

## DIVERSIDAD DE BACTERIAS ENDÓFITAS EN CULTIVOS DE ARROZ EN URUGUAY. ESTUDIOS PRELIMINARES

Fernández Mañay, J.; Ferrando, L.; Macazaga, V.;  
Fernández Scavino, A.<sup>1</sup>

### RESUMEN

Los microorganismos endófitos se desarrollan en el interior de las plantas sin causar daño en ellas. Se ha vinculado su presencia al aumento de la productividad de los cultivos porque pueden producir hormonas de crecimiento, antagonistas de patógenos o pueden fijar nitrógeno. El arroz es una de las gramíneas para las cuales se ha investigado más extensamente la presencia de bacterias endófitas. Las bacterias fijadoras de nitrógeno son las que recibieron mayor atención en estos estudios debido a la importancia que tiene este insumo para el cultivo. Sin embargo, la caracterización de la comunidad total de bacterias endófitas ha quedado relegada y su potencial incidencia en la productividad ha sido ignorada hasta el momento. En este trabajo se estudió la composición de la comunidad de bacterias endófitas heterótrofas cultivables de hojas y tallos de arroz de las variedades El Paso 144, Olimar y Tacuarí. Se detectaron entre 2,5 y 490 x 10<sup>4</sup> ufc/g peso seco y entre 24 y 760 x 10<sup>4</sup> ufc/g peso seco de bacterias endófitas en hoja y en tallo, respectivamente. El análisis morfológico de las colonias aisladas de las variedades El Paso 144 y Olimar permitió discriminar 17 morfotipos diferentes, con sólo seis morfotipos comunes a las dos variedades. La morfología y el análisis genotípico mediante el RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) del gen 16S rDNA mostraron también que las poblaciones presentes en hoja y tallo de la misma variedad difieren. Estos resultados preliminares revelan que la comunidad de bacterias endófitas cultivables es muy compleja, se distribuye heterogéneamente entre hoja y tallo y su composición depende de la variedad del cultivo.

**PALABRAS CLAVE:** biodiversidad, comunidad bacteriana, endófitas.

### SUMMARY

## DIVERSITY OF ENDOPHYTIC BACTERIA IN RICE CROPS IN URUGUAY. PRELIMINARY STUDIES

The endophytic microorganisms are non pathogenic organisms that live in a free association with plants. They may confer benefits to the plant increasing the crop productivity since many of them have the ability to produce growth hormones or pathogen antagonists or have the ability to fix nitrogen. Endophytic bacteria have been mostly examined in grasses, and specially in rice, for their ability to fix nitrogen, attempting to develop agricultural practices that reduce the fertilizer amendment. However, the whole bacterial endophytic community has not been characterized, and their potential for increasing the crop productivity has been disregarded. The composition of the cultivable heterotrophic endophytic bacterial community in leaves and stems of the rice varieties El Paso 144, Olimar and Tacuarí, has been studied. Endophytic bacteria were between 2,5 and 490 x 10<sup>4</sup> ufc/g dry weight and between 24 and 760 x 10<sup>4</sup> ufc/g dry weight in leaves and stems, respectively. Isolates from El Paso 144 and Olimar were classified in 17 morphotypes with six of them being common to both varieties. Morphology and genotypic analysis by RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) of the 16S rDNA gene showed that the endophytic populations in leaves and stems were different. These preliminary results reveal that the endophytic bacterial community is complex. The populations are heterogeneously distributed along the plant and depend on the crop variety.

**KEY WORDS:** bacterial community, biodiversity, endophytic.

<sup>1</sup>Cátedra de Microbiología, Facultad de Química, Universidad de la República. Gral. Flores 2124, Casilla de Correo 1157 Montevideo, Uruguay. E-mail: afernand@fq.edu.uy

## INTRODUCCIÓN

Los microorganismos endófitos desarrollan la mayor parte de su ciclo vital 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 cortex (Reinhold-Hurek & Hurek, 1998). En este hábitat se produce el intercambio de nutrientes –gases incluídos- y se favorece su actividad metabólica. Se ha postulado que las bacterias endófitas pueden tener un impacto importante en la productividad de los cultivos de interés agronómico porque estimulan el crecimiento de la planta por mecanismos como la producción de hormonas (Hallman *et al.*, 1997; Sharma y Novak, 1998), el antagonismo de patógenos (Sturz *et al.*, 1999; Wilhelm *et al.*, 1997; Krechel *et al.*, 2002) o la fijación de nitrógeno.

El cultivo de arroz es uno de los rubros principales de nuestra industria agropecuaria. Los cultivos de gramíneas en los cuales se ha investigado mas extensamente la presencia de bacterias endófitas son la caña de azúcar, el Kallar grass y el arroz cultivado (*Oryza sativa*). Si bien no se han encontrado asociaciones simbióticas como entre las leguminosas y *Rhizobium*, se ha observado que hay fijación de nitrógeno en algunos cultivos como la caña de azúcar brasilera y el arroz cultivado bajo inundación (Reinhold-Hurek & Hurek, 1998).

Los aislamientos de endófitas fijadoras de nitrógeno en raíces de arroz cultivado indican que éste es un grupo muy diverso de bacterias (Engelhard *et al.*, 2000; Hurek *et al.*, 2002). En Uruguay, al igual que en el resto del mundo, se han realizado trabajos enfocados hacia el aislamiento de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno (Punschke *et al.*, 2003). Sin embargo, la colonización de tejidos internos de la planta de arroz no se restringe a las bacterias fijadoras de nitrógeno. Las fijadoras de nitrógeno son una fracción menor del total de endófitas aisladas tanto de raíz como de tallo, en distintas etapas de crecimiento del cultivo y para distintas variedades del mismo (Barraquío *et al.*, 1997; Stoltzfus *et al.*, 1997). Estos resultados indican que hay un número considerable de bacterias endófitas (entre  $10^2$  y  $10^5$  por gramo de peso húmedo de tallo y hojas) capaces de ser cultivadas en el laboratorio y cuya interacción con la planta se desconoce. Por otro lado, se han aislado varias cepas endófitas de arroz promotoras del crecimiento que no sólo tienen la actividad nitrogenasa, sino también producen ácido indolacético –que favorece el elongamiento de la raíz- y solubilizan el fosfato mineral (Verma *et al.*, 2001). Asimismo, Adhikari y colaboradores aislaron cepas endófitas de los géneros *Pseudomonas* y

*Sphingomonas* que tienen marcada actividad promotora del crecimiento y antagonista de los hongos que infectan la raíz (Adhikari *et al.*, 2001).

Uno de los problemas para estudiar las bacterias endófitas con los métodos microbiológicos tradicionales es que la relación con la planta condiciona su aislamiento y crecimiento fuera de ella. Es difícil reproducir en el laboratorio un microambiente apto para el desarrollo de estas bacterias debido a que se desconocen los factores que la planta aporta a su crecimiento. Por otra parte, las nuevas herramientas moleculares aplicadas a la ecología microbiana han puesto en evidencia que la mayoría de las bacterias presentes en un ecosistema natural todavía no han sido cultivadas. Estos nuevos métodos son independientes del cultivo de las bacterias y superan las limitaciones de los métodos tradicionales. En estas técnicas se analizan moléculas características (marcadores) de las bacterias en lugar de detectar el microorganismo en crecimiento y por tanto se detecta su presencia aún desconociendo sus propiedades fisiológicas o las interacciones que tiene con otros organismos del hábitat que ocupa. Se emplean marcadores moleculares con valor taxonómico y filogenético, como el gen que codifica para una fracción de la subunidad menor del ribosoma (16SrRNA), o funcional como los genes *nif* que codifican para la reductasa de la nitrogenasa que reduce el nitrógeno gaseoso a amonio. Se ha realizado la caracterización molecular de las bacterias fijadoras de nitrógeno en plantas de arroz mediante el análisis de la secuencia de los genes *nifH*. Se observó que el conjunto de estos genes responde significativamente a cambios en parámetros ambientales (Tan *et al.*, 2003) y que los genes dominantes provienen de bacterias endófitas que aun no han sido cultivadas en el laboratorio (Hurek *et al.*, 2002).

En este trabajo se estudió la composición de la comunidad de bacterias endófitas heterótrofas cultivables de hojas y tallos de plantas de arroz. Estos resultados corresponden a la primera etapa de un estudio más amplio cuyo objetivo es realizar la caracterización molecular de comunidad de bacterias endófitas en la planta de arroz y determinar si existe una correlación entre esta composición y la productividad del cultivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Selección de plantas

Se extrajeron plantas de arroz en los dos meses previos a la cosecha del año 2005. Las muestras fueron extraídas de la Estación Experimental de Paso de la Laguna (INIA Treinta y Tres) donde por cada tratamiento se plantan al

menos tres parcelas con un diseño de bloques al azar. El análisis se realizó sobre un pool de 15 plantas extraídas de tres parcelas o repeticiones (5 plantas por parcela) de un mismo experimento. Se seleccionaron tratamientos con características similares, excepto la muestra H14 a la cual no se le aplicó herbicida. Los demás tratamientos seleccionados eran testigos de experimentos diseñados para estudiar el efecto de diferentes parámetros o tratamientos típicos respecto a la fertilización, época de inundación, aplicación de herbicidas y funguicidas.

Para comparar las endófitas de hoja en una misma variedad (Tacuarí) se seleccionaron plantas extraídas en marzo de los siguientes tratamientos: F8 y F12 (Testigos de Experimento de evaluación de momentos de aplicación de funguicidas para el control de las enfermedades del tallo); y H14 (Testigo de Experimento de Evaluación de aplicación de herbicidas en postemergencia temprana). Para comparar las endófitas de hoja y tallo se seleccionaron plantas extraídas en abril de los siguientes tratamientos: El Paso 144 (Parcela 15, Testigo sin aplicación de funguicida, Experimento de evaluación de funguicidas para control de enfermedades del tallo); Olimar (Parcela 10, Respuesta al fraccionamiento de la dosis de nitrógeno); Tacuarí (Potrero 1, Experimentos de manejo del cultivo, rotación con pasturas) (Unidad Experimental Paso de la Laguna, 2005).

### Desinfección

Las plantas se mantuvieron a 4°C hasta su lavado, desinfección y procesamiento. Se separaron hojas y tallo (5cm por encima de la raíz), se cortaron en fragmentos de 10-15cm de largo, se lavaron, cepillaron con agua y jabón, y se enjuagaron. La desinfección de 5g de muestra se realizó con dos lavados sucesivos con agitación en 100ml de hipoclorito de sodio 5% durante 3 minutos, seguido de 3 lavados con 200ml de agua destilada estéril. Con la impresión de fragmentos de hoja y tallo sobre placas de Agar Nutriente se determinó si la desinfección había sido eficiente. Esta metodología se seleccionó entre otras ensayadas porque permitió el mayor grado de desinfección y el menor daño del material.

### Recuento de bacterias endófitas

Se maceraron 5g de material en mortero con 10ml de suero fisiológico estéril. Se prepararon las diluciones correspondientes en suero fisiológico estéril y se realizaron los recuentos en placa por siembra en superficie en Agar Nutriente (Difco) y por siembra incorporada en Agar R2A (composición por litro: 0,5g extracto de levadura, 0,5g proteasa peptona, 0,5g casaminoácidos, 0,5g glucosa, 0,5g almidón soluble, 0,3g piruvato de sodio, 0,3g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05g

MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 15g agar; pH 7,2). Se incubó a oscuras a 30°C por 72hs.

Se aislaron colonias predominantes (de las mayores diluciones) y no predominantes. Se analizaron alrededor de 20 colonias de cada muestra. El análisis macroscópico de las colonias de las variedades El Paso 144 y Olimar aisladas en abril se realizó por observación de morfología y color.

### Análisis genotípico

El análisis genotípico de las colonias aisladas en abril de la variedad Olimar se realizó por RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) del gen 16S rDNA. Se extrajo DNA de cepas aisladas mediante la técnica fenol:cloroformo según Ferrando *et al.*, 2001. El DNA se amplificó con primers del gen 16S rDNA para el Dominio Bacteria; los amplicones se digirieron con las enzimas *Hae*III y *Hha*I y se separaron en agarosa Metaphor (3%) según condiciones previamente descritas por Fernández *et al.*, 1999. El análisis de los perfiles generados por los fragmentos de restricción se realizó con el software GelCompr (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). Se consideraron similares los perfiles con un porcentaje igual o mayor al 80% de similitud.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que se recuperó un alto número y una gran diversidad morfológica de bacterias endófitas en cultivos de hoja y tallo de las tres variedades analizadas.

El número de bacterias endófitas fue similar para los dos métodos de siembra y medios de cultivo empleados, aún utilizando R2A suplementado con extractos de hoja (Cuadros 1 y 2). Estos resultados indican que el uso de medios de cultivo diseñados para microorganismos oligotrofos como el R2A, así como el cultivo en tensiones de oxígeno menores que la atmosférica (siembra incorporada) recuperan cantidades similares de bacterias endófitas que los medios ricos incubados con saturación de oxígeno.

El análisis de hojas de la variedad Tacuarí muestra que el recuento de endófitas cultivables en dos tratamientos iguales y próximos que formaban parte del mismo experimento (F8 y F12) difiere consistentemente en ambos medios en un factor de alrededor de 6 (Cuadro 1). La diferencia es mayor aún cuando se comparan estos valores con los recuentos de endófitas en plantas de otro experimento (H14) que no estuvieron sometidas a las mismas condiciones (sin aplicación de herbicidas).

**Cuadro 1.** Población de bacterias heterótrofas endófitas (UFC x 10<sup>4</sup> por gramo de peso seco) aisladas en marzo de 2005 de hojas de la variedad Tacuarí.

Parcela	AN <sup>1</sup>	R2A <sup>1</sup>	R2A <sup>1</sup> suplementado
F8	26	21	Nd <sup>2</sup>
F12	4,1	3,8	Nd <sup>2</sup>
H14	490	330	260

<sup>1</sup>AN = Agar Nutriente; R2A = medio R2A; R2A suplementado: R2A + 1% de macerado (10g de hoja en 25ml de agua destilada) esterilizado por filtración.

<sup>2</sup>Nd= no determinado.

En las tres variedades estudiadas se observó que el número de bacterias endófitas detectadas en tallo fue, al menos 10 veces superior al número de endófitas detectado en hoja (Cuadro 2). Sin embargo, la proporción de la distribución entre hoja y tallo parece depender de la variedad, encontrándose que la diferencia entre las poblaciones de hoja y tallo es mayor en la variedad El Paso 144 que en las variedades Olimar y Tacuarí (Cuadro 2). Se han reportado previamente diferencias de la misma magnitud entre las poblaciones de tallo y raíz de la variedad IR72 (Barraquío *et al.*, 1997). Los resultados obtenidos sugieren que habría una colonización preferencial en el tallo, probablemente favorecida por la mayor disponibilidad de nutrientes.

El análisis morfológico de las colonias predominantes aisladas en hoja y tallo de las variedades El Paso 144 y Olimar permitió discriminar 17 morfotipos diferentes, de los cuales sólo 6 eran comunes a las dos variedades (Cuadro 3) y sólo uno estaba presente en hoja y tallo de ambas variedades. Estos resultados sugieren que un alto porcentaje de las endófitas predominantes serían específicas de la variedad.

Para estas dos variedades se encontró que aunque hay morfotipos comunes a hoja y tallo, hay un alto porcentaje de morfotipos específicos de hoja o de tallo y una mayor diversidad en las bacterias endófitas aisladas de tallo (Cuadro 4).

**Cuadro 2.** Población de bacterias heterótrofas endófitas (UFC x 10<sup>4</sup> por gramo de peso seco) aisladas en abril 2005 de hojas y tallos de las variedades El Paso 144, Olimar y Tacuarí.

Variedad	Hoja		Tallo	
	AN <sup>1</sup>	R2A <sup>1</sup>	AN <sup>1</sup>	R2A <sup>1</sup>
El Paso 144	7,7	15	360	760
Olimar	2,5	2,3	24	62
Tacuarí	28	28	280	450

<sup>1</sup>AN = Agar Nutriente; R2A = medio R2A.

**Cuadro 3.** Morfotipos de endófitas predominantes aisladas de hoja y tallo de las variedades El Paso 144 y Olimar.

Variedad	Morfotipos
El Paso 144 <sup>1</sup>	4
Olimar <sup>1</sup>	7
El Paso 144 y Olimar <sup>2</sup>	6
Total	17

(<sup>1</sup>morfotipos detectados únicamente en esa variedad; <sup>2</sup>morfotipos detectados en ambas variedades).

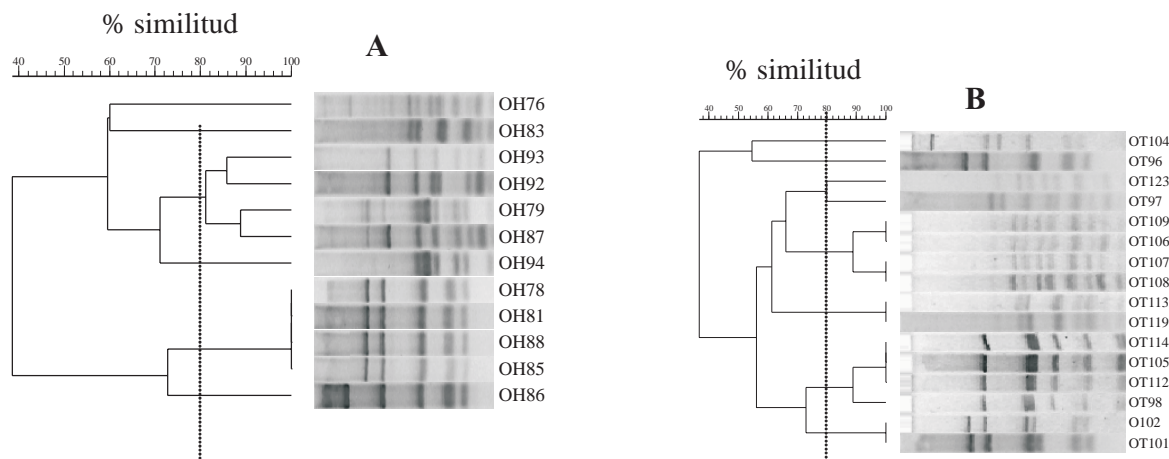
**Cuadro 4.** Comparación de morfotipos de endófitas aisladas de hoja y de tallo en las variedades El Paso 144 y Olimar.

	El Paso 144	Olimar
Hoja	3	4
Tallo	5	7
Hoja y Tallo	2	2

### Análisis Genotípico

El análisis genotípico de las cepas aisladas de hoja y tallo de la variedad Olimar muestra que los perfiles de restricción del gen 16S rDNA son diferentes. El análisis de 12 colonias aisladas de hoja y de 16 colonias aisladas de tallo permite discriminar 6 y 7 perfiles de restricción diferentes, respectivamente (Figura 1A y 1B). Estos resultados coinciden con el análisis morfológico y revelan que la comunidad de bacterias endófitas cultivables es diversa y que su distribución en la planta es heterogénea.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo forman parte de los ensayos preliminares para abordar la caracterización molecular de la diversidad de bacterias endófitas en las plantas de arroz en Uruguay. Estos resultados muestran la complejidad de la comunidad de bacterias endófitas cultivables. Esta comunidad es diversa y numerosa, se distribuye heterogéneamente en la planta y su composición depende de la variedad del cultivo.



**Figura 1.** Perfiles de restricción del gen 16S rDNA obtenidos con las enzimas *HaeIII* y *HhaI* de las bacterias aisladas en la variedad Olimar a partir de hoja (A) y tallo (B). La línea punteada señala el 80% de similitud entre los perfiles analizados.

## AGRADECIMIENTOS

Este proyecto está financiado por el Programa de Desarrollo Tecnológico para Investigación Fundamental de la DINACYT (Proyecto 29/140). Se agradece la colaboración de todos los técnicos de la Estación de Paso de la Laguna (INIA Treinta y Tres), en especial de Enrique Deambrosi, por el asesoramiento técnico y la disposición, así como por el suministro de las plantas.

## BIBLIOGRAFÍA

- ADHIKARI, T.B., JOSEPH, C.M., YANG, G., PHILLIPS, D.A. & NELSON, L.M. 2001. Evaluation of bacteria isolated from rice for plant growth promotion and biological control of seedling disease of rice. *Can J Microbiol.* 47:916-24.
- BARRAQUIO, W. L., REVILLA, L. & LADHA, J. K. 1997. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. *Plant and Soil* 194: 15-24.
- ENGELHARD, M., HUREK, T. & REINHOLD-HUREK, B. 2000. Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* comparison with modern races. *Environ. Microbiol.* 2:131-141.
- FERNÁNDEZ, A., HUANG, S., SESTON, S., XING, J., HICKEY, R., CRIDDLE, C. & TIEDJE, J. 1999. How stable is stable: Function versus community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3697-3704.
- FERRANDO, L., TARLERA, S., MENES, J., FERRANDO, L. & FERNÁNDEZ, A. 2001. "Impact assessment of an irrigated rice-cropping system on the floodwater bacterial community structure in a wetland area in Uruguay" International Symposium on Microbial Ecology, Amsterdam, August 2001.
- HALLMANN, J., QUADT-HALLMANN, A., MAHAFFEE, W.F. & KLOPPER, J.W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43: 895-914.
- HUREK, T., HANDLEY, L., REINHOLD-HUREK, B. & PICHÉ, Y. 2002. *Azoarcus* grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. *Mol. Plant- Microb Interact.* 15: 233-242.
- KRECHEL, A., FAUPEL, A., HALLMANN, J., ULRICH, A. & BERG, G. 2002. Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. *Can J Microbiol.* 48:772-786.
- PUNSCHKE, K., CARLOMAGNO, M., & LABANDERA, C. 2003. Agronomic potential of nitrogen fixing endophytic bacteria of rice. In: Proceedings 3<sup>d</sup> International Temperate Rice Conference 10-13 March 2003. Punta del Este, Uruguay.
- REINHOLD-HUREK, B. & HUREK, T. 1998. Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends in Microbiology.* Vol 6, N°4, 139-144.
- SHARMA, V. K. & NOVAK, J. 1998. Enhancement of verticillium wilt resistance in tomato transplants by *in vitro* co-culture of seedlings with a plant growth promoting rhizobacterium (*Pseudomonas* sp. strain PsJN). *Can. J. Microbiol.* 44: 528-536.
- STOLTZFUS, J., SO, R., MALARVITHI, P., LADHA, J. & DE BRUIJN, F. 1997. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. *Plant and Soil* 194:25-36.
- STURZ, A.V., CHRISTIE, B.R., MATHESON, B.G., ARSENAULT, W.J. & BUCHANAN, N.A. 1999. Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. *Plant Pathol.* 48: 360-369.
- TAN, Z., HUREK, T. & REINHOLD-HUREK, B. 2003. Effect of N-fertilization, plant genotype and environmental conditions on *nifH* gene pools in roots of rice. *Environm. Microbiol.* 5: 1009-1015.
- UNIDAD EXPERIMENTAL PASO DE LA LAGUNA, PROGRAMA ARROZ. Día de Campo Arroz, 17 de marzo 2005, INIA Treinta y Tres, Estación Experimental del Este.
- VERMA, S., LADHA, J. & TRIPATHI, A. 2001. Evaluation of plant growth promoting and ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J. Biotechnol.* 91:127-141.
- WILHELM, E., ARTHOFER, W. & SCHAFLEITNER, R. 1997. *Bacillus subtilis*, an endophyte of chestnut (*Castanea sativa*), as antagonist against chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*). In: A.C. Cassells (ed.), Pathogen and microbial contamination management in micropropagation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.