

DIVERSIDAD DE BACTERIAS ENDOFITAS ASOCIADAS A CULTIVO DE ARROZ EN EL DEPARTAMENTO DE CORDOBA-COLOMBIA. ESTUDIO PRELIMINAR

ENDOPHYTIC BACTERIAL DIVERSITY FROM RICE OF THE DEPARTAMEN OF CORDOBA-COLOMBIA. PRELIMINARY STUDY

PEREZ, C. ALEXANDER Dr^{1*}, PEREZ, C. CRISTO MSc², CHAMORRO A. LEONARDO Biol.³

¹Docente Universidad de Sucre, Grupo Investigación en Bioprospección Agropecuaria, Universidad de Sucre. ²Fondo Nacional del Arroz, seccional Montería. ³Estudiante Maestría en Biología, Universidad de Sucre, Colombia.

*Correspondencia: alexpcor@yahoo.com

Recibido: 09-12-2012; Aceptado: 12-03-2013.

Resumen

Las bacterias endófitas viven en el interior de las plantas sin causar daño en ellas. Su presencia ha sido relacionada con un aumento en la productividad de los cultivos debido a que produce hormonas de crecimiento, antagonistas de patógenos o pueden fijar nitrógeno. En este trabajo se estudió la composición de comunidades de bacterias endófitas cultivables asociadas a diferentes tejidos de cuatro variedades comerciales de arroz del departamento de Córdoba. Para el aislamiento se utilizó técnica de desinfección superficial de tejidos, el aislamiento se llevó a cabo en medio de cultivo agar R₂A. La densidad poblacional (UFC/g de tejido) se realizó por conteo de colonias en placa. Las significancias estadísticas entre densidad poblacional, con relación a tejidos y variedad, se hizo mediante análisis multifactorial y prueba múltiple de rango (Tukey). Los resultados muestran que existe una densidad poblacional de bacterias endófitas asociadas a plantas de arroz; la abundancia está relacionada con el tejido y la variedad estudiada. Este estudio preliminar da inicio al conocimiento de esas comunidades bacterianas y la funcionalidad que puedan estar ejerciendo en esta especie vegetal.

Palabras clave: arroz, variedad, tejidos, bacterias endófitas, Córdoba, Colombia.

Abstract

Endophytic bacteria living within the plant without causing damage to them. Their presence has been linked to increased crop productivity because it produces growth hormones, pathogens or antagonists can fix nitrogen. This study examined the composition of communities of cultivable endophytic bacteria associated with different tissues of four commercial varieties of rice in the department of Cordoba. For isolation technique used tissue surface disinfection, the isolation was

performed on R₂A agar medium. The population density (CFU / g of tissue) was performed by counting of colonies on plate. The statistical significance between population density relative to tissues and variety was made using multivariate analysis and multiple range test (Tukey). The results show that there is a population density of endophytic bacteria associated with rice plants, the abundance is related to the tissue and the variety studied. This preliminary study initiates the knowledge of these bacterial communities and functionality that might be carrying in this plant species.

Key words: rice, variety, tissue, endophytic bacteria, Córdoba, Colombia.

Introducción

En Colombia, el cultivo de arroz ocupa el primer lugar en términos de valor económico entre los cultivos de ciclo corto. Es el tercer país productor de América Latina y del Caribe después de Brasil y Perú (FAO, 2010) y ocupa el puesto 22 a nivel mundial con una participación de 0.4%(ESPINAL *et al.*, 2005). El arroz es el tercer producto agrícola en extensión, después del café y el maíz. Representa el 13% del área cosechada en Colombia y el 30% de los cultivos transitorios. Su producción representa el 6% del valor de la producción agropecuaria y el 10% de la actividad agrícola Colombiana. El valor generado por este producto es equivalente al 58% del valor constituido por el cultivo del café (ARAMENDIZ *et al.*, 2011).

Las bacterias endófitas desarrollan la mayor parte de su ciclo de vida en el interior de la planta, sin causar síntomas de daño en ella. Se localizan en pequeños agregados dispersos en todo el cuerpo de la planta, principalmente en los alrededores de las células de la epidermis y la exodermis y en las células del córtex (REINHOLD-HUREK y HUREK, 1998). En este hábitat se produce el intercambio de nutrientes - gases incluidos y se favorece su actividad metabólica.

Las bacterias endófitas viven asintómicamente dentro de los tejidos de la planta y se han encontrado en casi todos los estudios de plantas hasta la fecha (SCHULZ *et al.*, 1993). Ellas juegan un papel importante en las actividades fisiológicas de las plantas hospederas e influyendo en el mejoramiento al estrés y resistencia a enfermedades, insectos y nematodos (CARROLL, 1988; HALLMANN y SIKORA, 1996; AZEVEDO *et al.*, 2000; STURZ y NOWAK, 2000). Los endófitos también incrementan el crecimiento de la planta y la capacidad de fijar nitrógeno en la planta hospedera (VERMA *et al.*, 2001; RAHMAN y SAIGA, 2005). Las bacterias endófitas constituyen una búsqueda invaluable de metabolitos secundarios (Li *et al.*, 2000; STROBEL, 2002) y sería una fuente de nuevos fármacos de importancia

biotecnológica y un programa de gestión contra enfermedades de las plantas (MURRAY *et al.*, 1992; AZEVEDO *et al.*, 2000; BERG *et al.*, 2004).

Estudios sobre microorganismos endófitas en el cultivo del arroz a nivel mundial se han centrado sobre bacterias diazotróficas (VERMA *et al.*, 2001), rizobial (STURZ y NOWA, 2000; CHAINTREUIL *et al.*, 2000), bacterias fototróficas anóxica (PAOLINO y SCAVINO, 2004), bacterias endófitas y poblaciones de hongos y actinomicetes, relacionado con la promoción del crecimiento, fijación potencial de nitrógeno y resistencia a enfermedades (AZEVEDO *et al.*, 2000; TIAN *et al.*, 2004, FERNANDEZ *et al.*, 2006).

En la actualidad se carece un inventario de diversidad de bacterias endófitas asociadas al cultivo del arroz en diferentes agroecosistema del Caribe Colombiano, razón por lo cual el presente estudio tuvo como objetivo aislar bacterias endófitas asociadas a cuatro variedades comerciales de arroz en el departamento de Córdoba para establecer significancia entre diversidad de bacterias endófitas (UFC/ g de tejido) con respecto a variedades y tejidos.

Materiales y métodos

Las plantas de arroz fueron colectadas en la granja experimental La Victoria perteneciente al Fondo Nacional del arroz- Fedearroz, ubicada en el municipio de Mocarí-Córdoba-Colombia, situada en la margen izquierda de la carretera que une a Montería con Cereté, entre 8°47'25" Norte 75°51'38" Oeste con respecto al Meridiano de Greenwich, con una temperatura promedio de 29°C, humedad relativa de 80 por ciento, precipitación anual promedio de 1200 mm y altura de 20 m.s.n.m.

Cuatro variedades diferente de arroz fueron utilizadas en este estudio designado como Fedearroz 2000 (F2000), Fedearroz 273 (F273), Fedearroz Mocarí (Fmocarí) y Fedearroz 733 (F733). 10 plantas completas (incluyendo raíces) de cada variedad fueron colectadas en etapa de inflorescencia y transportadas al laboratorio de investigaciones microbiológicas de la Universidad de Sucre y procesada dentro de las 24 horas después de colectadas. De cada planta se separaron raíz, tallo, hojas bajas, hojas banderas y panículas.

Aislamiento de endófitas: Las raíz, tallo, hojas, hojas banderas y panículas de cada planta de arroz se lavaron con agua estéril y se cortaron en segmento de 1 cm aproximadamente. La desinfección superficial de cada tejido fue realizada de la siguiente manera lavados de cada tejido por separado en agua destilada esterilizada, seguida de agitación por 15 min en solución tampón de fosfato de

potasio 0,05 mol L⁻¹, pH 7,0; inmersión por 1 min en alcohol 70%; agitación por 5 min en solución de hipoclorito de sodio 5% y Tween 80%; nuevamente inmersión por 1 min en alcohol 70% seguida de agitación por 15 min en solución tampón fosfato de potasio 0,05 mol L⁻¹, pH 7,0 y, finalmente, el lavado por cuatro veces en agua destilada esterilizada. Para confirmar la esterilización de la superficie de las raíces, alícuota del último lavado fue esparcida en placa conteniendo medio agar R₂A e incubada a 28 °C por 72 horas. La ausencia de crecimiento de bacteria en el medio R₂A confirmó que el procedimiento de desinfección superficial fue eficaz en la eliminación de bacterias de la superficie (PÉREZ *et al.*, 2010).

Después del proceso de desinfección, cada tejido fue colocado en plato de porcelana y macerado con nitrógeno líquido hasta obtener una mezcla homogénea. De cada homogenizado fue preparado diluciones seriadas las cuales fueron sembradas por difusión sobre la superficie de agar R₂A e incubada a 28 °C por 72 horas. La densidad poblacional de bacterias por tejido (UFC/g de tejido), fue estimada por conteo directo de colonias en placas. Durante el conteo fueron observadas y seleccionadas las colonias que se distinguían en cuanto a forma, aspecto de la superficie, color y tamaño. Los morfotipos seleccionados fueron purificados y mantenidos en agar R₂A para evaluaciones sobre actividad biológica de estas bacterias en cultivo de arroz.

Análisis estadísticos: Diferencias entre la densidad poblacional (UFC/g de tejido) de bacterias endófitas en función a variedades y tipo de tejido fue analizada por ANOVA multifactorial. Asimismo se utilizó la prueba múltiple de rango (Tukey) para establecer diferencias por separado entre comunidades de bacterias endófitas (UFC/ g de tejidos) con relación a variedad y tipo de tejido colonizado.

Resultados y discusión

Un total de 89 aislados de bacterias endófitas pertenecientes a las cuatro variedades fueron obtenidas de los diferentes tejidos de la planta de arroz. El número de aislados y la colonización de bacterias endófitas variaron significativamente para variedad y tipo de tejido analizado. El análisis de varianza multifactorial (UFC/ g de tejido) de bacterias endófitas mostró diferencias significativas tanto para tejido como variedad (Tabla 1).

La prueba múltiple de rango (Tukey) para comunidades de bacterias endófitas (UFC/ g de tejidos) mostró significancia en cuanto a colonización entre las variedades de arroz estudiadas. Las variedades de arroz con mayor densidad de bacterias endófitas asociadas a ella fue F733 (1.77×10^{10} UFC/g de tejido) y FMocari (1.7×10^{10} UFC/g de tejido) con respecto a las que mostraron menor

densidad de bacterias endófitas, correspondiendo a F273 y F2000, las cuales tuvieron densidades de 2.0×10^7 y 1.56×10^7 , respectivamente (Fig. 1).

Tabla 1. Anova multifactorial de UFC/g de tejido de bacterias endófitas en tejidos y variedades de arroz de Mocarí-Cordoba-Colombia

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos principales					
A:tejido	9.10001E21	4	2.275E21	8.60	0.0000***
B:variedad	4.58909E21	3	1.5297E21	5.78	0.0017***
Residuos	1.37524E22	52	2.64469E20		
Total (corregido)	2.74415E22	59			

***Altamente significativo a intervalos de confianza del 95.0%.

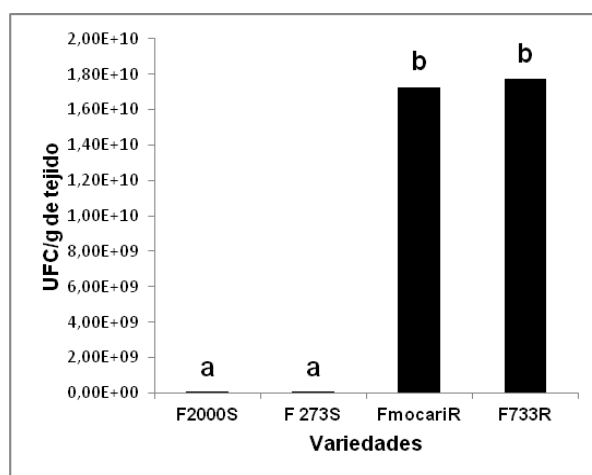


Figura 1. Densidad poblacional promedio de bacterias endófitas asociadas a variedades de arroz. F: Fedearroz, S: variedad susceptible a *Burkholderia glumae*, R: variedad tolerante a *Burkholderia glumae*

La colonización de bacterias endófitas difiere significativamente (Fig. 1) entre las variedades de arroz y grado de susceptibilidad y tolerancia a *B. glumae*. Las variedades con mayor densidad de bacterias endófitas asociadas corresponden a las variedades tolerantes Fmocari y F733 en comparación con las variedades susceptibles F2000 y F273. Las bacterias endófitas son reconocidas como aquellas aisladas de tejidos de plantas desinfectadas superficialmente o, de su interior, y que no causan síntomas visibles de enfermedad en la planta (HALLMANN *et al.*, 1997). Estudios indican que las bacterias endófitas interactúan con patógenos (SESSITCH *et al.*, 2002), promueven el crecimiento en las plantas hospedadoras (TSAVKELOVA *et al.*, 2007), aumentan la resistencia a enfermedades (CHANWAY, 1998), contribuyen a la fijación biológica de nitrógeno (JIMENEZ-

ESTRADA *et al.*, 2002) y brindan protección contra patógenos mediante la producción y síntesis de metabolitos secundarios (BERG *et al.*, 2005).

La prueba múltiple de rango para densidad de bacterias endófitas (UFC/ g de tejidos) en función a tipo de tejido muestra mayor colonización de bacterias endófitas en raíces 3.2×10^{10} UFC/g de tejido con respecto a tallo, hojas, hoja bandera y panícula (Fig. 2). La densidad poblacional de bacterias en tejido de arroz varió desde 1.06×10^7 en hoja bandera a 3.2×10^{10} en raíz. MANO *et al.* (2006) y OKUNISHI *et al.* (2005) encontraron densidad poblacional de bacterias endófitas cultivables en semillas de arroz en un rango de 10^2 a 10^6 /g de peso fresco. La diversidad de bacterias endófitas varía de acuerdo al tejido de la planta de arroz. Bacterias endófitas han sido aisladas de semilla, raíz, tallo, hoja y vaina de la hoja de diferentes variedades de arroz (HIRONOBU y HISAU, 2008). Poblaciones de bacterias endófitas fueron aisladas de 2400 segmentos de arroz colectadas del Sureste de la India en dos épocas del año. La tasa de colonización de tejidos por bacterias endófitas a partir de superficies desinfectadas varió en cuanto a la época del año, con 40.3% en raíces y 25.83% en hojas durante el invierno y 20.15% en raíces y 8.66% en hojas durante el verano (SHANKAR *et al.*, 2009).

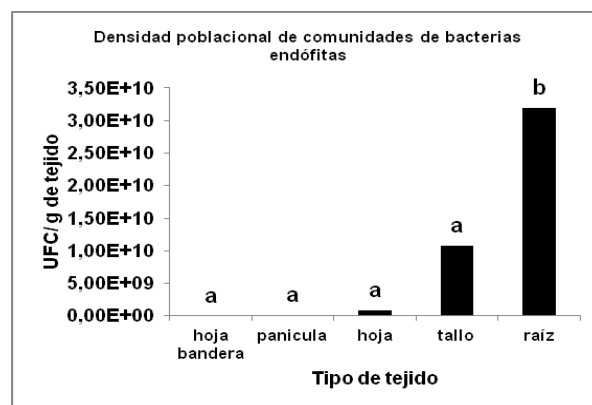


Figura 2. Densidad poblacional promedio de bacterias endófitas asociadas a tejidos de arroz

Perspectivas

Las bacterias endófitas son consideradas como modelo de estudio de expresión génica en su nicho natural o hábitat dentro de las plantas (MARON *et al.*, 2006). Sin embargo, cuestiones básicas sobre la diversidad microbiana existente en diferentes variedades comerciales de arroz, así como la estructura de esas comunidades y la funcionalidad en estas especies vegetales, localizadas en diversos ambientes geográficamente definidos, deben ser objeto de

investigaciones modernas en lo referente a bacterias endófitas, productividad y alternativa biológica frente a fitopatógenos en este cultivo.

Agradecimiento: Los Investigadores agradecen al Fondo Nacional del Arroz por su colaboración en la realización del presente proyecto.

Referencia

ALEXANDER PEREZ C.; JOHANNA ROJAS S.; JUSTO FUENTES. 2010. Diversidad de bacterias endófitas asociadas a raíces del pasto colosuana (*Bothriochloa pertusa*) en tres localidades del departamento de Sucre, Colombia. Acta biol. Colombiana 15(2): 219-228.

ALIYE N.; FININSA C.; HISKIAS Y. 2008. Evaluation of rhizosphere bacterial antagonists for their potential to bioprotect potato (*Solanum tuberosum*) against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). Biological Control 47:282–8.

ARAMENDIZ-TATIS, H.; ESPITIA-CAMACHO, M.; CARDONA-AYALA, C. 2011. Adaptación del arroz de riego (*Oryza sativa* L) en el Caribe Colombiano. Acta Agronómica 60(1):1-12.

AZEVEDO, J.L.; MACCHRONIW, C.; PEREIRA, J.O.; ARAUJO, W.L. 2000. Endophytic microorganisms: are viewed on insect control and recent advances on tropical plants. Biotechnology 3:40–65.

BERG, G.; KRECHEL, A.; FALTIN, F.; ULRICH, A.; HALLMANN, J.; GROSCH, R. 2004. *Endophytes: a new source for environmental biotechnology*. In: Abstracts of 10th international symposium on microbial ecology ISME-10, "Microbial Planet: sub surface to space", Cancun, Mexico, August 22–27.

BERG, G.; KRECHEL, A.; DITZ, M.; SIKORA, A.; ULRICH, A.; HALLMANN, J. 2005. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. FEMS Microbiology Ecology 5:215–229.

CARROLL, G. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves from latent pathogens to mutualistic symbionts. Ecology 69:2–9.

CORREA, F.; PÉREZ, C.R.; SAAVEDRA, E. 2007. Añublo bacterial de la panícula del arroz. Arroz 57:468.

CHARENTREUIL, C.; GIRAUD, E.; PRIN, Y.; LORQUIN, J.; BA, A.; GILLIS, M. 2000. Photosynthetic Bradyrhizobia are natural endophytes of the Africa wild rice *Oryza breviligulata*. Appl Environ Microbiol. 12: 5437–5447. http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_7/b_fdi_57-58/010023750.pdf. Consultado: 11-09-2012.

CHANWAY, C.P. 1998. Bacterial endophytes: ecological and practical implications. *Sydowia* 50:149-170.

ESPINAL, C.F.; MARTÍNEZ, H.J.; ACEVEDO, X. 2005. La cadena de arroz en Colombia. Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Disponible en: <http://www.agrocadenas.gov.co>. Consultado: 02-12-2012.

ESTRADA, P.; MAVINGUI, P.; COURNOYER, B.; FONTAINE, F.; BALANDREAU, J.; CABALLERO-MELLADO, J. 2002. A N₂-fixing endophytic Burkholderia sp. associated with maize plants cultivated in Mexico. *Canadian Journal of Microbiology* 48: 285–294.
<http://www.bashanfoundation.org/caballero/caballerofixing.pdf>. Consultado: 09-10-2012.

FAO. 2010. Estadísticas mundiales sobre cultivos. Disponible en: <http://www.Faostat.Org>. Consultado: 10-10-2012).

FERNANDEZ, M.J.; FERRANDO, L.; FERNANDEZ, A.S. 2006. *Molecular and functional diversity of endophytic bacteria from leaves of three rice varieties*. In: Eleventh international symposium on microbial ecology (ISME-11), Vienna, Austria, August 20–25,.

HALLMANN J.; SIKORA, R.A. 1996. Toxicity of fungal endophytic secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil borne plant pathogenic fungi. *Eur J. Plant Pathol* 102:155–62.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal Microbiology*. 43: 895-914. <http://www.nrcresearchpress.com/doi/pdf/10.1139/m97-131>. Consultado: 24-09-2012.

HIRONOBU, M.; HISAU M. 2008. Endophytic bacteria in the plant rice. *Microbes Environ* 23(2):19-117.

JIMÉNEZ-SALGADO, T.; FUENTES-RAMIREZ, L.E.; TAPIA-HERNANDEZ, A.; MASCARUA-ESPARZA, M.A.; MARTINEZ-ROMERO, E.; CABALLERO MELLADO, J. 1997. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus* and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. *Applied Environmental Microbiology* 63:3676-3683.

LI, J.Y.; STROBEL, G.A.; HARPER, J.K.; LOBKOVSKY, E.; CLARDY, J. 2000. Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiosis ef. quercina*. *Org Lett* 2:767–770.

MANO, H.; TANAKA, F.; WATANABE, A.; KAGA, H.; OKUNISHI, S.; MORISAKI, H. 2006. Culturable Surface and Endophytic Bacterial Flora of the Maturing Seeds of Rice Plants (*Oryza sativa*) Cultivated in a Paddy Field. *Microbes and Environments - Microbes Environments* 21(2):86-100.

MARON, P.; RANJARD, L.; MOUGEL, C.; LEMANCEAU, P. 2006. Metaproteomics: A new Approach for Studying Functional Microbial Ecology. *Microbial Ecology* 53:486-493.

MURRAY, F.R.; LATCH, G.C.M.; SCOTT, D.B. 1992. Surrogate transformation of perennial rye grass, *Lolium perenne*, using genetically modified *Acremonium* endophyte. *MolGen Genet.* 233:1–9.

OKUNISHI S.; SAKO K.; MANO H.; IMAMURA A.; MORISAKI H. 2005. Bacterial flora of endophytes in the maturing seed of cultivated rice (*Oryza sativa*). *Microbes Environ.* 20:168–177.

PAOLINO, G.; SCAVINO, A.F. 2004. *Molecular and physiological diversity of anoxygenic phototrophic bacteria in rice fields from temperate climate.* In: Abstracts of tenth International symposium on Microbial Ecology ISME-10, “Microbial Planet: subsurface to space”, Cancun, Mexico, August: 22–27.

RAHMAN, M.H.; SAIGA, S. 2005. Endophytic fungi (*Neotyphodium coenophialum*) affect the growth and mineral uptake, transport and efficiency ratios in tall fescue (*Festuca arundinacea*). *Plant Soil* 272:163–171.

REINHOLD-HUKER, B.; HUREK T. 1998. Interactions of Grameneous plant with *Azoarcus* spp., and other diazotrophic, identification, localization and perspective to study their function. *Critical Reviews in plant Science* 17:29-54.

SESSITSCH, A.; REITER, B.; PFEIFER, U.; WILHELM, E. 2002. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology* 39:23-32.

SHANKAR-NAIK, B.; SHASHIKALA, J.; KRISHNAMURTHY, Y.L. 2009. Study on the diversity of endophytic communities from rice (*Oryza sativa* L.) and their antagonistic activities in vitro. *Microbiological Research* 164:290-296.

SCHULZ, B.; WANKE, D.; DRAEGER, S. 1993. Endophytes from herbaceous and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycol Res.* 97:1447–50.

STROBEL, G.A. 2002. Rain forest endophytes and bioactive products. *Crit Rev Biotechnol.* 22:325–333.

STURZ, A.V.; NOWAK, J. 2000. An endophytic community of rhizobacteria and the strategies requires to create yield enhancing associations with crops. *Appl Soil Ecol.* 15:183–190.

SUGURU, O.; KENTARO, S.; HIRONOBU, M.; IMAMURA, A.; MORISAKI, H. 2005. Bacterial Flora of Endophytes in the Maturing Seed of Cultivated Rice (*Oryza sativa*). *Journal Microbes and Environments - Microbes Environments* 20(3):168-177.

TSAVKELOVA, E.A.; CHERDYNTSEVA, T.A.; BOTINA, S.G.; NETRUSOV, A.I. 2007. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiol Res.* 162(1):69-76.

TIAN, X.L.; CAO, L.X.; TAN, H.M.; ZENG, Q.G.; JIA, Y.Y.; HAN, W.Q. 2004. Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice and their antipathogenic activities in vitro. *World J Microbiol Biotechnol.* 20:303–309.

VERMA, S.C.; LADHA, J.K.; TRIPATHI, A.K. 2001. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J Biotechnol.* 91:127–41.