



CARACTERIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LAS COMUNIDADES DE BACTERIAS ENDÓFITAS ESTABLECIDAS EN TEJIDOS VEGETATIVOS DE DOS ESPECIES DEL GÉNERO *Oryza* spp. (*O. sativa* y *O. glumaepatula*), MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR – DGGE BASADA EN LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN 16S rARN

Rodrigo Castro Panqueva

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SANTIAGO DE CALI
2013

CARACTERIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LAS COMUNIDADES DE
BACTERIAS ENDÓFITAS ESTABLECIDAS EN TEJIDOS VEGETATIVOS DE
DOS ESPECIES DEL GÉNERO *Oryza* spp. (*O. sativa* y *O. glumaepatula*)
MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR – DGGE BASADA EN LA AMPLIFICACIÓN
DEL GEN 16S rARN

Proyecto de Grado

Rodrigo Castro Panqueva

Tutora:
Thaura Ghneim Herrera
Profesora Tiempo Completo
Fisiología Vegetal

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SANTIAGO DE CALI
2013

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	7
ABSTRACT	9
1. INTRODUCCIÓN	10
2. PROBLEMA A TRATAR	12
3. MARCO DE REFERENCIA	13
3.1 ANTECEDENTES	13
3.2. MARCO TEÓRICO	14
3.2.1 DEFINICIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS	14
3.2.2 IMPORTANCIA DE LAS BACTERIAS ENDOFITICAS EN ESPECIES VEGETALES	15
3.2.3 BACTERIAS ENDÓFITAS AISLADAS EN ESPECIES DE ARROZ.....	16
3.2.4 HERRAMIENTAS PARA CARACTERIZAR LA ESTRUCTURA DE COMUNIDADES BACTERIANAS.....	18
3.2.4.1 Metodologías Microbiológicas	18
3.2.4.2 Metodologías Moleculares	19
3.2.4.3 Electroforesis de geles en gradiente de desnaturalización (DGGE).....	19
3.2.4.4 Gen 16S rARN.....	20
4. OBJETIVOS	22
4.1 GENERAL	22
4.2 ESPECÍFICOS	22
5. METODOLOGÍA	23
6. RESULTADOS	32
7. DISCUSIÓN	39
8. CONCLUSIONES	43
9. RECOMENDACIONES	44
10. BIBLIOGRAFÍA	45
11. ANEXOS	53

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Géneros de bacterias endófitas aisladas en especies del género <i>Oryza</i>	17
Tabla 2. Condiciones de PCR para la amplificación del gen 16S rARN con los cebadores 518F-939R.	30
Tabla 3. Condiciones de PCR para la amplificación del gen 16S rARN con los cebadores 518FGC-939R.	30
Tabla 4. Cebadores específicos para la amplificación del gen 16S rARN empleados en estudios previos con la técnica DGGE.	32
Tabla 5. Cebadores empleados para la amplificación del gen 16S en estudios de comunidades bacterianas basados en la técnica de DGGE.	33
Tabla 6. Número de cepas bacterias obtenidas utilizando el método microbiológico y el método de enriquecimiento bacteriano.	34
Tabla 7. Morfotipos bacterianos aislados a partir de tallos y hojas de los genotipos estudiados.	35
Tabla 8. Abundancia bacteriana en tejido de <i>O. glumaepatula</i> , IR64 y Nipponbare.	35

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa molecular de 9 regiones hipervariables y regiones conservadas presentes en el gen 16S rARN.....	21
Figura 2. Mapa de distribución de la especie <i>Oryza glumaepatula</i> Steud.....	23
Figura 3. Mapa de distribución de la especie cultivada <i>Oryza sativa</i>	24
Figura 4. Esquema de actividades para el aislamiento de bacterias endófitas cultivables y no cultivables	25
Figura 5. Herramienta Primer BLAST empleada para comprobar la especificidad de pares de cebadores para la amplificación de genes de interés	29
Figura 6. Comprobación de la esterilidad de los tejidos, después de 48 horas de incubación a 30°C y agitación constante (180 rpm).....	34
Figura 7. Amplificación del gen 16S rARN empleando los cebadores 518F-939R.	36
Figura 8. Amplificación del gen 16S rARN empleando los cebadores 518FGC-939R.	36
Figura 9. Extracción de ADN a partir de tejido.	37
Figura 10. Electroforesis de geles en gradiente de desnaturalización (DGGE) empleando cepas bacterianas a partir de semilla e identificadas previamente mediante secuenciación.	38
Figura 11. Screenshot del programa ClustalW para determinar el grado de polimorfismo de las secuencias empleadas que amplifican las regiones V4 y V5 del gen 16S rARN.	42

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Caracterización macroscópica de los 23 morfotipos aislados empleando el método convencional y el método de enriquecimiento bacteriano..... 52

Anexo 2. Muestra de cálculo para determinar la abundancia de bacterias empleando el índice de Unidades Formadoras de Colonia por gramo de tejido (UFC/g). 56

RESUMEN

Las bacterias endófitas son organismos que colonizan el interior de los tejidos de plantas, sin generar daño. Estos organismos participan en diferentes procesos como fijación biológica de nitrógeno, producción de fitohormonas, y resistencia frente a la actividad de organismos patógenos; entre otros, lo que las convierten en una alternativa novedosa para el mejoramiento de las variedades de cultivo. El objetivo de este proyecto fue realizar un análisis comparativo de la estructura de las comunidades bacterianas presentes en tejidos vegetativos (hojas y tallos) de un genotipo de *Oryza glumaepatula* (Accesión # 243) y dos accesiones de *Oryza sativa* (IR64 y Nipponbare) empleando la técnica de DGGE basada en la amplificación de un fragmento hipervariable del gen 16S rARN.

Se emplearon dos metodologías para la evaluación de las comunidades bacterianas: 1) El método microbiológico clásico que permite aislar bacterias cultivables, y 2) Extracción directa de ADN bacteriano. En ambos casos, se incluyó, en el proceso, el método de enriquecimiento bacteriano, a fin de aumentar la abundancia de las cepas bacterianas.

Un total de 23 cepas bacterianas diferentes se obtuvieron mediante el método microbiológico. De éstos, 10 morfotipos fueron aislados de los tejidos de IR64, 6 de Nipponbare y 7 de *O. glumaepatula*. El número de cepas aisladas en cada tejido difirió para cada uno de los genotipos de arroz evaluados. En el caso de IR64 se encontró un mayor número de morfotipos y una mayor abundancia en los tallos. Para Nipponbare, se reconoció el mismo número de morfotipos en tallos y hojas pero una abundancia mayor en los tallos. Para *O. glumaepatula*, el número de morfotipos fue mayor en las hojas, aunque se observó similar abundancia en ambos tejidos. Se ha reportado mayor abundancia de bacterias endófitas presentes en la especie cultivada *O. sativa* comparada con especies silvestres de arroz.

Se realizó la extracción de las fracciones aisladas de bacterias endófitas cultivables y no cultivables, y se logró extraer ADN exitosamente. De la fracción directa a partir de tejido no fue exitosa la extracción. Para los 23 morfotipos aislados, se extrajo el ADN y se amplificó un fragmento del gen 16S rARN, correspondiente a las regiones hipervariables V4 y V5, empleando los cebadores 518FGC-939R. Los fragmentos amplificados se sometieron a separación mediante DGGE empleando un gradiente de 50 – 70% de agentes denaturantes. A pesar de la correcta amplificación en cada muestra analizada, no se logró establecer si los morfotipos representan componentes diferentes de la comunidad.

Se requiere la optimización de las condiciones de DGGE, o alternativamente, realizar la identificación molecular de los componentes de las comunidades

bacterianas mediante secuenciación, a fin de establecer si existen diferencias en las comunidades de endófitos entre *O. sativa* y *O. glumaepatula*.

Palabras Claves: Bacterias endófitas, DGGE, 16S rARN, Enriquecimiento bacteriano, *Oryza*.

ABSTRACT

Endophytic bacteria are organisms, which colonize the inside of plant tissues without causing harm. These microorganisms are involved in different processes such as biological nitrogen fixation, phytohormone production and resistance to the activity of pathogenic organisms, thus making them a novel alternative for the improvement of crop varieties. The objective of this project was to carry out a comparative analysis of the structure of bacterial communities present in vegetative tissues (leaves and stems) of a genotype *Oryza glumaepatula* (# 243) and two accessions of *Oryza sativa* (IR64 and Nipponbare) using the DGGE technique based on the amplification of a hypervariable fragment of the 16S rRNA gene.

Two methodologies were used for the assessment of bacterial communities: 1) The classical microbiological method to isolate culturable bacteria, and 2) Direct extraction of bacterial DNA. In both cases, the bacterial enrichment method was included in the process in order to increase the abundance of bacterial strains.

A total of 23 different morphotypes were obtained by the microbiological method. Of these, 10 morphotypes were isolated from the tissues of IR64, 6 from Nipponbare and 7 from *O. glumaepatula*. The number of strains isolated from each tissue differed for each tested rice genotypes. In the case of IR64, the morphotypes found were more abundant in stems. For Nipponbare, the same number of morphotypes were recognized in stems and leaves but greater abundance stems. For *O. glumaepatula*, morphotypes number was higher in leaves, although we observed similar abundance in both tissues.

DNA Extraction was performed for fractions of isolated endophytic bacteria culturable and non-culturable, and it was achieved successfully. Direct fraction from tissue extraction was unsuccessful. For the 23 morphotypes isolated, the DNA was extracted and a fragment of 16S rRNA gene corresponding to the hypervariable regions V4 and V5 was amplified using the primers 518FGC-939R. The amplified fragments were subjected to separation by DGGE using a gradient of 50-70% of denaturing agents. Despite the correct amplification in each sample, it was not possible to establish whether the morphotypes represent different components of the community. Thus, it is not possible to reach a conclusion regarding the diversity of endophytic bacteria communities established in *O. glumaepatula* and *O. sativa* tissues.

Requires optimization DGGE conditions and alternatively perform molecular identification.

Keywords: Endophytic bacteria, DGGE, 16S rRNA, Bacterial enrichment, *Oryza*.

1. INTRODUCCIÓN

Las especies silvestres del género *Oryza* representan una fuente novedosa de características de interés agronómico (tolerancia al estrés abiótico, resistencia a enfermedades, etc.) para el mejoramiento de las variedades de la especie cultivada *O. sativa*. Este proyecto busca caracterizar y establecer los perfiles moleculares de las comunidades de bacterias endófitas presentes en tejidos de los genotipos de *O. glumaepatula* y *O. sativa*; y así, identificar bacterias capaces de participar en funciones importantes en la planta.

La “revolución verde” adoptada a nivel mundial en la década de los 60, fomentó la adopción de genotipos vegetales con alta capacidad de respuesta a los fertilizantes químicos, específicamente al nitrógeno (Boddey et al., 1995). La selección de nuevas variedades estuvo dirigida por los criterios de rendimiento bajo condiciones de fertilización en detrimento de otros caracteres, como la capacidad de utilizar nitrógeno atmosférico mediante asociación con bacterias diazotróficas. La productividad de los cultivos depende del tipo de suelo, la humedad, la luminosidad y la disponibilidad de nutrientes que están presentes en el medio ambiente. Uno de los factores para la producción de altos rendimientos de cultivos de arroz es la utilización de fertilizantes que suplen nitrógeno y fósforo, entre otros elementos. Los sistemas de cultivos que requieren grandes cantidades de fertilizantes químicos nitrogenados se consideran sistemas no sostenibles debido a que utilizan recursos no renovables, y pueden producir altos niveles de contaminación ambiental (Stoltzfuz et al., 1997).

Las bacterias endófitas son organismos que se encuentran al interior de los tejidos vegetales, y que no les generan ningún daño (Hallman et al., 1997). Estos microorganismos cumplen diversas funciones como producción de fitohormonas, que promueven el crecimiento y desarrollo vegetal; y ofrecen mecanismos de defensa frente a la acción de organismos patógenos, por ejemplo, la producción de sideróforos (Spaepen et al., 2007; Hernández et al., 2004). Es por esto que las bacterias endófitas se convierten en una alternativa interesante para promover la productividad a nivel mundial, reduciendo el impacto negativo del uso de agroquímicos.

Las metodologías microbiológicas han apoyado los estudios de composición y caracterización de las comunidades de endófitos, permitiendo aislar especies de bacterias a partir de medios de cultivo específicos. El uso de medios de cultivo presenta ciertas limitaciones. Diversas especies no pueden crecer bajo estas condiciones de cultivo y estos necesitan ser suplementados con nutrientes específicos para su crecimiento (Rodríguez, 1982). Los avances en el área de la biología molecular han generado herramientas que facilitan la identificación de los organismos, tanto a nivel molecular como genético (Castillo, 2005) y que permiten superar la limitación de las técnicas microbiológicas.

De las herramientas moleculares, la técnica de PCR-DGGE se ha usado para explorar la diversidad genética de las comunidades bacterianas (Muyzer et al., 1995). Esta técnica permite la separación de fragmentos de ADN de igual tamaño pero con diferencias en la secuencia de nucleótidos (Jackson et al., 2000), permitiendo variaciones en la migración de la matriz de gel. Esta metodología proporciona una aproximación inicial de la composición bacteriana de una muestra compleja, tanto de microorganismos cultivables como no cultivables.

La diversidad de especies encontrada en muestras complejas es la base fundamental de la biodiversidad a nivel superior. La diversidad genética surge en el ámbito molecular y está ligada a las características de los ácidos nucleicos (Moreno, 2001). Para comprender los cambios de la biodiversidad a nivel de comunidades, es importante realizar la separación entre la diversidad tipo alfa y beta; correspondientes a los cambios de una comunidad en particular y los cambios entre varias comunidades, respectivamente (Whittaker, 1972).

Este proyecto busca validar la técnica de PCR-DGGE, con el fin de caracterizar la estructura de las comunidades bacterianas endófitas establecidas en tejidos vegetativos de la especie silvestre *O. glumaepatula* y la especie cultivada *O. sativa*. Así mismo, busca calcular los índices de riqueza y diversidad de comunidades bacterianas establecidas en sus tejidos.

2. PROBLEMA A TRATAR

La creciente demanda sobre la producción de arroz a nivel mundial exige aumentar la eficiencia de la producción de este cereal y a la vez, reducir los costos y los efectos ambientales negativos asociados a las prácticas de cultivo, particularmente en lo referente al uso de agroquímicos y fertilizantes (FAO, 2004).

La diversidad y riqueza de las comunidades bacterianas endófitas es potencialmente mayor en especies silvestres de arroz (Mano & Morisaki, 2008). Los microorganismos endófitos a través de las interacciones benéficas que establecen con las plantas (mediante la capacidad de sintetizar reguladores de crecimiento vegetal, proveer resistencia frente a la actividad de organismos patógenos y de fijar nitrógeno atmosférico, entre otros) (Taiz & Zeiger, 2010), representan una alternativa para reducir los costos de producción y el impacto negativo del uso de fertilizantes químicos.

Con el fin de establecer la estructura de las comunidades de bacterias endófitas establecidas en tejidos vegetativos de dos especies del género *Oryza*, en este proyecto empleamos la técnica de PCR-DGGE basada en la amplificación de un fragmento hipervariable del gen 16S rARN. Esta técnica molecular permite caracterizar comunidades bacterianas y establecer el número de especies bacterianas distintas presentes en los tejidos vegetales, independientemente de que éstas sean o no cultivables.

Los resultados obtenidos durante esta investigación permitirán establecer si existen diferencias en la composición de las comunidades de bacterias endófitas presentes en tejidos vegetativos (tallos y hojas) de dos especies del género *Oryza*. El estudio se realizó empleando la accesión #243 de la especie silvestre *O. glumaepatula* Steud. colectada en su hábitat natural en la región de los Llanos Venezolanos y dos variedades de *O. sativa* (IR-64 y Nipponbare) provenientes del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, por sus siglas en español).

3. MARCO DE REFERENCIA

3.1 ANTECEDENTES

Las comunidades de bacterias endofíticas, definidas como aquellos organismos que habitan al interior de los tejidos de diversas especies vegetales sin causar daños, cumplen roles importantes para el crecimiento y desarrollo de la planta (Mano & Morisaki, 2008). Mediante técnicas microbiológicas y moleculares, se han logrado aislar diversas especies de bacterias diazotróficas a partir de tejidos de especies silvestres de arroz, por ejemplo *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Ideonella dechloratans*, *Enterobacter cancerogenus*, *Azospirillum lipoferum* y *Azospirillum brasilense* (Elbeltagy et al., 2001). El aislamiento de bacterias con efectos benéficos sobre la planta, representa una alternativa para promover el crecimiento y desarrollo vegetal (Peng et al., 2009).

Algunas especies como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azoarcus* spp., *Herbaspirillum seropedicae*, se encuentran prevalentemente en raíces y tallos de algunas gramíneas. Se ha establecido que la transferencia de nitrógeno fijado, por parte de estas comunidades microbianas, varía entre 1,5% y 21% en ecosistemas con pH neutro, el cual, facilita el crecimiento de dichos microorganismos. La especie *Rhizobium leguminosarum* puede colonizar raíces de arroz y aportar entre el 25 – 33% del nitrógeno, normalmente suministrado con fertilizantes (Naher et al., 2009). Específicamente, se han aislado bacterias endofíticas de especies del género *Oryza* spp.; entre ellas se encuentran *Methylobacterium* del vástago, *Azospirillum* y *Herbaspirillum* de los tallos y raíces, y *Burkholderia* y *Rhizobium* de las raíces de plantas de arroz (Mano & Morisaki, 2008). En la especie silvestre *Oryza latifolia* se identificó la especie *Enterobacter oryzae* en tejidos vegetativos, en su aporte de la fijación de nitrógeno atmosférico a especies del género *Oryza* sp. (Peng et al., 2009).

Se ha establecido que algunas comunidades microbianas participan en la producción de fitohormonas que alteran la arquitectura del sistema radicular de las plantas, aumentando la superficie extendida de las raíces, lo cual resulta en una mayor absorción de los nutrientes disponibles en el medio (Díaz et al., 2012). En la mayoría de especies vegetales, las bacterias endofíticas colonizan a nivel local, o de modo sistémico en un entorno dinámico con intervención de diversos factores dependientes de las características del suelo, la interacción con microorganismos, el genotipo vegetal y el tipo de tejido de la planta (Hallman et al., 1997). Algunas especies de bacterias como *Agrobacterium tumefaciens* y *Pseudomonas syringae* pueden sintetizar auxinas que promueven el crecimiento vegetal, y reducir la actividad de organismos patógenos (Spaepen et al., 2007).

Estudios realizados en especies de gramíneas, han demostrado el establecimiento de ricas comunidades de bacterias endofíticas en los tejidos vegetales. Se han encontrado valores de tamaños poblacionales de 10^4 - 10^6 para tallos de la especie *Zizaniopsis villanensis*; y 10^3 - 10^7 para raíces de diferentes genotipos del género *Oryza*. Otras especies de gramíneas como *Potamophila pariflora* y *Rhynchoryza subulata* presentaron altos niveles de poblaciones bacterianas endofíticas (Barranquio et al., 1997).

Tradicionalmente, las técnicas microbiológicas han sido utilizadas para la caracterización de comunidades bacterianas. Sin embargo, éstas presentan limitaciones; entre ellas, la dificultad de aislar cepas altamente puras en medios de cultivo (Rodríguez, 1982). Otras especies de bacterias no pueden ser cultivadas con las formulaciones de medio disponibles actualmente. Por esto, ha sido necesaria la implementación de nuevas metodologías basadas en el análisis genético-molecular para caracterizar las comunidades de interés.

Existe una variedad de técnicas moleculares que permiten caracterizar las comunidades de bacterias y establecer los perfiles genéticos de dichas comunidades, como la meta-genómica y la técnica PCR-DGGE. La técnica PCR-DGGE basada en la amplificación de genes específicos (*nifH*, *rpoβ* y 16S rRNA), revela diferencias entre comunidades microbianas complejas, permitiendo calcular el índice de riqueza y diversidad. Esta técnica ha sido empleada, mayoritariamente, para conocer la composición de la rizósfera; así mismo, en estudios efectuados en gramíneas ha permitido establecer la existencia de diferencias en la estructura de comunidades bacterianas en muestras de pastos y calcular índices de diversidad y riqueza (McCaig et al., 2001).

3.2. MARCO TEÓRICO

3.2.1 DEFINICIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS

Las bacterias endofíticas son microorganismos que cumplen una función ecológica importante en asociación con otros organismos. La definición de bacterias endofíticas ha sido objeto de discusión por mucho tiempo, y sometida a varias modificaciones gracias a los avances de la investigación (Mano & Morisaki, 2008). En la actualidad, una bacteria endofita es definida como un organismo extraído desde el interior de los tejidos, y que no causa efectos perjudiciales visibles en las especies vegetales (Hallman et al., 1997). Entre estos organismos se pueden encontrar endofitos simbiotes, que establecen una relación mutualista con la planta; y los endofitos neutrales, que únicamente colonizan los tejidos de la planta. Generalmente, los patógenos no son considerados endofitos (Mano & Morisaki, 2008).

Las bacterias endófitas habitan en el ambiente externo y entran a la planta a través de estomas, lenticelas, heridas, áreas de emergencia de raíces laterales y radículas germinadas (Rosenblueth & Martínez, 2006). La colonización en los tejidos se presenta en raíces, hojas, tallos, semillas o dentro de nódulos (Benhizia et al., 2004).

El aislamiento de bacterias endófitas ha permitido conocer algunos aportes importantes que le proporcionan a la planta hospedera como la promoción del crecimiento y desarrollo vegetal (Azevedo et al., 2000), inducción de la resistencia frente al ataque de patógenos (de Matos et al., 2001), y proveer nitrógeno por medio de la fijación biológica de nitrógeno (Mano & Morisaki, 2008; Taiz & Zeiger, 2010).

3.2.2 IMPORTANCIA DE LAS BACTERIAS ENDOFÍTICAS EN ESPECIES VEGETALES

Las bacterias endofíticas han atraído el interés en las últimas décadas debido a los efectos positivos que ejercen sobre el crecimiento y la productividad vegetal (Rosenblueth & Martínez, 2006). Estos efectos están relacionados con la capacidad de diversas especies bacterianas de producir sustancias promotoras del crecimiento vegetal o inhibidoras de la acción de patógenos, así como con la capacidad para fijar nitrógeno atmosférico y transferirlo a la planta hospedera (Choudhury & Kennedy, 2004).

La asociación entre bacterias fijadoras de nitrógeno y las plantas es un evento común en la naturaleza. De esta relación, las plantas pueden utilizar el nitrógeno fijado por parte de la microbiota simbiótica para su crecimiento y desarrollo (Peng et al., 2006). Se han identificado bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, entre las cuales se pueden encontrar anaeróbicas facultativas, aeróbicas estrictas y fotosintéticas; y bacterias asociadas a los tejidos de especies vegetales, encontrándose en la filósfera, el sistema radicular o en el tallo (Mayz, 2004). Algunas de ellas dependen de las condiciones de humedad, materia orgánica y oxígeno disponible; mientras que otras son predominantes bajo condiciones anóxicas (Choudhury & Kennedy, 2004). Algunas especies de bacterias endófitas de los géneros *Azotobacter*, *Clostridium*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum* y *Burkholderia* pueden suplir la demanda de nitrógeno por medio de la fijación biológica de nitrógeno, facilitando el crecimiento y desarrollo vegetal (Choudhury & Kennedy, 2004).

Existen otras funciones importantes de las comunidades bacterianas como la producción de reguladores de crecimiento que promueven el desarrollo vegetal. Las auxinas (IAA) y las giberilinas, por ejemplo, son sintetizadas por las plantas (Taiz & Zeiger, 2010), pero también las bacterias son capaces de sintetizar estos compuestos (Costacurta & Vanderleyden, 1995). En la biosíntesis de las auxinas, se han encontrado diferentes intermediarios que facilitan su

producción. Por ejemplo, el triptofano ha sido encontrado como el principal precursor de la biosíntesis de IAA en bacteria (Spaepen et al., 2007). De las diversas cascadas biosintéticas de auxinas, se han identificado genes, como *iaaM* y *iaaH*, que participan en la síntesis de precursores para la formación de IAA y han sido caracterizados de especies de bacterias, como *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae* y *Pantoea agglomerans* (Morris, 1995). En plantas, se puede encontrar auxinas conjugadas, que cumplen funciones de transporte, almacenaje y protección de la degradación enzimática; también, estas formas conjugadas permiten controlar los niveles de IAA bajo un equilibrio homeostático (Spaepen et al., 2007; Seidel et al., 2006). Las auxinas también median diversas respuestas celulares como expansión, división y diferenciación celular; así como la regulación génica. En la interacción planta-bacteria, los microorganismos utilizan esta fitohormona como una estrategia de colonización de los tejidos de la planta (Ryu & Patten, 2008; Spaepen et al., 2007).

Las comunidades de bacterias confieren resistencia a enfermedades a través de la producción y liberación de sideróforos, los cuales son compuestos quelantes que secuestran iones Fe^{3+} del medio, y en consecuencia inhiben el crecimiento de agentes patógenos (Hernández et al., 2004). Los sideróforos, también, facilitan la asociación planta-bacteria, y contribuyen a la colonización en raíces, tallos y hojas (Compant et al., 2005). Algunas bacterias endófitas como *Enterobacter cloacae* (Saleh & Glick, 2001) y *Pseudomonas putida* (Kojic et al., 1999) generan una cascada de señalización mediada por proteínas para facilitar la producción de sideróforos.

3.2.3 BACTERIAS ENDÓFITAS AISLADAS EN ESPECIES DE ARROZ

Las especies del género *Oryza* representan una fuente importante para el aislamiento de bacterias endófitas, y la evaluación de su potencial de transferencia a las variedades de arroz cultivado (Adesemoye & Kloepper, 2009). La domesticación de la especie cultivada *O. sativa* ha provocado la pérdida de características de interés agronómico, que aún permanecen presentes en las especies silvestres de arroz. Es por esto, que la diversidad de bacterias endófitas es menor en variedades de cultivo que especies silvestres de arroz (Mano & Morisaki, 2008).

La densidad poblacional de bacterias endófitas en tejidos vegetales de arroz es relativamente baja comparada con la abundancia de bacterias presentes en la rizosfera o los patógenos (Hallman et al., 1997). En algunos estudios de aislamiento de bacterias endófitas, se ha reportado la ausencia de comunidades bacterianas, posiblemente generada por la limitación de aislar o cultivar dichos microorganismos en condiciones *in vitro* (Hallman et al., 1997;

Miyamoto et al., 2004). Hasta el momento, se han aislado una variedad de endófitos a partir de la especie cultivada *Oryza sativa* (Tabla 1).

Tabla 1. Géneros de bacterias endófitas aisladas en especies del género *Oryza*.

Tejido Vegetal	Géneros de Endófitos	Referencia
Semillas	<i>Acidovorax</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Curtobacterium</i> sp., <i>Klebsiella</i> sp., <i>Methylobacterium</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., <i>Paenibacillus</i> sp., <i>Pantoea</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Ochrobactrum</i> sp., <i>Sphingomonas</i> sp., <i>Xanthomonas</i> sp.	Elbeltagy et al., 2000; Mano et al., 2006; Okunishi et al., 2005; Verma et al., 2001
Hojas	<i>Aurantimonas</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Curtobacterium</i> sp., <i>Diaphorobacter</i> sp., <i>Methylobacterium</i> sp., <i>Pantoea</i> sp., <i>Sphingomonas</i> sp., <i>Stenotrophomonas</i> sp., <i>Streptomyces</i> sp.	Mano et al., 2007
Tallos	<i>Agrobacterium</i> sp., <i>Azospirillum</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Ideonella</i> sp., <i>Methylobacterium</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp.	Elbeltagy et al., 2000; Elbeltagy et al., 2001; Stoltzfuz et al., 1997
Raíces	<i>Azoarcus</i> sp., <i>Azorhizobium</i> sp., <i>Azospirillum</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Bradyrhizobium</i> sp., <i>Brevibacillus</i> sp., <i>Burkholderia</i> sp., <i>Caulobacter</i> sp., <i>Chryseobacterium</i> sp., <i>Enterobacter</i> sp., <i>Herbaspirillum</i> sp., <i>Hyphomicrobium</i> sp., <i>Klebsiella</i> sp., <i>Methylocapsa</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Paenibacillus</i> sp., <i>Rhizobium</i> sp., <i>Roseateles</i> sp., <i>Sphingomonas</i> sp.	Baldani et al., 1996; Engelhard et al., 2000; Mano et al., 2007; Singh et al., 2006; Yanni et al., 1997

Hasta el momento, se han aislado una variedad de géneros a partir de tejidos vegetativos de especies silvestres de arroz. En algunas de estas, como *O. alta* y *O. meridionalis* se han aislado comunidades pertenecientes a los géneros *Pantoea*, *Herbaspirillum* y *Methylobacterium*, a partir de semillas. A partir de una gama de especies silvestres, como *O. alta*, *O. barthii*, *O. brachyantha*, *O. glandiglumis*, *O. longiglumis*, *O. minuta*, *O. officinalis*, *O. rufipogon*; se han aislado y caracterizado comunidades bacterianas como *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Ideonella dechloratans*, *Enterobacter cancerogenus*, *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense*, *Methylobacterium* sp, *Rhodopseudomonas* sp, y *Sphingomonas* sp.; todas a

partir de tallos (Elbeltagy et al., 2001). De otras especies silvestres de arroz como *O. granulata*, *O. nivara* y *O. officinalis*, se han aislados comunidades de otros géneros como *Klebsiella*, *Azoarcus* y *Gallionella*, a partir de raíces (Mano & Morisaki, 2008). Para la especie silvestre *O. latifolia*, se ha logrado aislar la especie *Enterobacter oryzae*, la cual, participa en la fijación biológica de nitrógeno (Peng et al., 2009).

La caracterización de bacterias endofíticas asociadas a tejidos de plantas, como el arroz, permitiría conocer la estructura de dichas comunidades y las interacciones que se establecen entre distintas especies de bacterias y plantas, para facilitar diversos procesos biológicos (crecimiento y desarrollo, fijación biológica de nitrógeno, entre otros), bajo la influencia de cambios ambientales (Boon et al., 2002).

3.2.4 HERRAMIENTAS PARA CARACTERIZAR LA ESTRUCTURA DE COMUNIDADES BACTERIANAS

Existe una gama de metodologías bioquímicas, morfológicas y fisiológicas que permiten la caracterización de las comunidades de bacterias endofíticas presentes en los tejidos de especies vegetales. Todas estas técnicas presentan ventajas y limitaciones que afectan la identificación de las especies bacterianas. Estas metodologías se categorizan en dos grupos principales: microbiológicas y moleculares; y pueden ser empleadas de manera complementaria para asegurar la caracterización y manipulación de las bacterias endofíticas de interés.

3.2.4.1 Metodologías Microbiológicas

Las metodologías microbiológicas han apoyado considerablemente los estudios de composición y caracterización de las comunidades de endófitos, permitiendo aislar especies de bacterias a partir de medios de cultivo específicos. No obstante, el uso de medios de cultivo presenta ciertas limitaciones al momento de realizar la caracterización; debido a que diversas especies no pueden crecer bajo estas condiciones de cultivo y deben suplementarse los cultivos con nutrientes específicos para su crecimiento. Es por esto, que estas técnicas logran detectar menos del 1% de la diversidad de las comunidades bacterianas (Rodríguez, 1982).

Para identificar las bacterias aisladas se emplean diversas metodologías microbiológicas, entre las que se encuentran el uso de coloraciones que utilizan reactivos químicos, y permiten caracterizar las bacterias de acuerdo a su reacción (tinción) y a su morfología. Otros métodos de tipo bioquímico identifican la capacidad de la bacteria de sobrevivir en un medio específico. Algunos ejemplos de la gran gama de pruebas empleadas para identificar y

caracterizar bacterias son la emisión de fluorescencia en agar King B (KB), la activación de citocromo oxidasa, el uso de agar triple azúcar-hierro (TSI) y la prueba de oxidación-fermentación (O-F) (Botero et al., 2008).

3.2.4.2 Metodologías Moleculares

Los avances en el área de la biología molecular han generado herramientas que permiten identificar a nivel molecular y genético a los organismos. La metagenómica consiste en la aplicación de tecnologías de secuenciación e identificación de genes y proteínas a microorganismos no cultivables (Castillo, 2005). Algunos ecosistemas como suelos agrícolas, acuáticos, forestales, entre otros, han sido de interés en la aplicación para la investigación de metagenomas de organismos microbianos. Se ha propuesto que entre 80-90% de los microorganismos presentes en el suelo son desconocidos, lo cual, constituye una limitación para descubrir la verdadera composición de estos sistemas biológicos. Es muy probable que gran parte de esta diversidad sea no cultivable; por lo que, una pequeña proporción puede ser reproducida en condiciones de laboratorio (Hernández et al., 2010).

Otra técnica para la caracterización de microorganismos es la PCR – DGGE, basada en la desnaturalización de cadenas de doble hélice del ADN a cadenas sencillas empleando un gradiente químico y de temperatura. La utilidad de esta técnica en el análisis de comunidades bacterianas se basa en la existencia de variación en las secuencias que migran a diferentes posiciones en los geles de acrilamida/bisacrilamida, separando las secuencias con base en su comportamiento de fusión. Se demuestra que el 95% de las diferencias individuales de las secuencias se detectan por este método (Jackson et al., 2000).

3.2.4.3 Electroforesis de geles en gradiente de desnaturalización (DGGE)

La técnica de DGGE es un método importante para el estudio de la estructura de las comunidades bacterianas asociadas a tejidos de muchas especies vegetales. Esta técnica permite conocer la estructura de estas comunidades microbianas. Esta herramienta molecular tiene un gran potencial para identificar bacterias no cultivables, a partir del análisis de secuencias con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), la cual, permite la amplificación de regiones variables que codifican el gen 16S rARN mediante el uso de cebadores conservados. Esta técnica se emplea dependiendo de la secuencia del ADN, ya que esto afecta las condiciones de desnaturalización. La discriminación de las secuencias no se realiza por tamaño de los fragmentos, sino por la diferencia que presentan a nivel de bases, detectándose en el gradiente de desnaturalización (Jackson et al., 2000).

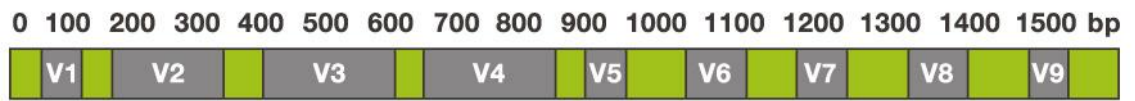
Los fragmentos de ADN de doble cadena presentan dominios de fusión, conocidos como T_m, compuestos de 25 a cientos de pares de bases en su longitud. Algunos fragmentos, que van de 100 a 1000 bp presentan entre 2 a 5 dominios de fusión y los T_m's se encuentran entre 65°C a 80°C, los cuales, depende de dos aspectos básicos: 1) su contenido de GC presente en la secuencia, y 2) las interacciones entre bases adyacentes en la misma cadena de ADN que estabilizan la doble hélice y contribuyen con más energía que los puentes de hidrógenos, presentes en las bases. Al presentarse un cambio de una (1) base, se alteran drásticamente las interacciones de apilamiento y puede cambiar la temperatura de fusión en 1°C, alterando el patrón de migración de las bandas a través de la matriz del gel (Myers et al., 1988).

Existen algunas limitaciones referentes a la técnica; por ejemplo, la relación ADN bacteria/planta no debe ser equivalente para obtener una correcta amplificación; también, las poblaciones microbianas cambian constantemente, de acuerdo al medio donde se encuentren. La utilización de la técnica DGGE proporciona una aproximación inicial para la comparación de comunidades bacterianas de una muestra compleja. Si los patrones de bandas obtenidos difieren claramente, las comunidades son distintas. De esta forma, se puede conocer la estructura de las comunidades bacterianas. Otra limitación está en la similitud de las bandas en los geles de poliacrilimida, obligando a emplear un análisis más riguroso para diferenciar dichas comunidades, como secuenciación (Abrams & Stanton, 1992).

3.2.4.4 Gen 16S rARN

La clasificación de los organismos se ha basado en las similitudes detectadas a nivel morfológicas, principalmente. Pero, con microorganismos, esta clasificación no hace ver ninguna correlación posible entre todas las especies (Lane et al., 1985). Se han empleado diversas herramientas moleculares que emplean genes con regiones conservadas (*16S rRNA*, *nifH*, *rpcβ*), con el fin de conocer la distancia filogenética entre las especies.

El gen 16S rARN ha sido empleado en estudios de filogenia bacteriana y taxonomía por su función conservada, lo que sugiere que los cambios en la secuencia son una medida más exacta de tiempo (Janda & Abbott, 2007). Es una cadena conformada por 9 regiones hipervariables (V1 – V9), de 1.520 nucleótidos en total, aproximadamente; codificado por el gen *rrs* (Figura 1). Esta molécula procede de subunidades pequeñas de los ribosomas, conocidas como rRNA SSU (Schmalenberger et al., 2001). El análisis de la secuencia del gen 16S rRNA reveló que existen algunos fragmentos, conocidos como oligonucleótidos firma, los cuales se tratan de secuencias cortas que están presentes, únicamente en un grupo característico de especie (Rodicio & Mendoza, 2004).



CONSERVED REGIONS: unspecific applications

VARIABLE REGIONS: group or species-specific applications

Figura 1. Mapa molecular de 9 regiones hipervariables y regiones conservadas presentes en el gen 16S rARN. Imagen tomada de <http://www.alimetrics.net/>

4. OBJETIVOS

4.1 GENERAL

Caracterizar la estructura de las comunidades bacterianas endófitas establecidas en los tejidos vegetativos de dos especies del género *Oryza* (*O. sativa*, y *O. glumaepatula*), mediante la técnica de PCR-DGGE basada en amplificación del gen *16S rARN*.

4.2 ESPECÍFICOS

- 4.2.1 Validar el uso de la técnica de PCR-DGGE, basada en la amplificación de Un fragmento del gen *16S rARN*, para la caracterización de la estructura de comunidades bacterianas endófitas.
- 4.2.2 Caracterizar la estructura de las comunidades bacterianas endófitas establecidas en tejidos vegetativos de dos especies del género *Oryza* (*O. sativa* y *O. glumaepatula*), a partir de los datos obtenidos mediante la técnica de PCR-DGGE.
- 4.2.3 Determinar el índice de diversidad y riqueza de especies en las comunidades de bacterias endófitas analizadas mediante la técnica de PCR-DGGE.

5 METODOLOGÍA

1. Material vegetal de estudio

La especie silvestre *Oryza glumaepatula* Steud es endémica de regiones en Sudamérica. Las accesiones evaluadas en este estudio fueron colectadas en los Llanos Venezolanos y hacen parte de la colección de especies silvestres de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Icesi.

Oryza glumaepatula Steud. es una especie distribuida a lo largo de Centroamérica y Sudamérica (Figura 2). Es una planta perenne y cespitosa, con un tamaño de 70 – 120 cm, aproximadamente; presenta panículas abiertas y espigas de 6.6 – 11 mm de largo y 1.9 – 2.5 mm de ancho. Sus aristas tienen un tamaño de 6 – 15 cm de largo, y anteras de 2 – 5 mm de largo, las cuales, ocupan una $\frac{3}{4}$ partes de las espiguillas. Sus hojas son planas, de 15 – 30 cm. Se puede encontrar en pantanos y marismas, o en zanjas abiertas, próximas a ríos o campos de arroz cultivado, generalmente con aguas profundas.



Figura 2. Mapa de distribución de la especie *Oryza glumaepatula* Steud. Imagen tomada de Rice Knowledge Bank, 2009.

Oryza sativa es una especie anual, con altura y forma variable. Es una hierba erecta, con una altura de 80 – 120 cm, aproximadamente. El tallo es liso, hueco y erecto. Sus hojas son planas, de 15 – 30 cm de largo. La espiguilla es de 7 mm de largo, y la panícula puede estar completamente erecta o poco erguida. Esta especie se distribuye al Sur y sudeste de Asia, y en el continente americano, principalmente (Figura 3).



Figura 3. Mapa de distribución de la especie de arroz cultivada *Oryza sativa*. Imagen tomada Ricemap.org, 2007

2. Condiciones de crecimiento.

Las plantas se mantuvieron bajo condiciones semi-controladas de crecimiento en el laboratorio con fotoperiodo de 12 horas luz/oscuridad con radiación fotosintéticamente activa (PAR) de $250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y una temperatura de 27 – 30°C.

3. Estadíos de desarrollo.

Se utilizaron dos plantas en estadio de desarrollo juvenil de la accesión #243 de la especie silvestre (*O. glumaepatula* Steud), provenientes del material recolectado en los llanos venezolanos y sembrado en macetas utilizando suelo estéril proveniente del CIAT, en el laboratorio de investigación de Fisiología Vegetal, de la Universidad Icesi. Para las variedades de cultivo (IR64 y Nipponbare) de la especie cultivada (*O. sativa*), se utilizaron 2 plantas de cada una en estadios de desarrollo adulto, provenientes del Centro de Investigación de Agricultura Tropical (CIAT, por sus siglas en español).

4. Esterilización de tejidos (tallos y hojas) de las accesiones de *O. glumaepatula* y *O. sativa*.

Se empleó un protocolo estandarizado en el laboratorio de investigación de Fisiología Vegetal de la Universidad Icesi, bajo condiciones controladas de asepsia, utilizando una cabina de bioseguridad. Se trabajó con tallos y hojas de la accesión de la especie silvestre *O. glumaepatula*, y las variedades IR64 y Nipponbare para la especie cultivada *O. sativa*.

Primero, se seccionaron segmentos de tallos y hojas entre 10 – 12 cm de largo. Estos se colocaron individualmente en tubos Falcon con 15 mL de agua destilada estéril, durante 3 minutos con agitación constante. Se emplearon 2

soluciones desinfectantes para la eliminación de organismos en la superficie de los tejidos (alcohol etílico al 70% e hipoclorito de sodio al 1%). Los segmentos se sumergieron en un tubo con 15 mL de cada solución por separado, 3 minutos para etanol al 70% y 5 minutos de hipoclorito de sodio al 1% para las hojas y 10 minutos para los tallos. Finalmente, se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril durante 1 minuto.

5. Control de Esterilidad.

El control de esterilidad se realizó para corroborar la correcta esterilización de los tejidos utilizados y la eliminación de organismos epifitos. Para ello, se incubaron los segmentos de tejido en un tubo de ensayo con 10 mL de Caldo Nutritivo (Difco™ Nutrient Broth, Ref 234000, Lot 9202321) y se agitaron durante 48 horas, a 30°C y 180 rpm. Luego de la incubación, se observó si existía turbidez en el caldo, que representa la presencia de algún tipo de contaminación. Los segmentos estériles se seleccionaron para realizar el aislamiento de bacterias endófitas cultivables y no-cultivables.

6. Aislamiento de bacterias endófitas cultivables y no – cultivables.

El aislamiento de bacterias endófitas se llevó a cabo empleando dos metodologías: Un método clásico convencional y el método de enriquecimiento bacteriano. En la figura 4, se presenta el esquema de las actividades realizadas para el aislamiento de bacterias endófitas.

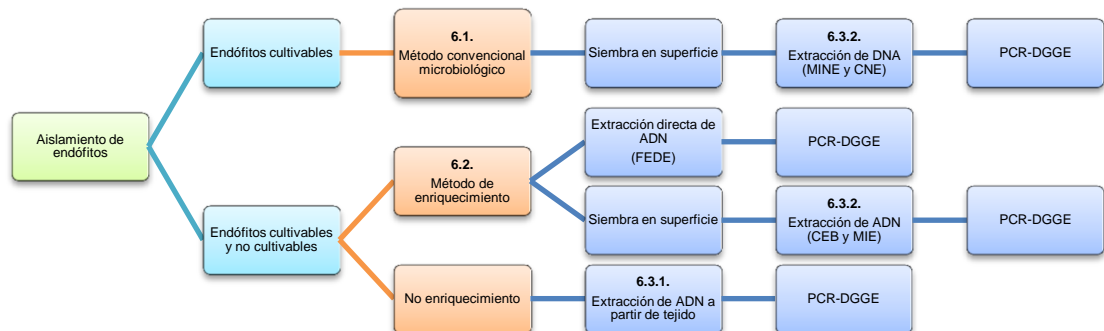


Figura 4. Esquema de actividades para el aislamiento de bacterias endófitas cultivables y no cultivables.

6.1. Método convencional microbiológico

Para el aislamiento de bacterias endófitas, se utilizó la mitad del tejido estéril, para todas las accesiones evaluadas. El tejido se maceró empleando nitrógeno líquido y se realizaron diluciones en base 10 (10^{-1} – 10^{-6}) en 10 mL de caldo nutritivo. Luego se tomó 100 μ L del inóculo y se realizó siembra en superficie utilizando agar nutritivo, por duplicado. Las cajas se incubaron durante 48 horas a 30°C. Una de las cajas, se empleó para hacer extracción de ADN de

bacterias endófitas cultivables, y la otra se utilizó para aislar colonias, caracterizarlas macro y microscópicamente y construir el banco de bacterias endófitas del proyecto. Los morfotipos individuales obtenidos mediante cultivo utilizando el método convencional se denominarán en lo sucesivo MINE (morfotipos individuales no enriquecidos). Cada morfotipo fue aislado y cultivado para la extracción individual de ADN. Adicionalmente, a partir del extracto original, se realizaron lavados de todas las colonias de bacterias con agua destilada estéril. Estas muestras se denominarán en lo sucesivo CNE (consorcio no enriquecido).

6.2. Método de enriquecimiento bacteriano

Para realizar el aislamiento de bacterias cultivables y no-cultivables, se estandarizó el protocolo de enriquecimiento bacteriano, propuesto por Ikeda, 2009. Primero, se realizó la maceración del tejido. El protocolo se basa en un principio de centrifugación diferencial para eliminar el material vegetal, y extraer las bacterias endófitas desde el interior de los tejidos. El protocolo consta de una serie de pasos, iniciando con la destrucción mecánica del tejido utilizando nitrógeno líquido. Seguido, se re-suspendió el macerado en un volumen de buffer de extracción para bacterias (Tris-HCl 50 mM [pH 7.5], 1% Triton X-100, β -mercaptoetanol 2 mM), con agitación constante utilizando un vortex, para extraer la mayor cantidad de bacterias. Luego, se continuó con una serie de centrifugaciones, filtraciones y suspensiones en buffer de extracción para bacterias, para la eliminación del material vegetal. Se realizó un lavado del pellet con solución Tris-HCl 50 mM y se re-suspendió en una solución de Nycodenz (8g de Nycodenz en 10 mL de Tris-HCl 50 mM) (Nycondenz[®] PROGEN Biotechnik, Cat No. 1002424) para enriquecer la bacterias. Luego de un proceso de centrifugación, se recolectó la interfase, correspondiente a la fracción enriquecida de bacterias.

Finalmente, esta interfase se re-suspendió en 300 μ L de agua destilada estéril, y se separó en dos fracciones: una fracción para extracción directa de ADN, que se denominará FEDE (fracción de extracción directa enriquecida) y una fracción para el aislamiento de bacterias en medios de cultivo, que se denominará en lo sucesivo MIE (morfotipos individuales enriquecidos). Con la fracción MIE, se realizaron diluciones en base 10 (10^{-1} – 10^{-6}) en 900 μ L de agua destilada estéril y se tomó 100 μ L de cada dilución para hacer siembra en superficie, por duplicado. Una de las cajas, se empleó para hacer extracción de ADN de bacterias endófitas cultivables, y la otra se utilizó para aislar colonias, caracterizarlas macro y microscópicamente y construir el banco de bacterias endófitas del proyecto. Nuevamente a partir del extracto original, se lavaron todas las colonias de bacterias enriquecidas con agua destilada estéril. Estas muestras se denominarán en lo sucesivo CEB (consorcio enriquecido bacteriano)

6.3. Cálculos para la determinación de Unidades Formadoras de Colonia en gramos de tejido (UFC/g Tejido)

Luego de 48 horas de incubación de las diluciones de las fracciones MINE y MIE en medio de agar nutritivo, se realizó el conteo de las colonias correspondientes a cada dilución en cada caja (duplicado). De este conteo, se calculó el promedio de bacterias por cada dilución, mediante la ecuación:

$$X UFC = \frac{\text{Conteo Caja 1} + \text{Conteo Caja 2}}{2}$$

El promedio de unidades formadoras de colonias debe estar en un intervalo entre 20 y 300 UFC. Los valores que se encuentran por fuera de este rango no se tuvieron en cuenta.

Seguido, se calculó el factor de dilución utilizado en la siembra de las cajas, mediante la ecuación:

$$F.D = \frac{g \text{ Soluta} + mL \text{ Solvente}}{g \text{ Soluta}}$$

donde,

g Soluta: es la cantidad de tejido empleado.

g Solvente: es la cantidad de solvente (caldo nutritivo) utilizado en la dilución inicial.

Finalmente, para calcular el total de UFC en gramos de tejido, se utilizó la ecuación:

$$\text{Total UFC} = \frac{(X UFC) \cdot (F.D \cdot D.U \cdot \text{Corrección mL})}{g \text{ Tejido utilizados}}$$

donde,

F.D: es el factor de dilución.

D.U: es la dilución correspondiente al recuento de las bacterias.

Corrección mL: la corrección que se realiza para pasar μL a mL (10).

El valor total obtenido se expresó en notación científica.

6.4. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó directamente a partir de tejido vegetal esterilizado y utilizando las fracciones MINE, MIE, CNE, CEB y FEDE.

6.4.1. Extracción de ADN a partir de tejidos vegetales.

La extracción de ADN a partir de tejido vegetal se llevó a cabo empleado el método CTAB modificado (Posso & Ghneim, 2006) y un kit de extracción de tejido vegetal de la casa comercial Qiagen (Cat. No 69104).

Utilizando el método CTAB, se realizaron 3 tipos de lisis secuenciales para garantizar la correcta extracción de ADN: lisis mecánica, por la agitación del tejido macerado en el buffer de extracción CTAB; lisis por temperatura, ya que el buffer estaba precalentado a 65°C; y lisis química, por el contenido de agentes químicos del buffer (CTAB y β -mercaptoetanol). Seguido, se adicionó un volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), con agitación constante, hasta formar una emulsión y se centrifugó para separar la suspensión en 3 fases: una fase orgánica con el ADN extraído, una interfase o capa sólida, correspondiente al material proteico que se mantenía en la suspensión; y la última fase o la fase del cloroformo/alcohol isoamílico. Luego, de transferir la fase orgánica, se practicaron varios lavados y la precipitación del mismo, con etanol al 70%. Finalmente, se re-suspendió en Buffer T₁₀E₁ y RNAsa.

Se utilizó el kit de extracción DNeasy Plant de la casa comercial Qiagen (Cat. No 69104). Se siguió con el protocolo sugerido en el kit, que constaban de 19 pasos. Se empleó 200 mg de tejido macerado en un tubo eppendorf y se adicionó la solución buffer de extracción, para realizar la lisis química, y utilizando un vortex para la lisis química. Finalmente, se adicionaron las soluciones de precipitación, lavado y elusión para obtener ADN.

Para realizar la comprobación de la presencia, integridad y pureza del ADN extraído, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

6.4.2. Extracción de ADN a partir de las fracciones MINE, MIE, CNE y FEDE

La extracción de ADN a partir de las fracciones MINE, MIE, CNE y FEDE se realizó utilizando dos métodos.

Para las fracciones FEDE, CNE y CEB de tallos y hojas de los tres genotipos estudiados se utilizó un kit de extracción de ADN bacteriano *UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit* de la casa comercial MO BIO Laboratories, Inc (Cat. No 12224-50). Se utilizó el protocolo sugerido en el kit, que constaba de 18 pasos. Se agregaron 2 mL de cultivo bacteriano líquido en un tubo eppendorf y se adicionaron las soluciones de extracción indicadas en el protocolo, para realizar la lisis química, y con ayuda de un vortex para la lisis mecánica. Seguido, se traspasó el lisado a un tubo colector y se adicionaron las soluciones de lavado y precipitación de proteínas para obtener el ADN extraído, y finalmente, se realizó la elusión del mismo.

La extracción de ADN a partir de las fracciones MINE y MIE se realizó utilizando el método CTAB, descrito anteriormente.

Para realizar la comprobación de la presencia, integridad y pureza del ADN extraído, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

7. Selección de cebadores específicos para la amplificación de la región hipervariable del gen 16S rARN y análisis de DGGE.

Se realizó una búsqueda bibliográfica exhaustiva de trabajos afines que emplearan cebadores específicos para amplificar regiones hipervariables (V1 – V9) del gen 16S rRNA. Los sistemas de estudio de los trabajos revisados incluyen muestras ambientales complejas (suelo y agua) o comunidades bacterianas aisladas de tejidos de plantas. Los cebadores empleados en los estudios revisados amplifican segmentos de diferentes tamaños en distintas regiones hipervariables del gen.

La especificidad de cada par de cebadores se verificó utilizando la herramienta “Primer-BLAST” disponible en la base de datos del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI, por sus siglas en inglés), utilizando las secuencias depositadas en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (Figura 5).

Figura 5. Herramienta Primer BLAST empleada para comprobar la especificidad de pares de cebadores para la amplificación de genes de interés. Imagen tomada de National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Para establecer la especificidad, se realizó BLAST tanto para las secuencias de bacterias como para las secuencias correspondientes al género *Oryza*. De esta manera, se observó si los cebadores amplificaban específicamente la región de interés en bacterias o si mostraban amplificación inespecífica en bacterias y plantas.

8. Amplificación mediante PCR basada en el gen 16S rARN.

El gen 16S rARN se amplificó mediante PCR usando los pares de cebadores 518F (5'- CCAGCAGCCGCGGTAATACG - 3') y 939R (5'- CTTGTGCGGGCCCCGTCAATC - 3') y 518FGC (5'-

CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCAGCAGCCG
 CGGTAATACG – 3') y 939R (5'- CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC - 3')
 seleccionados luego de la verificación descrita anteriormente. Este par de
 cebadores amplifican las regiones V4 y V5 del gen 16S rARN, con un tamaño
 del amplicón de 414 – 425 pb. Las condiciones de amplificación se muestran
 en la Tabla 2 y Tabla 3.

Tabla 2. Condiciones de PCR para la amplificación del gen 16S rARN con los
 cebadores 518F-939R.

No.	Temperatura	Tiempo	Actividad realizada
1	95°C	5 minutos	Desnaturalización Inicial
2*	94°C	1 minuto	Desnaturalización
3	63°C	1 minuto	Alineamiento
4	72°C	45 segundos	Extensión
5	72°C	10 minutos	Extensión Final
*Se realizan 15 ciclos del paso 2 al paso 4			

Tabla 3. Condiciones de PCR para la amplificación del gen 16S rARN con los
 cebadores 518FGC-939R.

No.	Temperatura	Tiempo	Actividad realizada
1	94°C	10 minutos	Desnaturalización Inicial
2*	97°C	1 minuto	Desnaturalización
3	65°C	1 minuto	Alineamiento
4	72°C	1:30 minutos	Extensión
5	72°C	30 minutos	Extensión Final
*Se realizan 15 ciclos del paso 2 al paso 4			

9. Electroforesis de geles en gradientes de desnaturalización.

La técnica de electroforesis de geles en gradientes de desnaturalización se
 realizó utilizando un gel de poliacrilamida con un gradiente de agentes
 denaturantes de 50 – 70%, tiempo de corrida de 5 horas y un voltaje de 200V
 constantes. La temperatura de la cámara se mantuvo a 60°C, para facilitar la
 desnaturalización, y se utilizó un buffer de corrida TAE 1x (Myers et al., 1988).
 Las regiones hipervariables amplificadas (V4 y V5) presentan un contenido de
 GC mayor al 50%; por eso, se determinó una concentración de las soluciones
 denaturantes del 50% y 70%.

Para realizar el procedimiento de tinción, se introdujo el gel en una solución
 fijadora (Ácido acético glacial al 10%) por 20 minutos, con agitación constante.
 Se realizó un primer lavado durante 5 minutos y se traspasó el gel a la solución
 de tinción (Nitrato de plata y formaldehído al 17%). Para este paso, se mantuvo
 a condiciones de oscura completamente por 30 minutos. Finalmente, se realizó
 un segundo lavado del gel por 10 segundos y se pasó a la solución reveladora
 (Carbonato de sodio, formaldehído al 37% y tiosulfato de sodio), hasta la
 aparición de las bandas.

10. Cálculos para la determinación de la diversidad bacteriana empleando los índices de diversidad y riqueza.

La diversidad de especies bacterianas, se determinó empleando el coeficiente de similitud de Jaccard y el coeficiente de similitud de Sørensen, ambos para determinar la diversidad beta, correspondiente a los cambios de especies presentes entre varias muestras; y el índice de diversidad de Margalef, para la determinación de la diversidad tipo alfa (Moreno, 2001).

10.1. Coeficiente de similitud de Jaccard.

$$I_j = \frac{d}{a + b + c - d}$$

donde

a = Número de especies presentes en la muestra a.

b = Número de especies presentes en la muestra b.

c = Número de especies presentes en la muestra c.

d = Número de especies presentes en las muestra a, b y c.

El intervalo de confianza para este índice va de 0, cuando no hay ninguna especie compartida entre las distintas muestras; hasta 1, cuando las muestras tienen la misma composición de especies.

10.2. Coeficiente de similitud de Sørensen.

$$I_s = \frac{2c}{a + b + c}$$

Se relaciona el número de especies en común con la media aritmética de las especies para las muestras estudiadas. Comparte el mismo intervalo de confianza con el coeficiente de similitud de Jaccard (0 a 1).

10.3. Índice de diversidad de Margalef

$$D_{Mg} = \frac{S - 1}{\ln N}$$

donde

S = Número de especies.

N = Número total de individuos.

Este índice permite transformar el número de especies por muestra a una proporción, a la cual las especies son añadidas por expansión de la muestra. Supone que existe una relación funcional entre el número de especies y el número total de individuos.

6. RESULTADOS

1. Selección de pares de cebadores específicos para amplificación del gen 16S rARN.

Se identificaron un total de diez trabajos de interés, de los cuales, se extrajo información sobre la secuencia de cebadores específicos. En cada caso, se verificó si los pares de cebadores empleados amplifican exclusivamente fragmentos del gen 16S rARN. Todos los cebadores seleccionados a partir de la revisión bibliográfica para la amplificación del gen 16S rARN, mostraban segmentos amplificados, tanto a organismos bacterianos como vegetales (Tabla 4).

Tabla 4. Cebadores específicos para la amplificación del gen 16S rARN empleados en estudios previos con la técnica DGGE

Primer	Secuencia (5' – 3')	Sistema de Estudio	Tamaño de Productos Bacterias /Plantas	Región Hipervariable Amplificada	Referencia
968-F	AACGCGAAGAACCTTAC	Comunidades de plantas Citrus	413 / 441	V6 – V9	(Araújo et al., 2002)
1378-R	CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG		415 / 433		
968-F	AACGCGAAGAACCTTAC	Comunidades de rizosfera	427 / 444	V6 – V8	(de Brito et al., 2008)
1401-R	CGGTGTGTACAAGACCC		4632		
933-F	GCACAAGCGGTGGAGCATGTGG	Comunidades aisladas de bacterias	434 / 459	V6 – V8	(Ji et al., 2004)
1387-R	GCCCGGAACGTATTCACCG		437 / 523		
HDA1-F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	Comunidades bacterianas en vino	173 / 200	V3	(López et al., 2003)
HDA2-R	GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC		176 / 178		
Ec338-F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG		172 / 198	V3	
Ec518-R	ATTACCGCGGCTGCTGG		174 / 176		
27-F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Comunidades aisladas de bacterias	1420 / 1553	V1 – V9	(Polz & Cavanaugh, 1998)
1492-R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT		1454 / 1654		
341-F	CCTACGGGNGGCWGCAG	Comunidades de fitosfera	169 / 194	V3	(Saito et al., 2007)
534-R	ATTACCGCGGCTGCTGG		171 / 173		
63-F	GCCTAACACATGCAAGTC	Comunidades marinas de bacterioplankton	430 / 559	V1 – V3	(Sánchez et al., 2007)
518-R	ATTACCGCGGCTGCTGG		436 / 528		
357-F	CCTACGGGAGGCAGCAG		553 / 602	V3 – V5	
907-R	CCGTCAATTCMTTGTGATTT		560 / 564		
357-F	CCTACGGGAGGCAGCAG		169 / 194	V3	
518-R	ATTACCGCGGCTGCTGG		171 / 503		
1055-F	ATGGCTGTCGTCAGCT		338 / 354	V7 – V8	
1392-R	ACGGGCGGTGTGTRC		351 / 420		
341-F	GCCTACGGGNGGCWGCAG		Comunidades aisladas de bacterias	1020 / 1050	
939-R	CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC	1020 / 1096			
PRBA338-F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	Comunidades de rizosfera	172 / 198	V3 – V5	(Yang et al., 2001)
PRUN518-R	ATTACCGCGGCTGCTGG		174 / 176		

Dado este resultado, probamos nuevas combinaciones de los cebadores reportados. Estas pruebas resultaron en la selección de los cebadores 518F y 939R (Tabla 2), que amplifican específicamente la región de interés del gen 16S rARN, sin amplificar al ADN vegetal. Al realizar BLAST de ambas secuencias de los cebadores en el genoma de arroz (*Oryza*), no hubo ninguna amplificación. Para el genoma de bacteria, el producto amplificado presenta un tamaño de 414 – 425 pares de bases para diversos géneros bacterias reportados previamente como endófitos de arroz (Ghneim et al, en preparación), como *Kocuria*, *Pantoea*, *Bacillus*, *Ralstonia*, *Agrobacterium*, *Microbacterium*, *Arthrobacter*, *Rhizobium*, *Staphylococcus*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Novosphingobium*, *Sphingomonas*, *Chryseobacterium*. La secuencia de estos cebadores y el tamaño del fragmento amplificado se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Cebadores empleados para la amplificación del 16S en estudios de comunidades bacterianas basados en la técnica de DGGE

Primer	Secuencia (5'-3')	Región Hipervariable Amplificada	Tamaño del Fragmento
518-F	CCAGCAGCCGCGGTAATACG*	V4 – V5	414 - 425
939-R	CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC		

*El primer 518F se trabajó con una cola de GC:
(5'- CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG-3')

El cebador 518F se trabajó con una secuencia de GC al extremo 5', esto con el fin de aumentar la resolución de los fragmentos para la separación mediante la técnica de DGGE. Es necesario que los fragmentos sean de un tamaño menor a 1000 pares de bases, ya que la técnica no puede separar fragmentos muy grandes (Myers, 1988).

2. Optimización de las condiciones de amplificación.

La optimización de las condiciones de amplificación del gen 16S rARN para ambos pares de cebadores (518F-939R y 518FGC-939R) se realizó utilizando cepas bacterianas de identidad conocida (control). Cinco cepas bacterianas fueron empleadas como controles en las corridas de DGGE. Cuatro de estas cepas representan endófitos aislados a partir de semillas de *O. glumaepatula*, mientras que *H. seropedicae* (ATCC ID 102524) fue obtenido a través de ATCC (American Type Culture Collection). Las condiciones de amplificación optimizadas se presentan en las Tabla 2 y en la Tabla 3.

3. Aislamiento de bacterias endófitas cultivables en tejidos de los genotipos *O. glumaepatula*, IR64 y Nipponbare

Luego de 48 horas se corroboró la esterilización de los tejidos, mediante la observación de la turbidez en el caldo. Los tejidos que permanecían estériles, continuaron con el protocolo de aislamiento de bacterias endófitas cultivables y no cultivables (Figura 6).



Figura 6. Comprobación de la esterilidad de los tejidos, después de 48 horas de incubación a 30°C y agitación constante (180 rpm).

La caracterización macroscópica se realizó como una primera aproximación para la identificación de colonias diferentes. Esta caracterización incluyó la evaluación de características físicas como textura, color, tamaño y relieve de las colonias aisladas, con el fin de evitar la duplicación de organismos en los análisis moleculares (Anexo 1).

El aislamiento de bacterias endófitas en medio de cultivo permitió la identificación de 23 morfotipos bacterianos distintos, de las fracciones MINE y MIE. De los morfotipos aislados, 10 corresponden a la variedad IR64 y 6 a Nipponbare, ambos de la especie cultivada *O. sativa*, y 7 morfotipos a la especie silvestre *O. glumaepatula* y se realizó una comparación de la cantidad de morfotipos obtenidos entre el método convencional microbiológico y el método de enriquecimiento bacteriano (Tabla 6) y entre los tejidos vegetativos (Tabla 7).

Tabla 6. Número de cepas bacterianas obtenidas utilizando el método microbiológico convencional y el método de enriquecimiento bacteriano

Genotipo	Nº de cepas obtenidas con método convencional (MINE)	Nº de cepas obtenidas con método de enriquecimiento (MIE)
IR64	4	6
Nipponbare	2	4
<i>O. glumaepatula</i>	No disponible*	7

*Para el genotipo *O. glumaepatula* no se realizó el aislamiento de bacterias por método convencional debido a que no había suficiente tejido para realizar dicho procedimiento.

Tabla 7. Morfotipos bacterianos aislados a partir de tallos y hojas de los genotipos estudiados

Genotipo	Nº Total de morfotipos (MINE + MIE)		Morfotipos método convencional (MINE)		Morfotipos método de enriquecimiento (MIE)	
	Hojas	Tallos	Hojas	Tallos	Hojas	Tallos
IR64	4	6	3	1	1	5
Nipponbare	3	3	1	1	2	2
<i>O. glumaepatula</i>	6	1	No disponible	No disponible	6	1

4. *Abundancia de bacterias endófitas en los genotipos O. glumaepatula, IR-64 y Nipponbare.*

La abundancia de bacterias endófitas en los distintos tejidos para cada uno de los genotipos se calculó utilizando el índice de Unidades Formadoras de Colonias por gramo de tejido, como se describe en la metodología. En la tabla 8, se presentan los valores obtenidos de UFC/ g de tejido para las variedades IR64 y Nipponbare y la especie silvestre *O. glumaepatula* (Anexo 2).

Tabla 8. Abundancia bacteriana en tejidos de *O. glumaepatula*, IR64 y Nipponbare

Especie/Variiedad	Convencional (MINE)		Enriquecimiento (MIE)	
	Hojas	Tallos	Hojas	Tallos
IR64	4,61x10 ³ UFC/g	9,56x10 ⁴ UFC/g	3,14x10 ³ UFC/g	1,03x10 ⁵ UFC/g
Nipponbare	2,03x10 ¹ UFC/g	5,48x10 ⁴ UFC/g	1,11x10 ⁴ UFC/g	8,21x10 ⁷ UFC/g
<i>O. glumaepatula</i>	No disponible	No disponible	1,11x10 ⁴ UFC/g	1,15x10 ⁴ UFC/g

El método de enriquecimiento permitió obtener una mayor abundancia de bacterias para las variedades IR64 y Nipponbare, representada en los tallos de ambos genotipos. Con el método convencional, la variedad Nipponbare presentó una diferencia más marcada de abundancia entre hojas y tallos, comparada con los otros genotipos. Esta diferencia se mantuvo al aplicarse el método de enriquecimiento bacteriano. La abundancia para el genotipo silvestre fue semejante, tanto para hojas como para tallos.

5. *Aislamiento de ADN y amplificación del gen 16S rARN de bacterias endófitas cultivables y no cultivables.*

Con base en los resultados obtenidos en el aislamiento de las bacterias en medios de cultivo, se procedió a realizar la extracción de ADN de las mismas, utilizando dos procedimientos:

1. Extracción de ADN de las fracciones MINE y MIE (23 morfotipos bacterianos), utilizando el método de extracción CTAB. Para todos los morfotipos se extrajo ADN de buena calidad.
2. Extracción de ADN directamente a partir de las fracciones FEDE, CNE y CEB, realizada con el kit de extracción de bacterias **UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit**. La extracción de ADN de la fracción FEDE no fue exitosa, debido a la baja cantidad de bacterias presentes en la muestra diluida.

Se corroboró la presencia y pureza del ADN extraído mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

Para los consorcios bacterianos (CNE y CEB) y los morfotipos individuales (MINE y MIE) se logró amplificar un fragmento con el tamaño esperado (414 – 425 pb). En el gel se muestran los productos de PCR para 19 muestras, cuya identificación se presenta en la leyenda de la figura 7. 6 morfotipos mostraron problemas para la amplificación. Los productos de las reacciones de PCR se verificaron en un gel de agarosa al 1.5% corrido en una cámara de electroforesis. Luego de la primera amplificación, se realizó una PCR anidada de las muestras aisladas empleando los cebadores 518FGC – 939R (Figura 8).

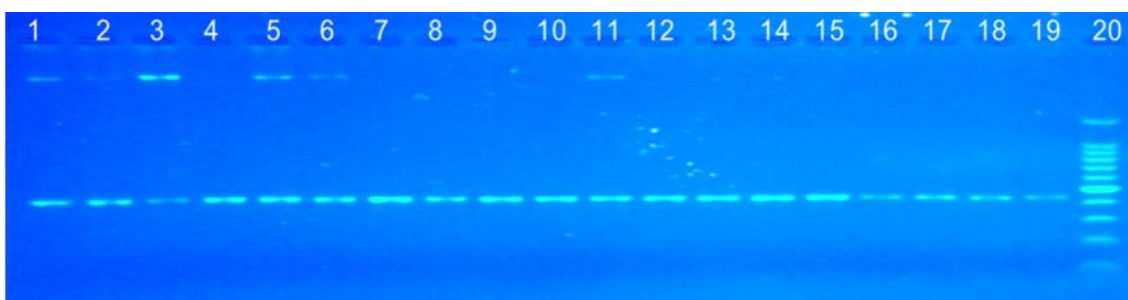


Figura 7. Amplificación del gen 16S rARN empleando los cebadores 518F-939R. Identificación de las muestras: Pozos 1-2 Amplificación de CBE proveniente de hojas y tallos de *O. glumaepatula*. Pozos 3-4 Amplificación de CBE proveniente de hojas y tallos de Nipponbare. Pozos 3-4 Amplificación de CBE proveniente de hojas y tallos de IR64. Pozo 7 Amplificación de CNE aislados de tallos de Nipponbare. Pozos 8-9 Amplificación de CNE aislados de tallos de IR64. Pozos 10-19 Amplificación de 9 morfotipos aislados.

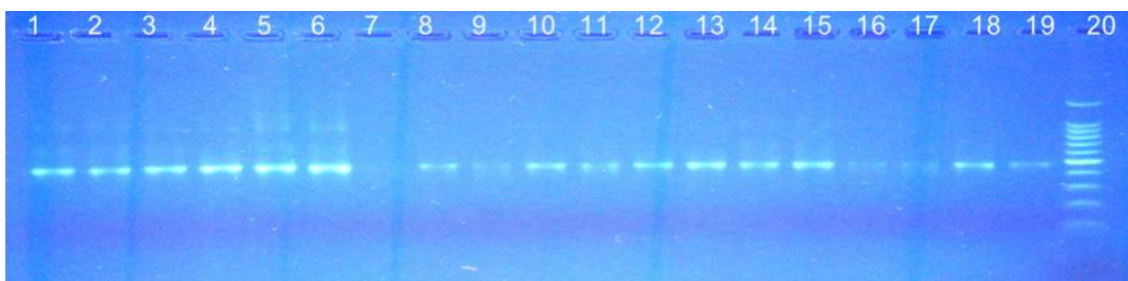


Figura 8. Amplificación del gen 16S rARN empleando los cebadores 518FGC-939R. Estos productos se utilizaron para la separación de los fragmentos mediante la técnica de DGGE. Las muestras fueron servidas en el mismo orden que en la figura 7.

6. *Aislamiento de ADN a partir de tejido.*

El ADN de tejido no se logró extraer de manera exitosa en ninguna de las metodologías utilizadas.

Con el fin de establecer si este resultado se debía a las muestras vegetales o a problemas con los métodos de extracción, se realizó un ensayo de extracción con el kit comercial empleando hojas de espinaca. En este caso se obtuvo ADN íntegro y en buena concentración (Figura 9). Se repitió entonces la extracción en tejidos de arroz, nuevamente sin éxito; lo cual indica que las muestras de tejido sufrieron daños durante el almacenamiento, aunque éste se realizó inmediatamente luego de la comprobación de esterilidad y fueron almacenados bajo condiciones adecuadas (-80°C).

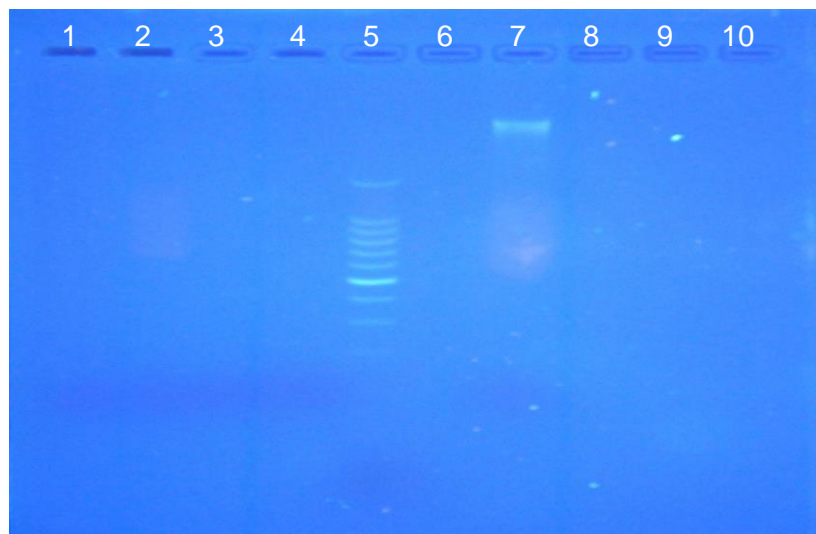


Figura 9. Extracción de ADN a partir de tejido vegetal. Pozos 1-3 Muestra de ADN de hojas de los genotipos de arroz (No se observa ADN). Pozo 7 Ensayo de extracción realizado con hojas de espinaca. Los pozos restantes se encuentran vacíos.

7. *Electroforesis de geles en gradiente de desnaturalización (DGGE).*

La planificación de este proyecto de grado incluía el análisis de las comunidades bacterianas aisladas tanto mediante técnicas microbiológicas como mediante extracción de ADN directa a partir de los tejidos vegetales. Como se mencionó en la sección anterior, no se logró extraer ADN de los tejidos, por lo que se aplicó la caracterización mediante DGGE sólo a las bacterias cultivables extraídas mediante técnicas microbiológicas, tanto con el método convencional como para el método de enriquecimiento. Es decir, se sometieron a análisis las fracciones MINE, MIE, CNE, CBE y FEDE.

El objetivo del análisis de este grupo de bacterias fue establecer si se trata de especies diferentes, pues como se mencionó en secciones anteriores, la técnica de DGGE separa los productos de PCR con base en diferencias en la secuencia.

El ADN de los 23 morfotipos caracterizados macroscópicamente se empleó para amplificar el gen 16S rARN utilizando los cebadores 518FGC y 939R y los amplicones se sometieron a electroforesis en un gradiente de denaturación 50 – 70%, debido al alto porcentaje de GC presente en estas regiones hipervariables (Figura 10).

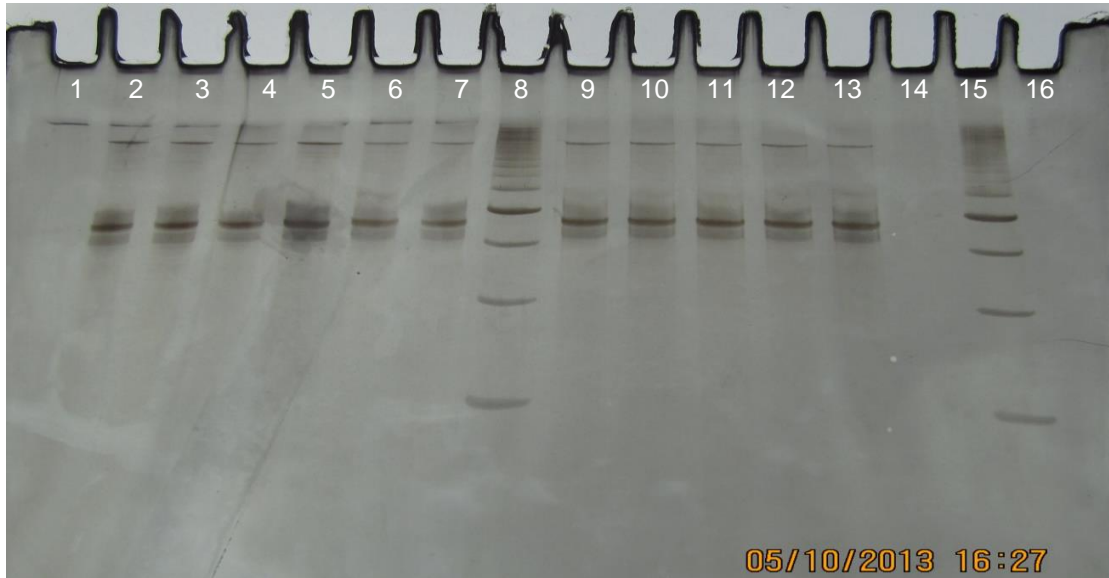


Figura 10. Amplificación en DGGE de cepas bacterianas aisladas mediante metodologías microbiológicas. Identificación de las muestras: Pozos 2-7 6 Morfotipos bacterianos. Pozo 8 Marcador de peso molecular (100 pb). Pozos 9-13 Mezclas de bacterias. Pozo 15 Marcador de peso molecular (100 pb).

Debido a que no se lograron la separación de los fragmentos de ADN para las fracciones descritas anteriormente, y para corroborar que no se tratara de la misma especie bacteriana correspondiente a los 23 morfotipos caracterizados macroscópicamente, se realizó una nueva electroforesis con un número de cepas que ya se han identificado molecularmente mediante secuenciación, y nuevamente no se logró la separación de los fragmentos de ADN.

8. *Diversidad bacteriana en los genotipos O. glumaepatula, IR64 y Nipponbare.*

No se calculó la diversidad bacteriana en los genotipos estudiados, en términos de los coeficientes de Jaccard y Sørensen, y el índice de Margalef, ya que no se logró realizar la caracterización de los morfotipos bacterianos aislados y establecer su identidad a nivel de especie. Sin una variación en el patrón de migración de las bandas, no se puede hacer una aproximación de las diferentes comunidades presentes en los tejidos de los genotipos.

7. DISCUSIÓN

En este trabajo, se comparó la diversidad de especies bacterianas de los tejidos vegetativos (tallos y hojas) de tres genotipos de arroz: dos variedades de *O. sativa* (IR64 y Nipponbare) y una accesión de la especie silvestre *O. glumaepatula*, comparando dos técnicas: microbiológica, utilizando un método convencional y un método de enriquecimiento bacteriano; y molecular, empleando la técnica de PCR-DGGE basada en la amplificación de una región hipervariable del gen 16S rARN. Además, se buscó validar la técnica de DGGE para la caracterización de estos microorganismos.

En el análisis microbiológico, se utilizaron dos metodologías diferentes para aislar bacterias endófitas de los tres genotipos. Un primer método clásico convencional, donde se realizó el aislamiento de bacterias a partir de tejido directamente; y el segundo método de enriquecimiento bacteriano, descrito por Ikeda et al, 2009. El segundo método basado en el enriquecimiento bacteriano, proporciona la lisis de las células vegetales mediante una hidrólisis enzimática; seguido de un principio de centrifugación diferencial, para depurar la mayor cantidad del material vegetal (Jiao et al., 2006). En este proyecto, el enriquecimiento bacteriano permitió aumentar la abundancia de células bacterianas, lo que facilitaría obtener mayor número de morfotipos diferentes, y también ayuda a aumentar la abundancia de bacterias raras o de baja frecuencia. El gradiente de densidad del Nycondenz ha sido usado para purificar células animales y ha sido empleado para extracción de bacterias en muestras de suelo (Rickwood et al. 1982; Lindahl & Bakken, 1995). La cantidad de tejido es un factor limitante para obtener la interfase esperada, correspondiente a la fracción de bacterias enriquecidas (Ikeda et al. 2009). Para el caso de la variedad IR64, la interfase obtenida fue mucho mas densa comparada con la especie silvestre; debido a que la cantidad de tejido de la variedad utilizado para esta metodología fue mucho mayor que la especie silvestre. Es por esta razón, que se decidió emplear todo el tejido esterilizado de la especie *O. glumaepatula* para realizar la técnica de enriquecimiento bacteriano.

Efectivamente, aplicando esta metodología a los tres genotipos estudiados, se obtuvo un mayor número de morfotipos bacterianos: 6 morfotipos para IR64, 4 para Nipponbare y 7 para *O. glumaepatula*. Lo que indica que esta técnica fue exitosa, al momento de obtener mayor abundancia y número de bacterias. Las mayores densidades poblacionales de bacterias endófitas se observan en la raíz y en la parte inferior del tallo, y se presenta un decrecimiento del tallo hasta las hojas (Lamb et al., 1996). Para la especie silvestre, la mayor cantidad de morfotipos se encontraron en hojas; contrario para las variedades de cultivo, encontrándose más morfotipos en los tallos. Con estas metodologías, se lograron aislar un total de 23 morfotipos bacterianos distintos, realizando caracterización macroscópica, donde se presentaba variación en el tipo de tejido, color, elevación, tamaño, entre otras variables estudiadas.

Existieron algunas variaciones en el proceso de esterilización de los tejidos, específicamente, a partir de las semillas. Sin embargo, cabe resaltar en este trabajo, que la especie silvestre fue cultivada en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad Icesi. Inicialmente, se cultivaron las variedades IR-64 y Nipponbare, pero las plantas no prosperaron en su crecimiento, por lo cual, fue necesario utilizar plantas provenientes del Centro Internacional de Agricultura Tropical. Pero existió una diferencia de la metodología de esterilización de los tejidos. La especie silvestre y las variedades de cultivo fueron sembradas bajo las mismas condiciones, es decir, utilizando suelo estéril proveniente del CIAT, pero para la especie silvestre, se realizó una eliminación de organismos epífitos a partir de las semillas, para asegurar que se mantuvieran las bacterias que podían vivir al interior de los tejidos, es decir, los organismos endófitos. Las bacterias epífitas pueden entrar al interior de los tejidos por medio de estomas o lenticelas (Hallman et al., 1997). En el caso de IR-64 y Nipponbare, esta eliminación no se garantizó completamente, lo que se espera encontrar una mayor diversidad bacteriana en los tejidos. Para corroborar esto, se recurre a herramientas moleculares o métodos bioquímicos para caracterizar las comunidades bacterianas, tanto endófitas como epífitas.

Se calculó la abundancia de bacterias endófitas en términos del índice de Unidades Formadoras de Colonias por gramo de tejido (UFC/g) para cada uno de los genotipos. Comparando los dos métodos utilizados (convencional y enriquecimiento), se obtuvo una mayor abundancia de bacterias en hojas y tallos para las variedades de cultivo utilizando el método de enriquecimiento bacteriano. La abundancia de bacterias en la especie silvestre es muy similar a las variedades, lo que podría ser un indicio de que el método de enriquecimiento bacteriano aumentó la abundancia de bacterias presentes en los tejidos. También, se encontró una mayor abundancia de bacterias en tallos de la variedad Nipponbare, empleando el protocolo de enriquecimiento, mientras que la menor abundancia de bacterias estuvo presente en hojas, utilizando el método convencional. Para esta variedad, la técnica de enriquecimiento bacteriano aumenta la abundancia, de manera más marcada que la variedad IR-64. Encontrándose una mayor abundancia de bacterias en las variedades IR64 y Nipponbare que en *O. glumaepatula*, podría ser una aproximación de que no se realizó una eliminación previa de las semillas antes de que fueran sembradas.

En términos de los índices de diversidad, no fue posible calcular el índice de Margalef y los coeficientes de similitud de Jaccard y Sørensen, ya que, no se logró observar una variación en el patrón de migración de las bandas en el gel de poliacrilamida; lo que permitiría establecer si existen variaciones de especies bacterianas en los morfotipos aislados por técnicas microbiológicas.

La amplificación del gen 16S rARN resultó exitosa; por lo que se procedió a realizar la separación de los fragmentos mediante la técnica de electroforesis de geles en gradiente de desnaturalización (DGGE) para su caracterización. El

gradiente utilizado en este estudio, de 50% - 70% de los agentes denaturantes, fue mucho menor comparado con otros trabajos reportados, como 20% - 70% (Teske et al., 1996), 35% - 80% (Ferris et al., 1996) y 40% - 70% (Murray et al., 1996). El uso de gradientes de desnaturalización sin alta variación, podría ser difícil al momento de separar los amplicones que presenten una gama amplia de temperaturas de fusión. Es importante que el gradiente comprenda un rango corto para obtener una distancia suficiente y encontrar variación en la migración de las bandas en el gel. Por eso, en un alto contenido de GC en los segmentos de ADN se requiere una concentración de denaturante lo suficientemente alta para romper los enlaces que se forman entre bases adyacentes. Para las muestras aisladas en este trabajo, se calculó su contenido de GC, el cual, es mayor al 50%. Por lo que el gradiente empleado es suficiente para obtener la separación de los fragmentos de ADN.

Utilizando la técnica de DGGE para las muestras aisladas, se observó el mismo patrón de migración de las bandas, lo cual, dificulta la discriminación para establecer si existe variación a nivel de género o especie de los morfotipos bacterianos. Como una primera aproximación, al no obtener la separación de las bandas en el gel de poliacrilamida, se podría pensar que los 23 morfotipos bacterianos corresponden a la misma especie de bacteria, a pesar que presente diferencias en características físicas como textura, color o tamaño. La co-migración de diferentes secuencias a la misma posición del gel no confirma la presencia de la misma secuencia o especies bacterianas en la muestra (Jackson et al., 2000). Se ha observado que existe una falta de correlación entre el número de diferencias en la secuencia y los patrones de migración de DGGE, debido a variaciones en los dominios y la temperatura de fusión (Vallaeyes et al., 1997). Por eso, se sugiere recurrir a análisis complementarios para realizar su caracterización.

El gen 16S rARN contiene nueve regiones hipervariables que presentan una diversidad en secuencias entre diferentes organismos bacterianos (Chakravorty et al., 2007). Este estudio empleó el par de cebadores 518F y 939R, los cuales amplifican las regiones V4 y V5 del gen, abarcando las posiciones 576 – 682 y 822 – 879 de nucleótidos, respectivamente. Estas regiones (V4 y V5) presentan secuencias muy conservadas en las secuencias de nucleótidos comparadas con otras regiones; por eso, son las menos usadas para discriminar entre grupos bacterianos y establecer si existen variaciones a nivel de especie en una muestra compleja. En otros estudios, se ha encontrado que las regiones V2, V3 y V6 presentan una mayor variación en su secuencia; por lo que son regiones con mayor hipervariabilidad en el gen. En estudios reportados que amplifican las regiones del gen 16S rARN en comunidades bacterianas (Chakravorty et al., 2007), la región V3 se utilizó para discriminar entre 110 especies y 9 géneros de bacterias. Esta región tiene una longitud corta de 64 pb, y reveló que entre las posiciones 456 – 479 se encuentra la mayor variación de cambios en la secuencia, conocidos como SNP (Polimorfismo de nucleótido simple). Pero para nuestro estudio, la gama de géneros era mucho mas amplia, por lo que era importante conocer el grado de

polimorfismo de la secuencia que le permitiría discriminar y caracterizar a un nivel más específico.

En este trabajo, no se emplearon otros pares de cebadores que amplificaran otras regiones del gen 16S rARN, debido a que el objetivo principal del proyecto era amplificar secuencias de organismos bacterianos a partir de ADN extraído directamente de tejido vegetal. Efectivamente, los cebadores 518F y 939R amplifican únicamente las regiones hipervariables V4 y V5 de grupos bacterianos, sin amplificar material vegetal que se convierte en algún tipo de interferencia al caracterizar utilizando la técnica de DGGE. Además, estas regiones son empleadas en técnicas de secuenciación para la caracterización de organismos. Para conocer el grado de polimorfismo presente en estas regiones del gen, se utilizó el programa de ClustalW y se encontró una alta variación en la secuencia, indicando que la escogencia de los cebadores si permitiría caracterizar los microorganismos, por lo menos a nivel de géneros bacterianos (Figura 11).

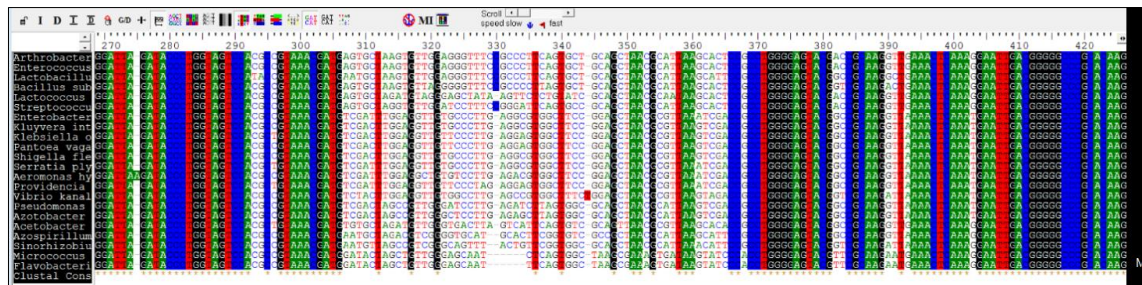


Figura 11. Screenshot del programa ClustalW para determinar el grado de polimorfismo de las secuencias empleadas que amplifican las regiones V4 y V5 del gen 16S rARN.

8. CONCLUSIONES

Utilizando la plataforma Primer BLAST del portal NCBI, se logró establecer los pares de cebadores específicos que amplificaran únicamente organismos bacterianos, sin presentar alguna amplificación específica por material vegetal. Estos cebadores, 518F-939R, amplifican regiones con un alto polimorfismo en las secuencias de organismos bacterianos; lo que permitiría tener una primera aproximación de la caracterización de los morfotipos aislados empleando la técnica de DGGE. En conjunto, se lograron optimizar las condiciones de amplificación para ambos pares de cebadores (518F-939R y 518FGC-939R), estableciendo una temperatura de alineamiento de 63°C y 65°C, respectivamente.

También, se logró aislar 23 morfotipos bacterianos distintos por caracterización macroscópica, utilizando dos métodos microbiológicos de aislamiento de bacterias endófitas cultivables: uno convencional y otro por enriquecimiento de bacterias. La abundancia de bacterias endófitas fue mayor empleando el método de enriquecimiento bacteriano comparado con el método convencional, lo que indica que este método se estandarizó correctamente en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad Icesi, y resultó exitoso y reproducible.

Frente al análisis molecular, no se logró obtener una correcta separación de las bandas empleando la técnica de DGGE, lo que no permitió asegurar la existencia de 23 especies diferentes de bacterias. Se calculó el contenido de GC de las muestras aisladas, con un valor mayor al 50%; por lo que, el gradiente de 50 – 70% de agentes denaturantes podría permitir la correcta separación de los fragmentos de amplicones.

Para la caracterización de los morfotipos, se debe recurrir a análisis complementarios, como la secuenciación, con el fin de establecer la verdadera identidad de los grupos bacterianos presentes en muestras complejas, como tejido vegetal. También, se puede emplear pruebas bioquímicas para la caracterización bacteriana.

9. RECOMENDACIONES

Para estudios posteriores, se recomienda realizar un análisis de bioinformática mas exhaustivo, que permita identificar pares de cebadores que amplifiquen otras regiones del gen 16S rARN,. Es importante tener en cuenta que se deben emplear pares de cebadores que amplifiquen únicamente secuencias proveniente de ADN bacteriano, sin presentar alguna interferencia por ADN vegetal.

Luego de identificar los cebadores correctos, es importante optimizar las condiciones de la técnica de DGGE, para establecer una correcta separación de los fragmentos, que permitan discriminar comunidades bacterianos a nivel de especie, probando otros gradientes de desnaturalización o tiempos de corrida para obtener una mayor resolución de las bandas. Se debe tener en cuenta el porcentaje de GC presente en las secuencias para determinar un gradiente de agentes denaturantes lo suficientemente alto para romper los enlaces puentes de hidrógeno que generan estas bases nitrogenadas.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abrams, Ezra S.; Stanton, Vincent P. (1992). Use of denaturing gradient gel electrophoresis to study conformational transitions in nucleic acids. *Method in Enzymology*, 212, 71-104.
- Adesemoye, Anthony O.; Kloepper, Joseph W. (2009). Plant–microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 1-12.
- Araújo, Wellington L.; Marcon, Joelma; Maccheroni, Walter; van Elsas, Jan Dirk; van Vuurde, Jim W. L.; Azevedo, Joao Lúcio. (2002). Diversity of Endophytic Bacterial Populations and Their Interaction with *Xylella fastidiosa* in Citrus Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (10), 4906-4914.
- Azevedo, J. L.; Maccheroni, W.; Pereira, J. O.; de Araujo, W. L. (2000). Endophytic microorganisms: A review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 3 (1), 40-65.
- Baldani, J. I.; Pot, B.; Kirchhof, G.; Falsen, E.; Baldani, V. L. D.; Olivares, F. L.; Hoste, B.; Kersters, K.; Hartmann, A.; Gillis, M.; Dobereiner, J. (1996). Emended Description of *Herbaspirillum*; Inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a Mild Plant Pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and Classification of a Group of Clinical Isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* Species 3. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46 (3), 802-810.
- Barranquio, W. L.; Revilla, L.; Ladha, J. K. (1997). Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. *Plant and Soil*, 194, 15-24.
- Benhizia, Yacine; Benhizia, Hayet; Benguedouar, Ammar; Muresu, Rosella; Giacomini, Alessio; Squartini, Andrea. (2004). Gamma Proteobacteria Can Nodulate Legumes of the Genus *Hedysarum*. *Systematic and Applied Microbiology*, 27 (4), 462-468.
- Boddey, R. M.; de Oliveira, O. C.; Urquiaga, S.; Reis, V. M.; de Olivares, F. L.; Baldani, V. L.; Döbereiner, J. (1995). Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. *Plant and Soil*, 174, 195-209.
- Boon, Nico; Windt, Wim De; Verstraete, Willy; Top, Eva M. (2002). Evaluation of nested PCR–DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiology Ecology*, 39, 101-112.

Botero Ospina, María José; Saldarriaga Cardona, Alegria; Macías Vivares, Albeiro; Chavarriaga Montoya, William. (2008). Identificación y caracterización de bacterias asociada con mancha foliar en papachina (Aracea) en el pacífico caucano. *Agronomía*, 16 (1), 43-52.

Castillo Rodríguez, Francisco. (2005). Metagenómica. En F. Castillo Rodríguez, M. D. Roldán Ruiz, R. Blasco Plá, M. J. Huertas Romera, F. J. Caballero Domínguez, C. Moreno Vivián, y otros, *Bioteología Ambiental* (pág. 357). Madrid, España: Editorial Tébar.

Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 69 (2), 330-339.

Choudhury, A. T. M. A.; Kennedy, I. R. (2004). Prospects and potentials for systems of biological nitrogen fixation in sustainable rice production. *Biology and Fertility of Soils*, 39, 219-227.

Compant, Stéphane; Duffy, Brion; Nowak, Jerzy; Clément, Christophe; Ait Barka, Essaïd. (2005). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (9), 4951-4959.

Costacurta, Antonia; Vanderleyden, Jos. (1995). Synthesis of Phytohormones by Plant-Associated Bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 21 (1), 1-18.

de Brito Ferreira, Enderson Petronio; Nepomuceno Dusi, André; Ribeiro Xavier, Gustavo; Rumjanek Gouvea, Norma. (2008). Rhizosphere bacterial communities of potato cultivars evaluated through PCR-DGGE profiles. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43 (4), 605-612.

de Matos Nogueira, E.; Vinagre, F.; Masuda, H. P.; Vargas, C.; de Pádua, V. L. M.; da Silva, F. R. ; dos Santos, R. V.; Baldini, J. I.; Gomes Ferreira, P. C.; Hermeley, A. S. (2001). Expression of sugarcane genes induced by inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. *Genetics and Molecular Biology*, 24 (1-4), 199-206.

Díaz Peralta, Katy; Araya, Támara; Valenzuela, Sofía; Sossa, Katherine; Martínez, Miguel; Peña Cortés, Hugo; Sanfuentes, Eugenio. (2012). Production of phytohormones, siderophores and population fluctuation of two root-promoting rhizobacteria in Eucalyptus globulus cuttings. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 2003-2014.

Elbeltagy, A.; Nishioka, K.; Suzuki, H.; Sato, T.; Sato, Y.; Morisaki, H.; Mitsui, H.; Minamisawa, K. (2000). Isolation and Characterization of Endophytic Bacteria from Wild and Traditionally Cultivated Rice Varieties. *Soil Science and Plant Nutrition*, 46 (3), 617-629.

Elbeltagy, A.; Nishioka, K.; Sato, T.; Suzuki, H.; Ye, B.; Hamada, T.; Isawa, T.; Mitsui, H.; Minamisawa, K. (2001). Endophytic Colonization and In Planta Nitrogen Fixation by a *Herbaspirillum* sp. Isolated from Wild Rice Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (11), 5285-5293.

Engelhard, M.; Hurek, R.; Reinhold-Hurek, B. (2000). Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. *Environmental Microbiology*, 2 (2), 131-141.

FAO. (01 de 12 de 2004). *Año Internacional del Arroz*. Consultado el 05 de 05 de 2012, de FAO: http://www.fao.org/rice2004/es/index_es.htm

Ferris, M. J.; Muyzer, G.; Ward, D. M. (1996). Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Profiles of 16S rRNA-Defined Populations Inhabiting a Hot Spring Microbial Mat Community. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (2), 340-346.

Hallman, J. ; Quadt-Hallman, A.; Mahaffee, W. F.; Kleopfer, J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43 (10), 895-914.

Hernández , Annia; Rives, Narovis; Caballero, Alberto; Hernández, Ana N.; Heydrich, Mayra. (2004). Caracterización de rizobacterias asociadas al cultivo de maíz en la producción de metabolitos del tipo IAI, sideróforos y ácido salicílico. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 6 (1), 6-13.

Hernández León, R.; Velázquez Sepúlveda, I.; Orozco Mosqueda, M. C.; Santoyo, G. (2010). Metagenómica de suelos: grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. *International Journal of Experimental Botany*, 79, 133-139.

Ikeda, Seishi; Kaneko, Takakazu; Okubo, Takashi; E. Rallos, Lynn E.; Eda, Shima; Mitsui, Hisayuki; Sato, Shusei; Nakamura, Yasukazu; Tabata, Satoshi; Minamisawa, Kiwamu. (2009). Development of a bacterial cell enrichment method and its application to the community analysis in soybean stems. *Microbial Ecology*, 58, 703-714.

Jackson, Colin R. ; Roden, Eric E.; Churchill, Perry F. (2000). Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Can Fail to Separate 16S rDNA Fragments with Multiple Base Differences. *Molecular Biology*, 1 (2), 49-51.

Janda, J. Michael; Abbott, Sharon L. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45 (9), 2761-2761.

- Ji, Niannian; Peng, Bo; Wang, Guizhong; Wang, Sanying; Peng, Xuanxian. (2004). Universal primer PCR with DGGE for rapid detection of bacterial pathogens. *Journal of Microbiological Methods*, 57, 409-413.
- Jiao, J. Y.; Wang, H. X.; Zeng, Y.; Shen, Y. M. (2006). Enrichment for microbes living in association with plant tissues. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 830-837.
- Kojic, Milan; Degrassi, Giuliano; Venturi, Vittori. (1999). Cloning and characterisation of the *rpoS* gene from plant growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358: RpoS is not involved in siderophore and homoserine lactone production. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1489 (2-3), 413-420.
- Lamb, T. G.; Tonkyn, D. W.; Kluepfel, D. A. (1996). Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from rhizosphere to aerial plant tissue. *Canadian Journal of Microbiology*, 42, 1112-1120.
- Lane, David J.; Pace, Bernadette; Olsen, Gary J.; Stahl, David A.; Sogin, Mitchell L.; Pace, Norman R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82, 6955-6959.
- Lindahl, V.; Bakken, L. R. (1995). Evaluation of methods for extraction of bacteria from soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 16, 135-142.
- López, Isabel; Ruiz Larrea, Fernanda; Cocolin, Luca; Orr, Erica; Phister, Trevor; Marshall, Megan; VanderGheynst, Jean; Mills, David A. (2003). Design and Evaluation of PCR Primers for Analysis of Bacterial Populations in Wine by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (11), 6801-6807.
- 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*, 21 (2), 86-100.
- Mano, H.; Tanaka, F.; Nakamura, C.; Kaga, H.; Morisaki, H. (2007). Culturable endophytic bacterial flora of the maturing leaves and roots of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field. *Microbes and Environments*, 22, 175-185.
- Mano, Hironobu; Morisaki, Hisao. (2008). Endophytic Bacteria in the Rice Plant. *Microbes and Environments*, 23 (2), 109-117.
- Mayz Figueroa, Juliana. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *UDO Agrícola*, 4 (1), 1-20.

McCaig, Allison E.; Glover, L. Anne; Prosser, James I. (2001). Numerical Analysis of Grassland Bacterial Community Structure under Different Land Management Regimens by Using 16S Ribosomal DNA Sequence Data and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Banding Patterns. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (10), 4554-4559.

Miyamoto, T.; Kawahara, M.; Minamisawa, K. (2004). Novel endophytic nitrogen-fixing clostridia from the grass *Miscanthus sinensis* as revealed by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (11), 6580-6586.

Moreno, Claudia E. (2001). *Métodos para medir la biodiversidad*. Zaragoza: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo.

Morris, R. O. (1995). Genes specifying auxin and cytokinin biosynthesis in prokaryotes. *Plant Hormones*, 318-339.

Murray, A. E.; Hollibaugh, J. T.; Orrego, C. (1996). Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (7), 2676-2680.

Muyzer, Gerard; Teske, Andreas; Wirsén, Carl O.; Jannasch, Holger W. (1995). Phylogenetic relationships of Thiomicrospira species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Archives of Microbiology*, 164 (3), 165-172.

Myers, Richard M.; Sheffield, Val C.; Cox, David R. (1988). Detection of single base changes in DNA: ribonuclease cleavage and denaturing gradient gel electrophoresis. En K. E. Davies, *Genome analysis: a practical approach* (págs. 95-139). Michigan: IRL Press.

Naher, U. A.; Radziah, O.; Shamsuddin, Z. H.; Halimi, M. S.; Razi, I. M. (2009). Isolation of Diazotrophs from Different Soils of Tanjong Karang Rice Growing Area in Malaysia. *International Journal of Agriculture & Biology*, 11 (5), 547-552.

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 and Environments*, 20, 168-177.

Peng, Guixiang; Wang, Huarong; Zhang, Guoxia; Hou, Wie; Liu, Yang; Wang, En Tao; Tan, Zhiyuan. (2006). *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 1263-1271.

Peng, Guixiang; Zhang, Wu; Luo, Huifen; Xie, Hongwei; Lai, Weihao; Tan, Zhiyuan. (2009). *Enterobacter oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the wild rice species *Oryza latifolia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 1650-1655.

Polz, Martin F.; Cavanaugh, Colleen M. (1998). Bias in Template-to-Product Ratios in Multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (10), 3724-3730.

Posso, Duina; Ghneim, Thaura. (2006). *Uso de marcadores microsatélites para la estimación de diversidad genética en plantas. Manual de laboratorio*. Caracas.

Rickwood, D.; Ford, T.; Graham, J. (1982). Nycodenz: a new nonionic iodinated gradient medium. *Analytical Biochemistry*, 123, 23-31.

Rodicio, María del Rosario; Mendoza, María del Carmen. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22 (4), 238-245.

Rodriguez Cáceres, Enrique A. (1982). Improved Medium for Isolation of *Azospirillum* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 44 (4), 990-991.

Rosenblueth, Mónica; Martínez Romero, Esperanza. (2006). Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts. *Molecular Plant-Microbes Interactions*, 19 (8), 827-837.

Ryu, R. Julie; Patten, Cheryl L. (2008). Aromatic Amino Acid-Dependent Expression of Indole-3-Pyruvate Decarboxylase Is Regulated by TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. *Journal of Bacteriology*, 190 (21), 7200-7208.

Saito, Asami; Ikeda, Seishi; Ezura, Hiroshi; Minamisawa, Kiwamu. (2007). Microbial Community Analysis of the Phytosphere Using Culture-Independent Methodologies. *Microbes and Environments*, 22 (2), 93-105.

Saleh, Saleema S.; Glick, Bernard R. (2001). Involvement of *gacS* and *rpoS* in enhancement of the plant growth-promoting capabilities of *Enterobacter cloacae* CAL2 and UW4. *Canadian Journal of Microbiology*, 47 (8), 698.

Sánchez, Olga; Gasol, Josep M.; Massana, Ramon; Mas, Jordi; Alió, Carlos Pedrós. (2007). Comparison of Different Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Primer Sets for the Study of Marine Bacterioplankton Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (18), 5962-5967.

Schmalenberger, Achim; Schwieger, Frank; Tebbe, Christoph C. (2001). Effect of Primers Hybridizing to Different Evolutionarily Conserved Regions of the Small-Subunit rRNA Gene in PCR-Based Microbial Community

Analyses and Genetic Profiling. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (8), 3557-3563.

Seidel, C.; Walz, A.; Park, S.; Cohen, J. D.; Ludwig Müller, J. (2006). Indole-3-Acetic Acid Protein Conjugates: Novel Players in Auxin Homeostasis. *Plant Biology*, 8 (3), 340-345.

Singh, R. K.; Mishra, R. P. N.; Jaiswal, H. K.; Kumar, V.; Pandey, S. P.; Rao, S. B.; Annapurna, K. (2006). Isolation and Identification of Natural Endophytic Rhizobia from Rice (*Oryza sativa* L.) Through rDNA PCR-RFLP and Sequence Analysis. *Current Microbiology*, 52 (5), 345-349.

Spaepen, Stijn; Vanderleyden, Jos; Remans, Roseline. (2007). Indole-3-acetic in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31, 425-448.

Stoltzfuz, J. R.; So, R.; Malarvithi, P. P.; Ladha, J. K.; de Bruiji, F. J. (1997). Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. *Plant and Soil*, 194, 26-36.

Taiz, Lincoln; Zeiger, Eduardo. (2010). Plant Physiology. En L. Taiz, & E. Zeiger, *Plant Physiology* (Vol. 5, págs. 351-352). Sunderland, Massachusetts, United States: SINAUER.

Teske, Andreas; Wawer, Cathrin; Muyzer, Gerard; Ramsing, Niels B. (1996). Distribution of Sulfate-Reducing Bacteria in a Stratified Fjord (Mariager Fjord, Denmark) as Evaluated by Most-Probable-Number Counts and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified Ribosomal DNA Fragments. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (4), 1405-1415.

Trabal, Natalia; Mazón Suástegui, José M.; Vásquez Juárez, Ricardo; Asencio Valle, Felipe; Morales Bojórquez, Enrique; Romero, Jaime. (2012). Molecular Analysis of Bacterial Microbiota Associated with Oysters (*Crassostrea gigas* and *Crassostrea corteziensis*) in Different Growth Phases at Two Cultivation Sites. *Microbiology Ecology*, 64 (2), 555-569.

Vallaey, Tatiana; Topp, Edward; Muyzer, Gerard; Macheret, Valérie; Laguerre, Gisèle; Rigaud, Annabel; Soulas, Guy. (1997). Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbiology Ecology*, 24 (3), 279-285.

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. *Journal of Biotechnology*, 91 (2-3), 127-141.

Whittaker, R. H. (1972). Evolution and measurement of species diversity. *Taxon*, 21, 213-251.

Yang, C. H.; Crowley, D. E.; Menge, J. A. (2001). 16S rDNA Fingerprinting of rhizosphere bacterial communities associated with healthy and phytophthora infected avocado roots. *FEMS Microbiology Ecology*, 35 (2), 129-136.

Yanni, Y. G.; Rizk, R. Y.; Corich, V.; Squartini, A.; Ninke, K.; Philip-Hollingsworth, S.; Orgambide, G.; de Bruijn, F.; Stoltzfus, J.; Buckley, D.; Schmidt, T. M.; Mateos, P. F.; Ladha, J. K.; Dazzo, F.B. (1997). Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. *Plant and Soil*, 194 (1-2), 99-114.

11. ANEXOS

Anexo 1. Caracterización macroscópica de los 23 morfotipos aislados empleando el método convencional y el método de enriquecimiento bacteriano.

Tabla 1. Caracterización macroscópica de bacterias aisladas a partir de la variedad IR-64.

Protocolo	Convencional
Tejido	Hoja
Colonia	1
Medio de Cultivo	Agar Nutritivo
Forma	Circular
Color	Crema
Tamaño	9 mm
Borde	Entero
Aspecto	Rugosa, Opaca, Radiada
Elevación	Umbonada
Otros	-

Protocolo	Convencional
Tejido	Hoja
Colonia	2
Medio de Cultivo	Agar Nutritivo
Forma	Circular
Color	Amarillo
Tamaño	3 mm
Borde	Entero
Aspecto	Opaca, Lisa
Elevación	Convexa
Otros	-

Protocolo	Convencional
Tejido	Hoja
Colonia	3
Medio de Cultivo	Agar Nutritivo
Forma	Circular
Color	Crema
Tamaño	2 mm
Borde	Entero
Aspecto	Lisa, Brillante
Elevación	Convexa
Otros	-

Protocolo	Convencional
Tejido	Tallo
Colonia	5
Medio de Cultivo	Agar Nutritivo
Forma	Circular
Color	Crema
Tamaño	11 mm
Borde	Entero
Aspecto	Rugosa, Opaca, Radiada
Elevación	Umbonada
Otros	Muy similar a la conocia 1

Protocolo	Enriquecimiento
Tejido	Hoja
Colonia	4
Medio de Cultivo	Agar Nutritivo

Protocolo	Enriquecimiento
Tejido	Tallo
Colonia	6
Medio de Cultivo	Agar Nutritivo

Forma	Circular
Color	Amarillo
Tamaño	3 mm
Borde	Entero
Aspecto	Lisa, Brillante
Elevación	Convexa
Otros	

Forma	Circular
Color	Crema
Tamaño	4 mm
Borde	Entero
Aspecto	Lisa, Brillante
Elevación	Umbonada
Otros	

Protocolo	Enriquecimiento
Tejido	Tallo
Colonia	7
Medio de Cultivo	Agar Nutritivo
Forma	Circular
Color	Rosa
Tamaño	1 mm
Borde	Entero
Aspecto	Lisa, Brillante
Elevación	Convexa
Otros	

Protocolo	Enriquecimiento
Tejido	Tallo
Colonia	8
Medio de Cultivo	Agar Nutritivo
Forma	Circular
Color	Amarilla
Tamaño	4 mm
Borde	Entero
Aspecto	Lisa, Brillante
Elevación	Convexa
Otros	Muy similar a la colonia 2

Protocolo	Enriquecimiento
Tejido	Tallo
Colonia	9
Medio de Cultivo	Agar Nutritivo
Forma	Circular
Color	Crema
Tamaño	1 mm
Borde	Entero
Aspecto	Rugosa
Elevación	Umbonada
Otros	Muy similar a la colonia 1

Protocolo	Enriquecimiento
Tejido	Tallo
Colonia	6
Medio de Cultivo	Agar Nutritivo
Forma	Circular
Color	Amarillo
Tamaño	3 mm
Borde	Entero
Aspecto	Lisa, Brillante
Elevación	Convexa
Otros	Muy similar a la colonia 4

Tabla 2. Caracterización macroscópica de bacterias aisladas a partir de la variedad Nipponbare.

Protocolo	Convencional
Tejido	Hoja

Protocolo	Convencional
Tejido	Tallo

Colonia	11
Medio de Cultivo	Agar Nutritivo
Forma	Circular
Color	Crema
Tamaño	4 mm
Borde	Entero
Aspecto	Radiada, Brillante
Elevación	Ligeramente convexa
Otros	[1]

Colonia	12
Medio de Cultivo	Agar Nutritivo
Forma	Circular
Color	Crema
Tamaño	9 mm
Borde	Entero
Aspecto	Opaca, Rugosa
Elevación	Umbilicadas/ Umbonadas Crateriformes
Otros	[1, 11]

Protocolo	Enriquecimiento
Tejido	Hoja
Colonia	13
Medio de Cultivo	Agar Nutritivo
Forma	Circular
Color	Amarilla
Tamaño	2 mm
Borde	Entero
Aspecto	Lisa, Brillante
Elevación	Convexa
Otros	

Protocolo	Enriquecimiento
Tejido	Hoja
Colonia	14
Medio de Cultivo	Agar Nutritivo
Forma	Circular
Color	Crema
Tamaño	1 mm
Borde	Entero
Aspecto	Lisa, Brillante
Elevación	Convexa
Otros	

Protocolo	Enriquecimiento
Tejido	Tallo
Colonia	15
Medio de Cultivo	Agar Nutritivo
Forma	Circular
Color	Amarilla
Tamaño	2 mm
Borde	Entero
Aspecto	Lisa, Brillante
Elevación	Convexa
Otros	[13]

Protocolo	Enriquecimiento
Tejido	Tallo
Colonia	16
Medio de Cultivo	Agar Nutritivo
Forma	Circular
Color	Crema
Tamaño	1 mm
Borde	Entero
Aspecto	Lisa, Brillante
Elevación	Convexa
Otros	[14]

Tabla 3. Caracterización macroscópica de bacterias aisladas a partir de la especie silvestre *O. glumaepatula*.

Protocolo	Enriquecimiento
Tejido	Hoja
Colonia	17
Medio de Cultivo	Agar nutritivo
Forma	Circular
Color	Amarillo con halo blanco
Tamaño	4,5 mm
Borde	Entero
Aspecto	Brillante
Elevación	Convexa
Otros	

Protocolo	Enriquecimiento
Tejido	Hoja
Colonia	18
Medio de Cultivo	Agar nutritivo
Forma	Circular
Color	Centro naranja/Círculos concéntricos Crema
Tamaño	5 mm
Borde	Continuo
Aspecto	Opaca
Elevación	Plano
Otros	

Protocolo	Enriquecimiento
Tejido	Hoja
Colonia	19
Medio de Cultivo	Agar nutritivo
Forma	Circular
Color	Centro naranja/Rosado
Tamaño	3 mm
Borde	Entero
Aspecto	Brillante
Elevación	Convexa
Otros	

Protocolo	Enriquecimiento
Tejido	Hoja
Colonia	20
Medio de Cultivo	Agar nutritivo
Forma	Circular
Color	Crema
Tamaño	1,5 mm - 2,0 mm
Borde	Continuo/Entero
Aspecto	Brillante
Elevación	Plana
Otros	

Protocolo	Enriquecimiento
Tejido	Hoja
Colonia	21
Medio de Cultivo	Agar nutritivo
Forma	Circular/Círculos concéntricos
Color	Blanca
Tamaño	9 mm
Borde	Festoneado
Aspecto	Opaca
Elevación	Plana
Otros	

Protocolo	Enriquecimiento
Tejido	Hoja
Colonia	22
Medio de Cultivo	Agar nutritivo
Forma	Puntiforme
Color	Crema
Tamaño	1 mm
Borde	Entero
Aspecto	Opaca
Elevación	Convexa
Otros	

Protocolo	Enriquecimiento
Tejido	Tallo

Colonia	23
Medio de Cultivo	Agar nutritivo
Forma	Puntiforme
Color	Beige/Naranja
Tamaño	1 mm
Borde	Entero
Aspecto	Opaca
Elevación	Convexa
Otros	

Anexo 2. Muestra de cálculo para determinar la abundancia de bacterias empleando el índice de Unidades Formadoras de Colonia por gramo de tejido (UFC/g).

Para la variedad IR-64, se utilizaron 42,38 gramos de tejidos en total, repartidos en 33,08 g para hojas y 9,03 g para tallos. Se repartió la mitad del tejido de hojas para realizar las pruebas microbiológicas (preparación de diluciones seriadas y plaqueo directo en agar nutritivo), y la mitad restante para realizar la técnica de enriquecimiento bacteriano. Cada mitad, nuevamente se separó para realizar plaqueo directo, tanto para bacterias enriquecidas y no enriquecidas, y para realizar extracción de ADN a partir de tejido y a partir de la interfase enriquecida de bacterias.

Por lo tanto, la cantidad usada para realizar la siembra en superficie de bacterias enriquecidas y no enriquecidas en 8,27 gramos para hojas y 2,26 gramos para tallos. A continuación, se presenta una muestra de calcula para obtener el valor total de UFC en gramos de tejido utilizados.

- Para hojas,

Dilución inicial: 8,27 gramos en 50 mL de caldo nutritivo

Diluciones seriadas: 10^{-1} a 10^{-6}

Recuento: Plaqueo de 100 μ L del inóculo por dilución

- $M_x = > 300$ UFC
- $10^{-1} = > 300$ UFC
- $10^{-2} = (52 \text{ UFC} + 57 \text{ UFC}) / 2 \rightarrow X = 54,5$ UFC
- $10^{-3} = (1 \text{ UFC} + 1 \text{ UFC}) / 2 \rightarrow X = 1$ UFC
- $10^{-4} = (0 \text{ UFC} + 0 \text{ UFC}) / 2 \rightarrow X = 0$ UFC
- $10^{-5} = (0 \text{ UFC} + 0 \text{ UFC}) / 2 \rightarrow X = 0$ UFC
- $10^{-6} = (0 \text{ UFC} + 0 \text{ UFC}) / 2 \rightarrow X = 0$ UFC

Para determinar el factor de dilución, se utilizó la ecuación:

$$F.D = \frac{g \text{ Soluta} + mL \text{ Solvente}}{g \text{ Soluta}}$$

$$F.D = \frac{(8,27 \text{ g} + 50 \text{ mL})}{8,27 \text{ g}} = 7$$

Finalmente, para determinar el valor de UFC/ g de tejido, se empleó la ecuación:

$$Total \frac{UFC}{g \text{ Tejido}} = \frac{(X \text{ UFC}) \cdot (F.D \cdot D.U \cdot \text{Corrección mL})}{g \text{ Tejido utilizados}}$$

$$Total \frac{UFC}{g \text{ Tejido}} = \frac{(54,5) \cdot (7 \cdot 100 \cdot 10)}{8,27 g} = 4,61 \times 10^{-4} \frac{UFC}{g} \text{ Tejido}$$

- Para tallos,

Dilución inicial: 2,26 gramos en 10 mL de caldo nutritivo

Diluciones seriadas: 10^{-1} a 10^{-6}

Recuento: Plaqueo de 100 μ L del inóculo por dilución

- $M_x = > 300$ UFC
- $10^{-1} = > 300$ UFC
- $10^{-2} = (47 \text{ UFC} + 33 \text{ UFC}) / 2 \rightarrow X = 40$ UFC
- $10^{-3} = (2 \text{ UFC} + 8 \text{ UFC}) / 2 \rightarrow X = 5$ UFC
- $10^{-4} = (2 \text{ UFC} + 4 \text{ UFC}) / 2 \rightarrow X = 3$ UFC
- $10^{-5} = (0 \text{ UFC} + 0 \text{ UFC}) / 2 \rightarrow X = 0$ UFC
- $10^{-6} = (0 \text{ UFC} + 0 \text{ UFC}) / 2 \rightarrow X = 0$ UFC

Para determinar el factor de dilución, se utilizó la ecuación:

$$F.D = \frac{g \text{ Solute} + mL \text{ Solvente}}{g \text{ Solute}}$$

$$F.D = \frac{(2,26 g + 10 mL)}{2,26 g} = 5,4$$

Finalmente, para determinar el valor de UFC/ g de tejido, se empleó la ecuación:

$$Total \frac{UFC}{g \text{ Tejido}} = \frac{(X \text{ UFC}) \cdot (F.D \cdot D.U \cdot \text{Corrección mL})}{g \text{ Tejido utilizados}}$$

$$Total \frac{UFC}{g \text{ Tejido}} = \frac{(40) \cdot (5,4 \cdot 100 \cdot 10)}{2,26 g} = 9,56 \times 10^{-4} \frac{UFC}{g} \text{ Tejido}$$