacteriana de esta hormona vegetal suele medirse en cultivos que han llegado a la fase estacionaria de crecimiento. De los 65 aislados endófitos, 35 fueron capaces de producir niveles detectables de la auxina (producción de color rojo, figura 2), de los cuales 3 acumularon una cantidad relativa de IAA significativamente mayor que el resto de los aislados (Tabla 1).

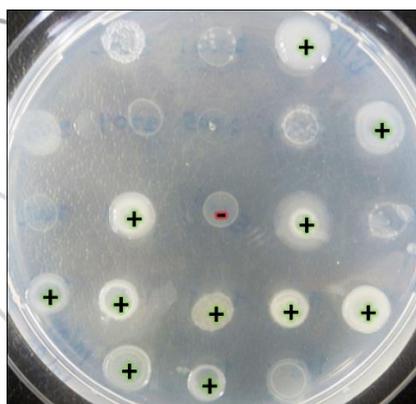
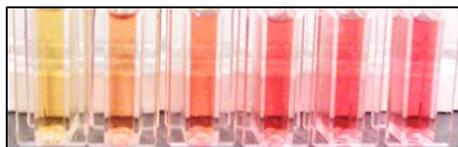


Figura 1. Crecimiento bacteriano en medio Burk. Los aislados endófitos fueron sembrados en gotas y cultivados durante 10 días a 30 °C. El crecimiento bacteriano (+) pudiera deberse a la capacidad de las bacterias de usar el nitrógeno atmosférico como nutriente.

Figura 2. Ensayo de producción de



auxinas. Se obtuvo el sobrenadante de cultivos con 4 días de crecimiento, se mezcló con el reactivo de Salkowsky y se incubó 30 min en oscuridad. La coloración roja fue indicativa de la producción de IAA (muestras a la derecha). El cambio de coloración fue determinado espectrofotométricamente a 540nm y fue relacionado con el peso seco de la biomasa.

### 3.4 Identificación molecular

Los genes ribosomales del 16S de los aislados endófitos fueron amplificados mediante PCR (figura 3), purificados mediante kit y enviados al servicio de secuenciación. Hasta la fecha han sido obtenidas secuencias parciales de 16 aislados endófitos productores de IAA. De ellos, 6 pertenecen al filo *Bacteroides* (1101, 1103, 1108, 1201, 1205 y 2205), 5 a *Proteobacteria* (1204, 2101, 2309,

2311 y 2315), 2 a *Firmicutes* (2314 y 2321b) y 3 aislados clasificados como No Cultivados (1302, 1308 y 2102) según el Blast (tabla 1).

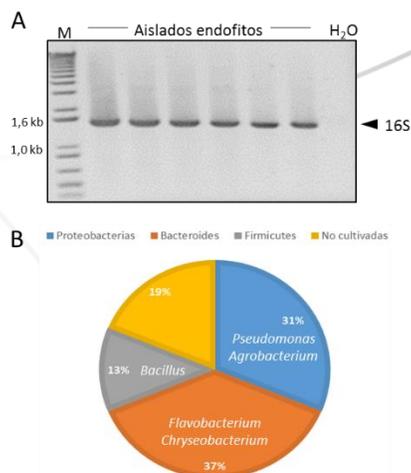


Figura 3. Identificación molecular de los aislados endófitos. A) Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de los genes 16S. Se muestra una foto representativa con 6 aislados amplificados, el marcador de peso molecular 1 kb Ladder (M) y el control negativo (H<sub>2</sub>O). B) De 16 secuencias obtenidas hasta la fecha, se han detectado 3 *phyla*: *Proteobacteria*, *Bacteroides* y *Firmicutes*. Se muestra la proporción de cada grupo y sus representantes.

## 4. DISCUSIÓN

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal potencian el desarrollo de las plantas mediante mecanismos directos o indirectos. Estos mecanismos incluyen fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de fitohormonas, sideróforos, deaminasa ACC, antibióticos, etc [7]. Estas actividades bacterianas proveen a la planta de nutrientes, disminuyen la concentración



de etileno y proporcionan defensas contra patógenos.

Tabla 1. Aislados endófitos productores de IAA. Se indica la nomenclatura del aislado, el cultivar de arroz del cual fue aislado, la capacidad de crecer en medio Burk (-N) y la producción de IAA. La identificación preliminar de 16 aislados escogidos arbitrariamente también se muestra (nd, no determinado)

Aislado	Cultivar	- N	IAA	Género
1101	Pionero FL210	+	+	<i>Flavobacterium</i>
1103	Pionero FL210	+	+	<i>Chryseobacterium</i>
1104	Pionero FL210	+	+	nd
1105	Pionero FL210	+	+	nd
1108	Pionero FL210	+	+	<i>Flavobacterium</i>
1109	Pionero FL210	+	+	nd
1110	Pionero FL210	+	+	nd
1112	Pionero FL210	+	+	nd
1201	Pionero FL210	+	+	<i>Flavobacterium</i>
1204	Pionero FL210	+	+	<i>Pseudomonas</i>
1205	Pionero FL210	+	+++	<i>Chryseobacterium</i>
1302	Pionero FL210	-	+	No Cultivado
1303	Pionero FL210	-	+	nd
1306	Pionero FL210	-	+	nd
1307	Pionero FL210	+	+	nd
1308	Pionero FL210	+	+	No Cultivado
1309	Pionero FL210	+	+	nd
2101	SD20A	+	+	<i>Pseudomonas</i>
2102	SD20A	+	+	No Cultivado
2103	SD20A	+	+	nd
2205	SD20A	-	+	<i>Flavobacterium</i>
2303	SD20A	+	+	nd
2304	SD20A	+	+	nd
2305	SD20A	+	+	nd
2306	SD20A	+	+++	nd
2309	SD20A	+	+++	<i>Pseudomonas</i>
2311	SD20A	+	+	<i>Agrobacterium</i>
2312	SD20A	-	+	nd
2314	SD20A	+	+	<i>Bacillus</i>
2315	SD20A	+	+	<i>Agrobacterium</i>
2316	SD20A	+	+	nd
2317	SD20A	-	+	nd
2318	SD20A	-	+	nd
2319	SD20A	+	+	nd
2321b	SD20A	+	+	<i>Bacillus</i>

Especial interés reciben las bacterias que residen en los tejidos internos de la planta, las bacterias endófitas; se piensa que son capaces de modular positivamente la fisiología de la planta huésped con mayor eficacia que las bacterias de la rizósfera [13]. En este estudio hemos aislado bacterias endófitas a partir de la endorizósfera de dos cultivares venezolanos de arroz. El número de UFC por mililitro de macerado de raíz (cuya superficie fue previamente esterilizada) que contamos ascendió hasta 717550, un número 10 veces de magnitud menor a las estimaciones más recientes [17] [18] [19]. Probablemente la elección del medio de cultivo fue el factor influyente.

Realizamos una exploración inicial de dos características bacterianas promotoras del crecimiento vegetal: la capacidad de crecer en medio de cultivo sin fuente de nitrógeno (medio Burk) y la producción bacteriana de ácido indol acético, una fitohormona. De un total de 65 aislados cultivados, el 80% (53 aislados) fueron capaces de crecer en condiciones sin nitrógeno. Estos aislados son candidatos para futuras estimaciones cuantitativas de actividad nitrogenasa (fijación de nitrógeno). Por otra parte, encontramos que 35 aislados fueron capaces de producir IAA (tabla 1), de los cuales 3 fueron comparativamente mucho más eficientes en tal característica (1205, 2306 y 2309). Estos tres aislados recibirán más atención en los estudios subsiguientes: cuantificación de la producción de IAA, fijación de nitrógeno y actividad deaminasa ACC.

La resolución y calidad de las secuencias nucleótidas parciales del 16S (1040 pb en promedio) ha permitido conocer el género de 16 aislados (el resto de los aislados están en proceso de identificación actualmente). A pesar de



esta limitación, los resultados preliminares resultan interesantes. El aislado 1205 productor de IAA ha sido identificado molecularmente como perteneciente al género *Chryseobacterium*. Este hallazgo resulta interesante puesto que no hay reportes en la literatura de esta bacteria endófito en arroz, sino en maíz [17] [18] [19]. Un caso similar surge con *Agrobacterium*; si bien es un habitante habitual de la microbiota rizosférica y en el suelo, su presencia en la endorizósfera de arroz no ha sido previamente establecida. Por su parte, los representantes de *Flavobacterium*, pero sobre todo de *Pseudomonas*, han sido frecuentemente hallados en la endorizósfera de arroz [17] [18] [19].

Los aislados endófitos que muestran potenciales actividades bacterianas del crecimiento vegetal son buenos candidatos para ser incluidos en formulaciones de bioinóculos; no solo para arroz, sino también para otros rubros de interés agrícola. Futuros estudios examinarán el efecto de estas bacterias en plantas de arroz.

## REFERENCIAS

- [1] Tilman D, Cassman KG, Matson PA, Naylor R, & S Polasky (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418:671-677.
- [2] Pérez-Montaña F, Alías-Villegas C, Bellogín RA, del Cerro P, Espuny MR, Jiménez-Guerrero I, López-Baena FJ, Ollero FJ, Cubo T (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiol Res* 169(5-6):325-36.
- [3] Tilman D, Cassman KG, Matson PA, Naylor R, & S Polasky (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418:671-677.
- [4] Ryan PR, Dessaux Y, Thomashow LS, & DM Weller (2009). Rhizosphere engineering and management for sustainable agriculture. *Plant Soil* 321:363-383
- [5] Liang Y, Zhu Y-G, Smith FA, & H Lambers (2010). Soil-plant interactions and sustainability of eco-agriculture in arid region: a crucially important topic to address. *Plant Soil* 326:1-2.
- [6] Kim YC, Leveau J, McSpadden Gardener BB, Pierson EA, Pierson LS 3rd, & CM Ryu (2011). The multifactorial basis for plant health promotion by plant-associated bacteria. *Appl Environ Microbiol* 77:1548-55.
- [7] Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud ML, Touraine B, Moëne-Loocozy Y, Muller D, Legendre L, Wisniewski-Dyé F, Prigent-Combaret C (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front Plant Sci* 4: 356.
- [8] Bhattacharyya PN, Jha DK (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol* 4:1327-50.
- [9] Nair DN, Padmavathy S (2014). Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. *Scientific World Journal* 250693, doi: 10.1155/2014/250693.
- [10] Conrath U, Beckers GJ, Flors V, García-Agustín P, Jakab G, Mauch F, Newman MA, Pieterse CM, Poinssot B, Pozo MJ, Pugin A, Schaffrath U, Ton J, Wendehenne D, Zimmerli L, Mauch-Mani B (2006). Priming: getting ready for battle. *Mol Plant Microbe Interact*.19:1062-71.



- [11] Reinhold-Hurek B, and Hurek T (1998) Life in grasses: Diazotrophic endophytes. *Trends Microbiol.* 6: 139-144.
- [12] Compant S, Clement C, Sessitsch A. (2010) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol. Biochem.* 42: 669-678.
- [13] Reinhold-Hurek B, Hurek T (2011) Living inside plants: Bacterial endophytes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14: 435-443.
- [14] Hardoim PR, Overbeek L, Van Elsas JD (2008) Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol.* 16: 463-471.
- [15] Marella S (2014) Bacterial endophytes in sustainable crop production: applications, recent developments and challenges ahead. *Int J Life Sci Res.* 2: 46-56.
- [16] Tkacz A, Poole P (2015). Role of root microbiota in plant productivity. *J Exp Bot.* 8: 2167-2175.
- [17] Hardoim P, Dini A, Reinhold-Hurek B, Sessitsch A, van Overbeek L, van Elsas JD (2011) Rice root-associated bacteria – insights in community structures across ten cultivars. *FEMS Microbiol Ecol.* 77: 154–164.
- [18] Hardoim P, Reinhold-Hurek B, Sessitsch A, van Overbeek L, van Elsas JD (2011) Assessment of rice root endophytes and their potential for plant growth promotion. En Pablo Rodrigo Hardoim, Groningen: *Bacterial Endophytes of Rice – Their Diversity, Characteristics and Perspectives.* Capítulo 4. ISBN: 978-90-367-5086-8. Países Bajos.
- [19] Hardoim P, Hardoim C, van Overbeek L, van Elsas JD (2011) Dynamics of rice endophytes – rise

and fall of empires. En Pablo Rodrigo Hardoim, Groningen: *Bacterial Endophytes of Rice – Their Diversity, Characteristics and Perspectives.* Capítulo 6. ISBN: 978-90-367-5086-8. Países Bajos.