

OBTENCIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS A PARTIR DEL TOMATILLO PARA SU UTILIZACIÓN COMO PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL

Ignacio Enrique Plaza Avellan¹, José Andrés Intriago Quintana¹, Ángel Guzmán Cedeño^{1,2}, Diego Efrén Zambrano Pazmiño^{1,3}

¹Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí "Manuel Félix López", 10 de agosto N°82 y Granada Centeno. Calceta, Manabí, Ecuador; aguzman@espam.edu.ec,

²Facultad Ciencias Agropecuarias de la Universidad Laica "Eloy Alfaro" de Manabí. Ciudadela universitaria vía San Mateo. Manta, Manabí, Ecuador.

³Instituto de Posgrado de la Universidad Técnica del Norte. Ciudadela universitaria Av. 17 de julio, barrio el Olivo. Ibarra-Ecuador.

Resumen

El objetivo de este estudio fue obtener bacterias endófitas a partir del tomatillo (*Lycopersicon pimpinelifolium*) que sean promotoras de crecimiento vegetal para lo cual se realizó el asilamiento bacteriano en el cantón Bolívar-Calceta-Manabí en las zonas de arrastradero y platanales, en donde se recolectaron cinco plantas en cada sitio de muestreo para luego realizar el protocolo de desinfección de las plantas y de los explantes cortados por raíces y tallos. Para comprobar el protocolo de desinfección se sembraron los explantes sobre agar nutritivo dejándolos en incubación durante 24 horas a 37°C. Los tallos y raíces se trituraron en un mortero de porcelana con solución Cloruro de sodio (NaCl al 0,85%) para la liberación de microorganismos endófitos, seguidamente se le adicionó caldo nutritivo y se incubaron a 37°C durante dos horas para permitir el crecimiento de los microorganismos endófitos. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas hasta 10⁻⁶ en agua peptona estéril y se sembró 100 µL en agar nutritivo. La siembra realizada en placas se incubó durante 24 horas a 37°C. Las unidades formadoras de colonia (UFC) se seleccionaron por la forma, el borde, el color y la elevación. También se realizó la prueba de catalasa y la tinción de Gram para la caracterización de los aislados bacterianos. Como resultados se obtuvieron bacterias endófitas en estado puro con un total de 17 *Cocos*, cuatro *Cocobacilos*, dos *Cocos pequeños* y dos *Bacilos*. Concluyendo que el protocolo de desinfección aplicada a las plantas y a los explantes ha permitido obtener bacterias endófitas puras.

Palabras clave

Lycopersicon pimpinelifolium, Bacterias endófitas, *Cocobacilos*, *Bacilos*

INTRODUCCIÓN

Para incrementar la producción de alimentos se ha recurrido a la denominada “Agricultura intensiva”, este modelo de agricultura se caracteriza por un alto consumo de los insumos, laboreo excesivo del suelo, baja o nula incorporación de materia orgánica, monocultivos, y la falta de biodiversidad en el suelo lo cual provoca bajos rendimientos en los cultivos (INTAGRI, 2013). Una práctica muy común dentro de la agricultura intensiva es el uso de fertilizantes de síntesis química, para asegurar el desarrollo de las plantas cultivadas, estos aportan sustancias químicas que actúan como reguladores del crecimiento (mediante un mecanismo hormonal) y como nutrientes. Sin embargo, el alto suministro de estos insumos a los cultivos provoca la degradación del suelo, lo cual se ha convertido en un riesgo por su repercusión en la baja producción de los cultivos (Malfanova, 2013).

En Latinoamérica la pérdida de biodiversidad se la atribuye a la transformación y la sobreexplotación de hábitats y ecosistemas naturales, la deforestación, los incendios forestales, la actividad agrícola, el cambio climático, la contaminación, la introducción de especies invasivas, la urbanización, la minería, la destrucción de humedales y zonas de páramo, la erosión, los desastres naturales, el desconocimiento del potencial estratégico de la biodiversidad, la débil capacidad institucional para reducir el impacto de las actividades que generan pérdida de biodiversidad, y la expansión de la frontera agropecuaria (Andrade, 2011).

Por otra parte, Ecuador ha sido víctima de la biopiratería por parte de científicos, empresas y países que hace décadas han sustraído información genética de la flora y fauna del país, con lo cual han creado productos que se aprovechan en el mundo, no así las ganancias y menos el conocimiento (El Telégrafo, 2016). Entre las aplicaciones biotecnológicas desarrolladas a partir de organismos autóctonos están los biofertilizantes a base de bacterias promotoras de crecimiento PGPR, que, aplicados al suelo o planta, son una alternativa ecológica para la producción de cultivos agrícolas, reduciendo la

aplicación de fertilizantes sintéticos y de agroquímicos que deterioran el ambiente (Espinosa, 2016).

Según Tester y Langridge, (2010) para esto se debe incrementar y mejorar la calidad de los alimentos producidos, pero sin afectar el medio ambiente y con un ingreso reducido de hormonas químicas y fertilizante a los sistemas de producción. Esta intención ha generado un creciente interés por el uso de microorganismos como alternativas sostenibles y económicas frente a los agroquímicos (Malfanova, 2013). Por lo tanto, la selección de microorganismos endófitos como promotores de crecimiento juegan un papel importante en la planta, ya que al asociarse con ellas les permiten: por una parte, aumentar su crecimiento y desarrollo y, por otra, las protegen contra otros organismos del suelo que causan enfermedades (Del puerto *et al.*, 2014).

Actualmente la eliminación de hábitats naturales es la principal causa de la pérdida de biodiversidad y de sus múltiples beneficios que podrían aportar para la salud pública. En este sentido, la Constitución del Ecuador del 2008 declara de interés público la preservación del ambiente, la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad y la integridad del patrimonio genético del país, la prevención del daño ambiental y la recuperación de los espacios naturales degradados. Así mismo, el protocolo de Nagoya reconoce la importancia de los recursos genéticos para la seguridad alimentaria, la salud pública, la conservación de la diversidad biológica, la mitigación del cambio climático y la adaptación a este (Ministerio del Ambiente de Ecuador e Instituto Ecuatoriano de la Propiedad Intelectual, 2018).

El objetivo principal es la Obtención de bacterias endófitas a partir del tomatillo (*Lycopersicon pinpinellifolium* L.) que sean promotoras de crecimiento vegetal en donde se han identificado géneros de bacterias que se vienen aplicando en sistemas de producción orgánicos con resultados satisfactorio, esto se entiende a Sánchez *et al.* (2012) que ha validado que las BPCV representa una alternativa limpia y segura para asegurar la producción en la agricultura sostenible teniendo en cuenta que disminuiría el impacto sobre el medio ambiente al reducir el uso excesivo de fertilizantes de síntesis química.

MATERIALES Y MÉTODOS

- **UBICACIÓN**

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio de Biología Molecular de la carrera de Medicina Veterinaria de la ESPAM MFL (Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López”), ubicada en el sitio El Limón, del cantón Bolívar, de la provincia de Manabí, situada a una altitud de 15 msnm y geográficamente entre las coordenadas 00°49'23" Latitud Sur, 80°11'01" Longitud Oeste¹.

- **OBTENCIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS**

- **AISLAMIENTO BACTERIANO**

Se recolectaron 5 plantas de diferentes lugares en el cantón Bolívar. Los tallos y raíces se lavaron con agua destilada previamente esterilizada. La desinfección se realizó superficialmente, para esto se colocaron los tallos y las raíces en alcohol al 70% durante 5 minutos, luego se colocaron en hipoclorito de sodio (2,5%) durante 8 minutos, seguidamente en etanol durante 5 minutos y posteriormente se realizaron tres enjuagues en agua destilada estéril, de acuerdo a lo recomendado por Araujo *et al.* (2002).

Para comprobar el protocolo de desinfección se sembraron raíces y tallos sobre agar nutritivo dejando en incubación durante 24 horas a 37°C. Los tallos y raíces se trituraron en un mortero de porcelana adicionando cloruro de sodio (NaCl al 0,85%). Posteriormente se centrifugaron a 6000 rpm durante 5 minutos, seguidamente se incubaron a 37°C durante 2 horas para permitir la liberación de microorganismos endófitos (Técnica recomendada por Araujo *et al.*, 2002).

¹ Datos tomados en la estación meteorológica del INANMI, situada en la ESPAM MFL correspondiente al periodo; Enero 2011 febrero 2019.

A partir de la solución madre se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-6} en agua peptona estéril y se sembró 100 μL en agar nutritivo. La siembra realizada en placas se incubó durante 24 horas a 37°C . Las unidades formadoras de colonia (UFC) se seleccionaron por la forma, el borde, el color y la elevación (Araujo *et al.*, 2002).

- **CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS**

- **TINCIÓN DE GRAM**

Se colocó una gota de agua destilada en un porta objetos, luego con el asa de platino se tomó parte de una colonia y se la mezcló con el agua. Posteriormente se realizó la fijación por calor. A partir de la fijación realizada se adicionó cristal violeta, dejándola reaccionar por un minuto, se eliminó el exceso con agua destilada levemente para añadirle Lugol durante un minuto, posteriormente se adicionó alcohol-acetona durante 30 segundos, se lavó con agua y se añadió safranina durante un minuto para luego eliminar el exceso con agua destilada, secando finalmente la muestra al aire. Se observaron al microscopio características tales como el tipo de tinción y morfología (Mora y García, 2007).

- **PRUEBA DE CATALASA**

Para esta prueba se tomó un portaobjeto y se depositó un inóculo de las bacterias a examinar; posteriormente sobre éstas se colocó una gota de agua oxigenada. Tomándose como reacción positiva cuando presentaron liberación de burbujas. Márquez, (2007) menciona que generalmente esta prueba es positiva para el género *Bacilos*.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

En el aislamiento bacteriano correspondiente al cantón Bolívar parroquia Calceta se obtuvieron bacterias endófitas de tallos y raíces con un total de 17 Cocos, cuatro Cocobacilos, dos Cocos pequeños y dos Bacilos (*Bacillus* sp.) (cuadro 1).

Cuadro 1. Caracterización de bacterias endófitas en el cantón Bolívar.

Códigos	Forma microscópica	Tinción de Gram	Prueba de catalasa	Estado
P2 CA (R-8)	Coco	Positivo	Positivo	Puro
* P2 CA (1 R-8)	Coco	Positivo	Positivo	Puro
P2 CA (2 R-8)	Coco	Positivo	Positivo	Puro
P2 CA (R-7)	Coco	Positivo	Positivo	Puro
P2 CA (1 R-7)	Coco	Positivo	Positivo	Puro
P2 CA (2 R-7)	Coco	Positivo	Positivo	Puro
P2 CA (1 R-5)	Coco	Positivo	Positivo	Puro
P2 CA (2 R-5)	Coco	Positivo	Negativo	Puro
P3 CA (T-7)	Coco	Positivo	Positivo	Puro
P3 CA (1 T-7)	Coco	Positivo	Positivo	Puro
P3 CA (2 T-7)	Cocobacilos	Positivo	Positivo	Puro
P3 CA (5 T-7)	Cocobacilos	Positivo	Positivo	Puro
P3 CA (1 T-8)	Coco pequeño	Positivo	Positivo	Puro
P3 CA (T-8)	Coco	Negativo	Positivo	Puro
P3 CA (2 T-8)	Bacilos mediana	Positivo	Positivo	Puro
P3 CA (3 T-8)	Bacilos mediana	Positivo	Positivo	Puro
P3 CA (1 T-8)	Coco pequeño	Positivo	Positivo	Puro
P3 CA (T-8)	Coco	Negativo	Positivo	Puro
P4 CA (1 R-5)	Cocobacilos	Positivo	Positivo	Puro
P4 CA (R-5)	Cocobacilos	Positivo	Positivo	Puro
P4 CA (2 R-5)	Coco	Positivo	Positivo	Puro
P4 CA (4 R-5)	Coco	Positivo	Positivo	Puro
P4 CA (3 R-5)	Coco	Positivo	Positivo	Puro
P5 CA (1 T-5)	Coco	Positivo	Positivo	Puro
P5 CA (T-5)	Coco	Positivo	Positivo	Puro

Descripción de los códigos

- P= Planta
- CA= Calceta
- R= Raíz
- T= Tallo

De acuerdo a este estudio la abundancia de bacterias endófitas fue diferente en cada uno de los sitios de muestreo en las plantas de tomatillo, lo cual puede deberse a que en cada sitio de muestreo las variables ambientales y físico-químicas del suelo fueron diferentes, teniendo una fuerte influencia en la cantidad y composición de bacterias endófitas de las plantas (Andrew *et al.*, 2012 citado por Pérez, 2017).

Lamb *et al.* (1996) citado por Pérez *et al.* (2010) señalan que las mayores densidades poblacionales de bacterias endófitas nativas o introducidas, son normalmente observadas en la raíz y en la parte inferior del tallo, presentándose decrecimiento del tallo hasta la hoja.

En cuanto a las pruebas realizadas para la caracterización como la Tinción de Gram y la prueba de catalasa, se encontró que la mayoría de las bacterias endófitas fueron positivas, observándose distintas formas y tamaños (*Cocos*, *Cocos pequeños*, *Cocobacilos*, *Bacilos medianos*), similar a lo reportado por Pérez *et al.*, (2010) quienes obtuvieron el 81,08 % de *bacilos cortos*, el 16,22 % *bacilos largos* y el 2,70 % *cocobacilos*. En la respuesta a la catalasa y tinción diferencial de Gram el 70,27 % fueron positivos mientras que el resto (29,73 %) Gram negativos.

CONCLUSIÓN

El protocolo de desinfección aplicada a las plantas y explantes ha permitido obtener bacterias endófitas de diferentes géneros (*Cocos*, *Cocobacilos* y *Bacilos*) y en lo referente a la caracterización mediante la tinción de Gram y la prueba de catalasa el 70,27 % de los aislados bacterianos fueron positivos.

BIBLIOGRAFÍAS

- Andrade, M. 2011. Estado del conocimiento de la biodiversidad en Colombia y sus amenazas. Consideraciones para fortalecer la interacción ciencia-política. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 35(137), 491-507
- Araujo, W., Marcon, J., Maccheroni, W., Vani, J., Van Elsas, JD., Van Vuurde, J., y Azevedo, J. 2002. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (10), 4906-4914.
- Del puerto, G., Gonzales, A., López, A., Ortiz, C., y Pinaso, D. 2014. Microorganismos promotores de crecimiento vegetal. (En línea). Consultado el 07 de enero 2019. Formato PDF. Disponible en: https://www.academia.edu/12081541/Microorganismos_promotores_de_crecimiento_vegetal
- El Telégrafo. 2016. En 11 países se tramitan 120 patentes con recursos genéticos sustraídos de Ecuador. (En línea). Consultado el 30 de octubre 2018. Formato PDF. Disponible en: <https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/sociedad/6/en-11-paises-se-tramitan-120-patentes-con-recursos-geneticos-sustraidos-de-ecuador>
- Espinosa, B. 2016. Inoculación de *Rhizobacteria* promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo condiciones de invernadero. (En línea). Consultado el 07 de enero 2019. Formato PDF. Disponible en: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/42382/BERNARDO%20ESPINOSA%20PALOMEQUE.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- INTAGRI. (Instituto para la Innovación Tecnológica en la Agricultura). 2013. Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal. Serie Nutrición Vegetal. Núm. 13. Artículos Técnicos de INTAGRI. México. 2.
- Malfanova, N. 2013. Endophytic bacteria with plant growth promoting and biocontrol abilities. Tesis Doctor. 167.
- Ministerio del Ambiente de Ecuador e Instituto Ecuatoriano de la Propiedad Intelectual. 2018. Protocolo de Nagoya sobre acceso a los recursos genéticos y participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de su utilización al convenio sobre la diversidad biológica. 1 ed. Quito-Ecuador.
- Mora, N y García, A. 2007. *Supervivencia de a diferentes temperaturas*. Tesis. Lcdo. En química de alimentos. UAEH. Pachuca, MEX. p 61.
- Pérez, A; Rojas, J y Fuentes, J. 2010. Diversidad de bacterias endófitas asociadas a raíces del pasto colosuana (*Bothriochloa pertusa*) en tres

localidades del departamento de sucre, Colombia. Sucre, CO. Acta Biología Colombiana. Vol 15. p 7.

- Pérez, E. 2017. Micropropagación y Biotización de Jojoba (*Simmondsia chinensis* L.) mediante bacterias endófitas promotoras de crecimiento vegetal. Tesis. Doctora en ciencias. CIB (Centro de investigaciones biológicas). La Paz, Baja california sur. MEX. p 64.
- Pérez, F., Capull, R., Alvarado, R., Diaz, B y Torres, R. 2010. Aislamiento y caracterización morfológica de bacterias endófitas en sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). Revista Centro Agrícola 37(3), 2010, p 61-66.
- Sánchez, B., Gómez, M., Garrido, F., y Bonilla, R. 2012. Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. Revista mexicana de ciencias agrícolas, 3(7), 1401-1415
- Tester, M., y Langridge, P. 2010. Breeding Technologies to Increase Crop Production in a Changing World. Science, 327(5967), 818–822.

