Caracterización de endófitos microsimbiontes aislados de leguminosas nativas de la Amazonía peruana

Characterization of micro symbionts endophytes isolate from native legumes of the Peruvian Amazon

Patricia Barrera Bardales¹, Becker Reyna Aspajo¹ y Álvaro Tresierra-Ayala²

Recibido: enero 2014 Aceptado: febrero 2014

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue caracterizar endófitos microsimbiontes aislados de tres macrosimbiontes de la familia Fabaceae: *Inga edulis* C. Mart., *Desmodium adscendens* (Sw.) D.C. y *Ormosia coccinea* (Aubl.) Jacks, procedentes de la Amazonía peruana. Estos microsimbiontes fueron identificados genotípicamente mediante la secuenciación de su ADN 16S. Empleando leguminosas hospederas similares a las de donde se les aisló, se determinaron su capacidad infectiva (CI) y efectiva (CE), en función del número de nódulos que formaban, así como por el peso seco de la planta cultivada sin fuente de nitrógeno combinado, respectivamente. Se reporta por primera vez a *Burkholderia* como microsimbionte de leguminosas nativas de la Amazonía peruana y estas pueden interactuar con diferentes especies de bacterias endófitas. Durante el periodo inicial de crecimiento, las plántulas poseen similar peso seco estando o no en presencia del microsimbionte.

Palabras claves: macrosimbionte, microsimbionte, endófito, leguminosa.

ABSTRACT

The aim of this study was to characterize micro symbionts endophytes isolate of three macro symbionts of Fabaceae family: *Inga edulis* C. Mart., *Desmodium adscendens* (Sw.) D.C. and *Ormosia coccinea* (Aubl.) Jacks, from the Peruvian Amazon. The micro symbionts were identified phenotypically by the 16S DNA sequencing. Using similar host legumes from they were isolate, their infectivity (IC) and effectivity (EC) capacity of the micro symbionts, were determined, according to the number of nodules (NN) and dry weight of the plant (DWP) grown without combined nitrogen source, respectively. This is the first report of *Burkholderia* as micro symbiont of native legumes of the Peruvian Amazon and these can be interrelated with different endophyte bacteria. During the initial period of growth, young plants have similar dry weight with or without the presence of the micro symbiont.

Key words: macro symbiont, micro symbiont, endophyte, legume.

INTRODUCCIÓN

La selva baja peruana representa actualmente para el Perú y el mundo una de las más ricas formaciones de vida de la Tierra; sin embargo, el conocimiento científico de su flora, fauna y ecología es insuficiente (Kalliola, 1998). En la Amazonía, son escasos los estudios a nivel microbiano realizados en países en desarrollo como el Perú, debido mayormente al costo que significa su realización. La fijación biológica del nitrógeno (diazotrofía), es un proceso muy antiguo y por lo general, ampliamente conocido. En el caso de los rizobios, el nitrógeno es fijado dentro de estructuras

¹Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP). Iquitos, Loreto, Perú.

²Departamento Académico de Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencias Biológicas. UNAP. Pevas 5ta. cuadra, Iquitos, Loreto, Perú. atresierraayala@hotmail.com

especializadas, los nódulos, que se desarrollan en la raíz o raramente en el tallo de las leguminosas.

Las leguminosas (actualmente familia Fabaceae) conforman un taxón muy grande y diverso de plantas con flores; constituyen la segunda familia en importancia alimenticia humana v animal. Son las únicas plantas superiores (macrosimbiontes) capaces de establecer asociaciones simbióticas con bacterias (microsimbiontes) del orden Rhizobiales. Dentro de este contexto, las especies del género Desmodium son herbáceas de uso medicinal, las especies del género Inga sirven como fuente de alimentación de un gran número de especies animales. El género Ormosia tiene una importancia económica considerable en el poblador amazónico debido al empleo de sus semillas en artesanías. Además, estos tres géneros ayudan a enriquecer con nitrógeno a los suelos en los cuales se desarrollan (Lloret y Romero, 2005). Los suelos amazónicos no son aptos para la práctica de una agricultura intensiva, es por esto que la simbiosis Rhizobium-leguminosa es una de las alternativas más promisorias para la agricultura de bajos insumos en regiones tropicales como subtropicales por la capacidad de fijar nitrógeno, contribuyendo con el balance de nutrientes en los diferentes ecosistemas (Hara y Oliveira, 2004).

Ante las características propias de los ecosistemas amazónicos, se planteó aislar endófitos simbióticos a partir de nódulos formados en las leguminosas nativas antes mencionadas, a fin de ser caracterizados mediante bioensayos de inoculación en plántulas. Es así que, el objetivo del presente estudio fue caracterizar endófitos simbióticos aislados de leguminosas nativas de la Amazonía peruana, determinando su capacidad infectiva y efectiva respecto de la fijación de nitrógeno.

MATERIAL Y MÉTODO

Plantas de Inga edulis, Desmodium adscendens y Ormosia coccinea fueron recolectadas en el km 31,5 de la carretera Iguitos-Nauta y en la comunidad bora de Padrecocha, río Nanay. Muestras de raíces con nódulos fueron colocadas en bolsas de plástico y transportadas al laboratorio dentro de una caja térmica. Para el aislamiento de los endófitos microsimbiontes se recolectaron los nódulos y se lavaron varias veces con agua destilada estéril, se desinfectó su superficie introduciéndolos durante 30 segundos en etanol al 70% y un minuto en HgCl, al 0,25%, luego se lavaron hasta 5 veces con agua destilada estéril. Los nódulos estériles fueron triturados empleando morteros estériles y la suspensión resultante fue sembrada en placas con agar YEM (extracto de levadura, manitol), las cuales se incubaron a 28 °C de 24 a 48 horas, obteniéndose de este modo cultivos puros de los microsimbiontes.

Posteriormente, las cepas fueron sembradas en 3 ml de caldo YEM para su identificación genotípica mediante el análisis de la secuencia de su ADN que codifica a su ARNr 16S (Lammel et al., 2007), para lo cual un gran fragmento de ADNr 16S de cada cepa fue amplificado por PCR empleando los oligonucleótidos 5' AGG AGG TGA TCC AAC CGC A 3' v 5' AAC TGG AGG AAG GTG GGG AT 3', preparándose una mezcla de 50 μ l de la reacción, incluyendo 5 a 10 ng de ADN, 1 μM de cada oligonucleótido, 1 U de Tag polimerasa y 100 μ M de dNTPs, entre otros. El producto de la PCR fue purificado y secuenciado. Posteriormente, se realizó un análisis empleando la base de datos EMBL/Gen Bank/DDBJ/PDB y el algoritmo BLAST (blastn), con la finalidad de establecer la identidad de las cepas. Múltiples alineamientos fueron realizados

con CLUSTALX y así, fue posible determinar el mayor grado de similaridad de las cepas de los microsimbiontes en estudio.

La infectividad de los microsimbiontes se determinó sobre la base de la capacidad de nodulación de las cepas frente a su respectiva planta hospedera (número de nódulos), mientras que la efectividad se determinó sobre la base del peso seco de su respectiva planta hospedera, para lo cual, trabajando por quintuplicado semillas de cada especie vegetal, fueron lavadas con agua destilada estéril y se les desinfectó empleando etanol al 96% durante 30 segundos y luego, con peróxido de hidrógeno al 15% durante 8 minutos; finalmente, fueron lavadas 5 a 6 veces con agua destilada estéril. Se expusieron en oscuridad a 28 °C hasta su germinación. Las semillas germinadas fueron colocadas en una maceta con vermiculita estéril e inoculadas con 1 ml de una suspensión de su respectivo microsimbionte (6,0 x 108 bact/ml, aproximadamente). Como control se emplearon semillas germinadas no inoculadas. Las macetas se colocaron en un ambiente abierto a fin de que estén expuestas bajo

condiciones climáticas naturales. En adelante, las macetas fueron regadas diariamente con una solución mineral descrita por Rigaud y Puppo (1975), constituida por macroelementos y microelementos, pero carente de nitrógeno combinado, a fin de asegurar que las plantas crezcan dependiendo de la capacidad fijadora de nitrógeno realizada por el microsimbionte. Las plantas fueron cosechadas según su especie (D. adscendens a los 50 días. I. edulis a los 70 días y O. coccinea a los 120 días) y se registraron los parámetros relacionados con la infectividad y efectividad del microsimbionte. En cuanto al análisis estadístico se empleó un análisis de varianza (Anova), mediante la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

RESULTADOS

Aislamiento e identificación de endófitos microsimbiontes de leguminosas nativas de la Amazonía peruana

Se aisló un total de 10 cepas bacterianas: 4 cepas a partir de *D. adscendens*, 4 cepas a partir de *I. edulis* y 2 cepas a partir de *O. coccinea*.

T II 3	_								/ 1							
Tabla I	. P	resencia	de e	especies	de	microsimbiontes	aislad	os d	e nodu	ilos d	e le	eauminosas	de	la	Amazonia r	peruana.

Leguminosa hospedera (macrosimbionte)	Procedencia	Especie de microsimbionte	Сера	
Desmodium adscendens	Km 31,5 lqNauta	Rhizobium sp.	Da-C1	
Desmodium adscendens	Km 31,5 lqNauta	Burkholderia sp.	Da-C2	
Desmodium adscendens	Km 31,5 lqNauta	Rhizobium sp.	Da-C3	
Desmodium adscendens	Km 31,5 lqNauta	Rhizobium sp.	Da-C4	
Inga edulis	Padrecocha	Rhizobium tropici	le-C1	
Inga edulis	Padrecocha	Rhizobium gallicum	le-C2	
Inga edulis	Km 31,5 lqNauta	Burkholderia sp.	le-C3	
Inga edulis	Km 31,5 lqNauta	Rhizobium sp.	le-C4	
Ormosia coccinea	Padrecocha	Burkholderia tropicalis	Oc-C1	
Ormosia coccinea	Padrecocha	Burkholderia mimosarum	Oc-C2	

Determinación de la infectividad y efectividad de endófitos microsimbiontes de plantas leguminosas nativas de la Amazonía peruana

Tabla 2. Capacidad infectiva (n.º de nódulos/planta) y efectiva (peso seco de planta) de microsimbiontes aislados de leguminosas nativas de la Amazonía peruana.

Macrosimbionte	Microsimbionte	Сера	Infectividad (n.º de nódulos por planta)	Efectividad (peso seco de planta)
Desmodium adscendens	Rhizobium sp.	Da-C1	2	0,0209
Desmodium adscendens	Burkholderia sp.	Da-C2	2	0,0089
Desmodium adscendens	Rhizobium sp.	Da-C3	Ĭ.	0,0210
Desmodium adscendens	Rhizobium sp.	Da-C4	2	0,0243
Planta control				0,0189
Inga edulis	Rhizobium tropici	le-C1	1	0,4954
Inga edulis	Rhizobium gallicum	le-C2	2	0,6796
Inga edulis	Burkholderia sp.	le-C3	1	1,2186
Inga edulis	Rhizobium sp.	le-C4	1	1,4333
Planta control				0,5410
Ormosia coccinea	Burkholderia tropicalis	Oc-C1	3	0,7155
Ormosia coccinea	Burkholderia mimosarum	Oc-C2	2	0,7824
Planta control				0,6584

DISCUSIÓN

El clima tropical que presenta nuestra Amazonía condiciona muchos de los procesos fisicoquímicos que se realizan dentro de esta. El presente estudio no estuvo ajeno a este condicionamiento, puesto que hasta donde fue posible se trató de dar al tratamiento y control de cada especie de leguminosa seleccionada, las condiciones ambientales óptimas para su normal desarrollo, evitando la incidencia directa de la luz solar y lluvia a través de la colocación de un techo de hojas de irapay, y moderando la humedad del sustrato a través de la aplicación de la solución nutritiva. Sin embargo, las condiciones ambientales que presenta la Amazonía (humedad, Iluvia, nubosidad, elevadas temperaturas),

posiblemente tuvieron influencia directa en los procesos que engloba el sistema simbiótico leguminosa-simbionte, tales como: infección, nodulación y fijación de nitrógeno. Al respecto, Acuña (1996) afirma que una buena inoculación puede resultar en un fracaso debido a la interferencia de factores ambientales en la formación de los nódulos.

Después de ubicar los macrosimbiontes en sus respectivos hábitats, se procedió a contar y seleccionar los nódulos viables empleados para aislar los microsimbiontes, teniendo como referencia los criterios considerados por Perticari (2005), quien afirma que el color rojizo de los nódulos es indicativo de la forma activa de la fijación biológica de nitrógeno (FBN), el color

blanco es indicativo de nódulos no fijadores (ineficientes) y el color verde es indicativo de paralización de la FBN y comienzo de la senescencia.

Para esterilizar y desinfectar los nódulos se uso agua destilada, etanol al 95% y HgCl₂ al 0,25%, tratando de eliminar de esta manera cualquier otro microorganismo presente alrededor del nódulo. El presente protocolo presentó algunas modificaciones respecto del empleado por Pandey et al. (2004), guienes utilizaron etanol al 70% y 0,1 de HgCl, para la esterilización de los nódulos. Para la selección de colonias puras se consideraron algunos aspectos: forma, color y apariencia de las colonias, propias del orden rizobial. El repicaje de las colonias características se hizo con la finalidad de eliminar cualquier tipo de contaminantes. para así obtener elevadas probabilidades visibles de cultivos puros, siguiendo las recomendaciones de Díaz y Souza (1985), quienes mantuvieron la pureza de sus cepas eliminando cualquier posible brote de contaminación, mediante el repicaje de las cepas en medios recién preparados hasta obtener el desarrollo libre de contaminantes. Las colonias aisladas en el presente estudio tuvieron un crecimiento rápido y todas eran pequeñas, translúcidas, circulares, blanquecinas y mucosas, resultados que coinciden con aquellos reportados por Holt et al. (1994), quienes mencionan que las bacterias del género Rhizobium presentan colonias circulares, convexas, semitranslúcidas, rizoides y mucilaginosas.

En la tabla 1 se muestran los nombres de los microsimbiontes luego de haber sido identificados molecularmente y llama la atención la presencia de dos especies de Burkholderia (B. tropicalis y B. mimosarum), asociadas con O. coccinea y dos cepas de Burkholderia sp. asociadas con D. adscendens e I. edulis. Este género bacteria-

no ha sido descrito como bacteria diazótrofa, pero, al parecer este constituiría el primer registro de Burkholderia como microsimbionte de plantas nativas de la Amazonía peruana. Por otro lado, un hecho a destacar es la "promiscuidad" mostrada por algunas plantas hospederas para ser infectadas por diversos microsimbiontes, tal es el caso de D. adscendens que puede desarrollar simbiosis con Rhizobium sp. y con Burkholderia sp., I. edulis que puede ser infectada por R. tropici, R. gallinarum, Rhizobium sp. y Burkholderia sp. y la especie O. coccinea que interacciona con B. tropicalis y B. mimosarum.

La infectividad está representada por los valores promedio del número de nódulos de la planta (NN). El bajo número de nódulos registrados en los bioensayos podría sustentarse en el hecho de que las condiciones a las cuales fueron expuestas en los ensayos, difieren mucho de las condiciones a las cuales fueron aisladas. Magalhães y Da Silva (1984), afirman que si una especie está pobremente nodulada o no está nodulada en determinada condición ambiental, no se debe considerar como incapaz de nodular hasta que su ausencia de nodulación sea confirmada en condiciones propicias para que esto ocurra. No obstante que el número de nódulos presentes en estas ha sido muy bajo (tabla 2), no se debe descartar a las cepas como eficaces o eficientes en el proceso de nodulación y fijación de nitrógeno. Magalhães y Da Silva (1984) así como Gomes y Franco (1984) refuerzan nuestras interpretaciones; así, los primeros mencionan que los factores edáficos pueden limitar el establecimiento o el desenvolvimiento de la simbiosis Rhizobiumleguminosa, y los segundos que el establecimiento y el desenvolvimiento de las diversas etapas de interacción Rhizobium-leguminosa dependen directa o indirectamente de las condiciones ambientales del suelo.

La efectividad está representada por los valores promedio de peso seco de la planta (PSP), unidades de comprobación de fijación de nitrógeno (FN), considerando un intervalo de confianza del 95%. Al comparar los valores de PSP de muchas de las plantas inoculadas con las cepas de sus respectivos microsimbiontes frente al valor promedio de su correspondiente planta control (no inoculada), no se encontró diferencias significativas, lo cual indica que durante el periodo inicial de crecimiento, las plántulas poseen la misma capacidad de FN con o sin la presencia de los microsimbiontes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña O. 1996. Manejo y tecnología de la fijación biológica de nitrógeno en leguminosas de importancia agrícola. Laboratorio de Microbiología de Suelos. Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica. X Congreso Nacional Agronómico/II Congreso de Suelos 89-94. Costa Rica. Pp. 89-94.
- Díaz B, Souza J. 1985. Aislamiento de bacterias nitrificantes de las especies del género *Rhizobium* de los nódulos de *Glycine max* (L) Merril (soya) y *Pueraria phaseoloides* Benth (kudzu tropical). Tesis para obtener el título profesional de biólogo. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Iquitos, Perú.
- Gomes G, Franco A. 1984. Seleção de estirpes de *Rhizobium* spp. de leguminosas florestais em meio de cultura tolerantes ã acidez e ã toxidez do Al. En: Pesquisa Agropecuaria Brasileira. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria vinculada ao Ministerio da Agricultura. (EMBRA-PA). Edición especial. Vol. 19: 169-173.
- Hara FA, Oliveira IA. 2004. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de

- rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. Acta Amazónica 34: 343-357.
- Holt JH, Krieg NR, Sneath PH, Staley JT, Williams ST. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore. Williams and Wilkins, 787 pp.
- Kalliola R. 1998. Amazonía peruana: Vegetación húmeda tropical en el llano subandino. Proyecto Amazonía. Oficina Nacional de Evaluación de Recursos Naturales. Turku, Finlandia/Lima, Perú.
- Lammel DR, Brancalion PH, Dias CT, Nogueira EJ. 2007. Rhizobia and other legume nodule bacteria richness in Brazilian *Araucaria angustifolia* forest. Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.), 64: 400-408.
- Lloret I, Romero E. 2005. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. Rev. Latinoam. Microbiol. 47: 43-60.
- Magalhães I, Da Silva M. 1984. Associações *Rhizobium*-Leguminosas no estado de Rondônia. En: Pesquisa Agropecuaria Brasileira. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria vinculada ao Ministerio da Agricultura. (EMBRAPA). Edición especial. Vol. 19: 7-17.
- Pandey P, Kang S, Maheshwari M. 2004. Isolation of endophytic plant growth promoting *Burkholderia* sp. MSSP from root nodules of *Mimosa pudica*. Department of Botany and Microbiology, Gurukul Kangri University, Current Science, 89: 177-180.
- Perticari A. 2005. Uso de biofertilizantes: Inoculación y fijación biológica de nitrógeno en cultivos de soja. Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola. Buenos Aires, Argentina, 13 pp.

Rigaud C, Puppo M. 1975. Efecto de la salinidad sobre la fijación de N y la asimilación en Vicia faba. En:

www.jxb.oxfordjournal.org/cgi/content/abstract/45/10/1483