

Bacterias asociadas al cultivo de la quinua en el Altiplano Boliviano y su potencial biotecnológico

Noel Ortuño; Mayra Claros; Claudia Gutiérrez; Marlene Angulo; José Castillo

Trabajo financiado por: FONTAGRO; Fundación McKnight; Fundación PROINPA

E mail: n.ortuno@proinpa.org

Resumen. La quinua crece en condiciones extremas de humedad y temperatura en una zona semidesértica, por tanto es posible que también sus microorganismos simbiotes estén adaptados a esas condiciones extremas. Estos microorganismos representan un gran potencial para el desarrollo de biotecnología adaptada a la quinua. Para ello se colectaron plantas de quinua y muestras de suelo del Altiplano Sud, estas fueron llevadas al laboratorio donde se aislaron diferentes especies de bacterias y se examinó el servicio ambiental que pueden brindar (fijador de nitrógeno, solubilizador de fósforo o generador de AIA). Luego las bacterias fueron identificadas mediante técnicas moleculares: *Bacillus amyloliquefaciens*; *B. tequilensis*; *B. vallismortis*; *B. subtilis*; *B. pumilus*; *B. licheniformis* y *B. firmus* (aislados de las hojas). *B. aryabhatai*; *B. horikoshii*; *B. megaterium*; *B. pumilus* y *Paenibacillus odorifer*; *Pseudomonas* sp.; *B. subtilis*; *Azotobacter* sp. (aislados de las raíces); *B. subtilis*; *B. pumilus*; *B. amilequefasciens* (aislados del grano). También se aisló *B. cereus*, *B. thuringiensis* de la rizósfera, y esta última especie como endófito. Esta gran diversidad de especies y cepas de bacterias asociadas a la quinua representan un potencial para desarrollar productos biotecnológicos destinados a mejorar la sostenibilidad y productividad del cultivo de quinua en el Altiplano Sud de Bolivia.

Palabras clave: Microorganismos; Simbiotes; Servicios Ambientales

Summary. Bacteria associated to quinoa crop in the Bolivian Altiplano and its biotechnological potential. Quinoa grows in semi-desert areas and under extreme conditions of humidity and temperature. Therefore, it may be possible that their symbionts microorganisms are also adapted to these extreme conditions. These microorganisms represent a great potential for the development of biotechnology adapted to quinoa. For this purpose, quinoa plants and soil samples from the Southern Altiplano were collected and taken to the laboratory where different bacteria species were isolated and the environmental service was examined about the services it provides (nitrogen fixing, phosphorus solubilizing or AIA generator). Then, the bacteria were identified by using molecular techniques: *Bacillus amyloliquefaciens*; *B. tequilensis*; *B. vallismortis*; *B. subtilis*; *B. pumilus*; *B. licheniformis* and *B. firmus* (isolated from the leaves). *B. acillus aryabhatai*; *Bacillus horikoshii*; *B. megaterium*; *B. pumilus* and *Paenibacillus odorifer*; *Pseudomonas* sp.; *B. subtilis*; *Azotobacter* sp. (Isolated from the roots); *B. subtilis*; *B. pumilus*; *B. amilequefasciens* (isolated from quinoa grains). Also *B. cereus*, *B. thuringiensis* were isolated from rhizosphere and this last specie as endophyte. This great diversity of species and strains of bacteria associated with quinoa is a potential to develop biotech products for improving the quinoa sustainability and productivity in the Andean region of Bolivia.

Keywords: Microorganisms; Symbionts; Environmental Services

Introducción

La mayoría de suelos donde crecen plantas naturalmente propagadas son colonizados por comunidades microbianas que abarcan una gran variedad de géneros y especies. Esta microbiota simbiote obligada o facultativa, está asociada al reciclaje de nutrientes, a aumentar el crecimiento vegetal y a acelerar el desarrollo o mejorar la resistencia de las plantas al estrés ambiental. También a la producción de fitohormonas, metabolitos y enzimas, a inducir la resistencia basal de las plantas, a la supresión de patógenos en el suelo o a desempeñarse como agentes entomopatógenos (Sturz *et al.*, 2000 y Harrison, 2005).

Existen microorganismos (hongos, bacterias, actinomicetos y otros) que viven dentro de las plantas y se llaman endófitos, estos se localizan en espacios intracelulares, intercelulares o en el tejido vascular (Reinhold-Hurek, y Hurek, 1998). Estas al estar en una asociación íntima con las plantas, tienen efectos benéficos de mayor trascendencia en comparación con las que viven en la zona de influencia de la raíz (rizósfera). Los microorganismos endófitos tienen menor competencia que las rizosféricas para tomar sus nutrientes y por lo tanto brindan beneficios directamente a la planta hospedante (Muñoz-Rojas y Caballero, 2003).

En el presente trabajo se pretende explorar estas ventajas naturales de simbiosis que las plantas de quinua presentan en su hábitat natural que es el Altiplano Sur boliviano, el cual se caracteriza por ser árido y semidesértico, con suelos de baja fertilidad y alta erosión, donde los procesos de reciclaje de nu-

trientes, retención de humedad en el suelo y actividad microbiana son limitados, existiendo por ello baja diversidad de especies nativas y cultivadas.

A pesar de las condiciones climáticas y edafológicas tan agrestes del Altiplano, la quinua se desarrolla apropiadamente, es decir es una planta adaptada a esa ecología. Aunque no se tienen datos experimentales, se puede suponer que los microorganismos simbiotes asociados a la quinua también deben estar bien adaptados a ese hábitat, por lo cual, explorar la microbiología de esta planta representa una oportunidad para comprender los fenómenos de nutrición de planta, restauración de la fertilidad, supresión de patógenos y otros mecanismos que están presentes en estos ecosistemas extremos. Este conocimiento puede representar un potencial para recuperar la salud del suelo del Altiplano buscando mitigar los efectos negativos del ambiente.

Materiales y métodos

A) Toma de muestras: Las muestras de plantas fueron colectadas de parcelas de producción de quinua orgánica. Se tomaron sistemáticamente cinco plantas por parcela de producción, se consideraron 10 parcelas en tres comunidades de las zonas de Salinas de Garci Mendoza, Quillacas y Challapata del departamento de Oruro. Asimismo, en el departamento de Potosí se obtuvieron muestras de parcelas de las comunidades de Chacala, Mañica y Llica. Se consideraron diferentes órganos (raíz, hojas y granos) para aislar bacterias y hongos endófitos y también se aislaron microorganismos del rizoplano y la rizósfera. Las muestras fueron transportadas en bolsas plásticas, mantenidas frías en conservadoras

hasta el laboratorio, donde se almacenaron a 10°C hasta procesarlas, excepto las muestras dedicadas al análisis molecular que se guardaron a -20°C.

B) Aislamiento de bacterias endófitas:

Para el aislamiento de bacterias endófitas se utilizó el protocolo del *Manual de Microbiología* de Dion y Magallón (2009). Los tejidos fueron fragmentados, se los esterilizó superficialmente y luego cada trozo fue depositado en medio agar *Trypticase de Soya* (TSA) e incubadas a 28°C por 72 horas. Una vez crecidas las colonias, se aislaron en tubos con TSA para posteriores pruebas de caracterización (Figura 1).



Figura 1. Proceso de aislamiento de microorganismos endófitos

C) Caracterización de los servicios ambientales de los microorganismos:

Una vez realizados los aislamientos se investigó el servicio ambiental que brinda cada aislamiento bacteriano, entre ellos: fijación de nitrógeno, solu-

bilización de fósforo, producción de ácido indol acético (AIA). Se estableció el potencial que representan estos microorganismos para desarrollar futuros productos biotecnológicos que puedan ser utilizados con fines de reciclar nutrientes, promover el crecimiento o proteger a las plantas de quinua en su hábitat altamente vulnerable. El procedimiento para establecer cada uno de los servicios ambientales fue el siguiente:

c.1. Fijadoras de nitrógeno: Se trabajó en base al protocolo de Dion y Magallón (2009). Se sembraron las cepas bacterianas en medio de cultivo Burk. Se incubaron las placas de 5 días a 15 días a 28°C. El tiempo de incubación varió en función al género de bacteria con el cual se trabajó, por esta razón se realizó un seguimiento diario de la prueba.

c.2. Solubilizadoras de fósforo: Se sembraron las bacterias a evaluar, en una placa que contenía el medio de cultivo NBRIP con fosfato tricálcico. Se incubaron las placas de 5 días a 15 días a 28°C; el tiempo de incubación varió dependiendo del género de bacteria con el que se trabajó, por esta razón se realizó un seguimiento diario de la prueba (CIP, 2008). Se registraron como positivas, aquellas cepas bacterianas que presentaron un halo trasparente alrededor de la colonia sembrada.

c.3. Generadoras de Ácido Indol Acético (AIA): El AIA es un metabolito secundario producido por algunas bacterias en su periodo estacionario de crecimiento, por esta razón, el tiempo de incubación del caldo dependió de la curva de crecimiento de la bacteria. Se tuvo que dejar el tiempo suficiente para asegurarse que lleguen a la fase estacionaria. Para este propósito se reactivaron las cepas en estudio en caldo de Tripti-

casa de Soya (TSB), sembrando las colonias de cada cepa en un tubo con medio TSB, suplementado con 5 μ M (micro mol) de L-Triptófano y se incubaron por 7 días a 28°C (Gordon y Weber, 1950). Se reportaron como positivas las muestras que en el revelado viraron a tonos rojizos. Una vez crecidas las colonias bacterianas se aislaron en tubos con TSA para posteriores pruebas y caracterización.

D) Identificación molecular: Se ha amplificado por PCR regiones del genoma de cada aislamiento microbiano que son conservadas e indicadoras su identidad usando partidores cuyas secuencias fueron obtenidas de la literatura (Lane, 1991; Krüger *et al.*, 2009). Estas regiones conservadas corresponden a genes que codifican el ARN ribosomal de la subunidad grande y pequeña de los ribosomas. Los partidores utilizados para bacterias fueron: 27A o 27C (partidor sentido) y 1488 o 1492 (partidor antisentido, Lane, 1991) y para hongos (micorrizas) fueron SSUmCf1-3 y LSumBr1-5 (Krüger *et al.*, 2009). Los partidores fueron sintetizados en por AlphaDNA, Québec, Canada y se ha usado una DNA Polimerasa (Phusion, Finnzymes, Finlandia) que posee actividad correctora de errores con el fin de minimizar la introducción de mutaciones en los amplificadores. Cada producto de PCR fue purificado con columnas GeneJet (Fermentas, USA) antes de enviarlos al Centro de Secuenciación de la Universidad de Chicago, Chicago, IL, USA donde se secuenciaron los fragmentos usando la técnica de Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa BioEdit (Hall, 1999) y luego cotejadas con las bases de datos usando el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

Resultados y discusión

Diversidad por zonas

Los resultados mostraron que la variabilidad de las poblaciones microbiales resalta en la rizósfera y el rizoplano, donde más se concentran los microorganismos simbiotes o no simbiotes (Figura 2). También se determinó que existen microorganismos endófitos en las semillas o granos de quinua, siendo dominantes las cepas de las especies *Bacillus subtilis*, *B. pumilus* y *B. amiloliquefasciens* y otras no identificadas. Resultando esta una de las formas más eficientes de la simbiosis planta-microorganismos, al tener conjuntamente el mismo sistema de diseminación, siendo un mecanismo natural que asegura que los granos de quinua, donde sean trasladados, serán acompañados por sus simbiotes (Figura 3).

Bacterias identificadas y su servicio ambiental

Algunas bacterias fijadoras de nitrógeno son de vida libre, es decir que no requieren una planta hospedante para llevar a cabo el proceso de fijación de nitrógeno. Se aislaron 260 cepas de bacterias endófitas de las muestras de quinua del Altiplano Sur, donde se detectó 31 aislados potenciales para la fijación de nitrógeno (Figura 4).

De 480 cepas de bacterias endófitas de plantas de quinua del Altiplano Sur, se detectaron 72 como solubilizadoras de fósforo (Figura 5).

Se aislaron 28 cepas positivas respecto a su capacidad de generar la fitohormona AIA (Figura 6).

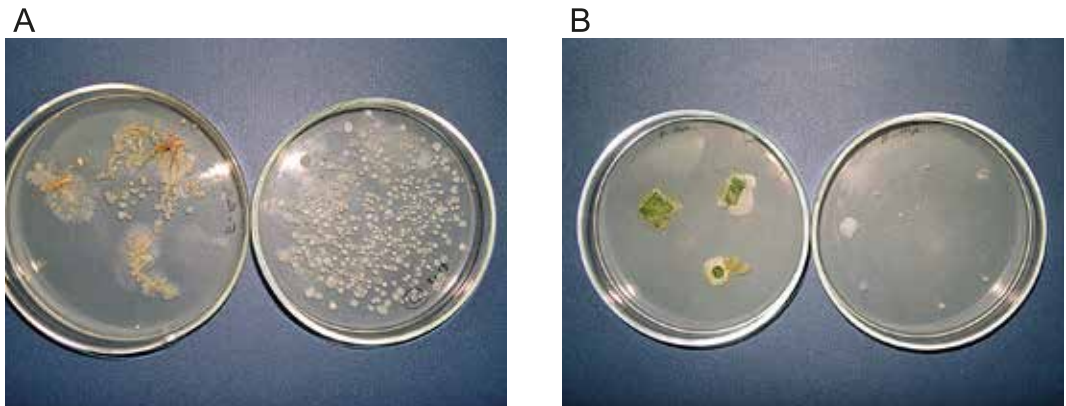


Figura 2. Colonias bacterianas endófitas aisladas de: A) raíces B) hojas

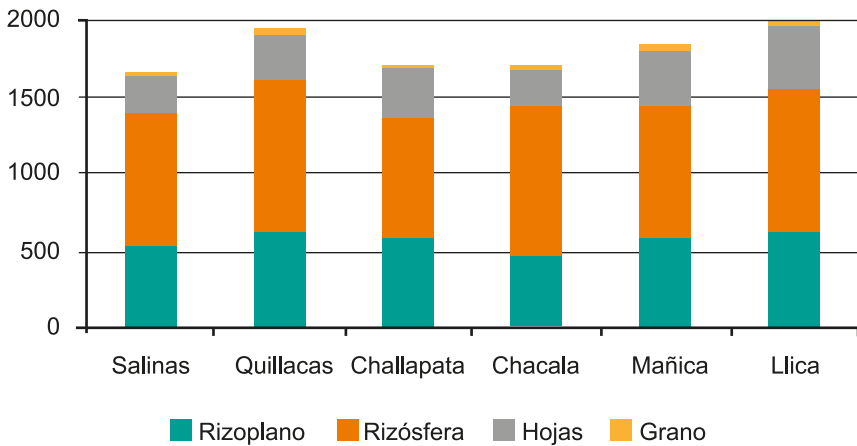


Figura 3. Aislamientos de poblaciones microbianas asociadas a las plantas de quinua provenientes de diferentes comunidades del Altiplano Sud

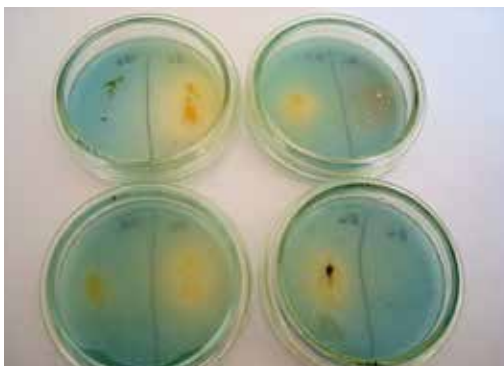


Figura 4. Reacción de cepas de quinua fijadoras de nitrógeno de vida libre en medio de cultivo



Figura 5. Evaluación de cepas solubilizadoras de fósforo (son positivas las que muestran el halo alrededor de la colonia)

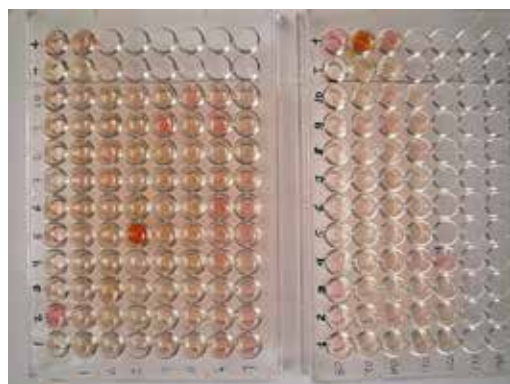


Figura 6. Revelado del AIA (las bacterias que generan fitohormonas presentan un color rojo oscuro)

Se detectaron varias cepas de bacterias, con diferente grado de aptitud, por el servicio ambiental que brindan a las plantas de quinua, así, se detectó:

- ⇒ 235 cepas fijadoras de nitrógeno
- ⇒ 456 cepas que solubilizan fósforo
- ⇒ 789 cepas que generan AIA

Esto demuestra el potencial de la biodiversidad microbiana para desarrollar tecnología que ayude a mitigar los efectos de la erosión de suelos en estas zonas áridas de Bolivia.

Identificación de bacterias y sus servicios ambientales

De los aislamientos bacterianos identificados y seleccionados por su aptitud funcional y servicio ambiental se realizó su respectiva identificación a nivel molecular, por medio de secuenciación del gen que codifica al ARN ribosomal 16S y el programa BLAST, siendo las bacterias más frecuentes -de mayor potencial agroindustrial- las siguientes:

- *Bacillus amyloliquefaciens*; *B. tequilensis*; *B. vallismortis*; *B. subtilis*; *B. pumilus*; *B. licheniformis* y *B. firmus* (aislados de las hojas).

- *Bacillus aryabhatai*; *Bacillus horikoshii*; *B. megaterium*; *B. pumilus* y *Paenibacillus odorifer*; *Pseudomonas* sp.; *B. subtilis*; *Azotobacter* sp. (aislados de las raíces).
- *Bacillus subtilis*; *B. pumilus*; *B. amilequefaciens* (aislados de los granos de quinua).

Se observa que no existe una relación entre las especies de bacterias, el servicio ambiental y las zonas de recolección (Cuadro 1), aparentemente es al azar la posibilidad de encontrar predominancia de una cepa en una determinada zona del Altiplano Boliviano.

La bacteria aislada como *Azotobacter* sp., además de ser fijadora de nitrógeno libre, es capaz de solubilizar fósforo. Por otro lado, el género *Rhizobium* aislado de la rizósfera de plantas de quinua pertenece a un grupo de rizobias que no entran en simbiosis con las plantas o son de vida libre (Bécquer *et al.*, 2013), lo mismo sucede con aislados del género *Flavobacterium* que actúan en forma libre fijando nitrógeno al suelo.

Las bacterias endófitas tienen ventaja sobre las bacterias rizosféricas, por la gran variedad de nutrientes elaborados que disponen, así como de la protección que les brinda la planta de las condiciones adversas del medio (Reinhold-Hurek & Hurek, 1998). Las bacterias endófitas son muy importantes especialmente para las plantas que crecen en condiciones extremas, así se tiene a *B. subtilis* que, aparte de promover el crecimiento en las plantas, es un inductor de resistencia sistémica porque activa el ciclo del ácido jasmónico, que es responsable de inducir resistencia a la planta ante el ataque de patógenos.

Cuadro 1. Zonas de colecta, identificación molecular y servicios ambientales brindados por las bacterias asociadas al cultivo de quinua

Zona de recolección	Identidad	Servicio ambiental
Salinas de Garci Mendoza	<i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus liquefaciens</i>	Solubilizador de fósforo
Chacala, Llica y Salinas de Garci Mendoza	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus vallismortis</i> , <i>Bacillus liquefaciens</i>	Acido Indol Acético (AIA)
Chacala, Challapata, Llica	<i>Bacillus sp.</i> , <i>Bacillus aryabhatai</i> , <i>Bacillus horikoshii</i>	Acido Indol Acético (AIA)
Llica, Chacala, Quillacas	<i>Bacillus firmus</i> , <i>Bacillus tequilensis</i>	Solubilizador de fósforo
Llica, Quillacas	<i>Bacillus pumilus</i>	Solubilizador de fósforo
Quillacas, Mañica, Chacala	<i>Bacillus subtilis</i>	Acido Indol Acético (AIA)
Salinas de Garci Mendoza	<i>Paenibacillus</i>	
Chacala y Mañica	<i>Bacillus simplex</i>	Acido Indol Acético (AIA)
Quillacas, Chacala	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus liquefaciens</i>	Solubilizador de fósforo y AIA
Challapata	<i>Azotobacter sp.</i> <i>Pseudomonas sp.</i>	Fijador de nitrógeno y solubilizador de fósforo
Challapata y Quillacas	<i>Rhizobium sp.</i> , <i>Flavobacterium sp.</i>	Fijadoras de nitrógeno

Asimismo el género *Azotobacter*, que fija nitrógeno para plantas no leguminosas, como la quinua, es una opción para iniciar programas de investigación para mejorar la producción del cultivo de quinua orgánica en el Altiplano Boliviano.

Otros géneros

Bacillus thuringiensis fue obtenido a partir de 13 muestras, ocho muestras de suelo, cuatro de la rizósfera y un endófito de plantas de quinua (Cuadro 2). Para conocer el espectro de actividad insecticida que estos poseen a nivel de las

toxinas Cry (δ -endotoxinas cristalinas), fueron analizados 10 genes Cry por PCR. Los resultados indican que la mayoría de los aislamientos de *B. thuringiensis*, obtenidos en relación a la quinua, presentan los genes Cry 1 y Cry 2, estos genes Cry 1 son activos contra las larvas de insectos lepidópteros (polillas y mariposas) y las toxinas Cry 2, afectan principalmente dípteros (moscas), pero también lepidópteros. Se debe continuar la caracterización para precisar los subgrupos a los que pertenecen estas toxinas y confirmar su actividad tóxica realizando bioensayos en larvas de insectos.

Cuadro 2. Otros géneros de bacterias detectados en diferentes zonas de colecta, identificados molecularmente y servicios ambientales brindados

Zona de recolección	Identidad	Servicio ambiental
Llica, Chacala, Challapata	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Entomopatógeno de lepidópteros y otros
Llica, Mañica, Qillacas, Challapata	<i>Bacillus cereus</i>	Entomopatógeno de coleópteros

Se debe poner particular énfasis al aislamiento de *Bacillus thuringiensis* encontrado como endófito. También se aisló de muestras de suelo la especie *Bacillus cereus*, un entomopatógeno de coleopteros, el que reviste importancia para desarrollar bioinsecticidas en el manejo de este grupo de insectos plaga.

Conclusiones

- Los resultados muestran que existe un número importante de bacterias asociadas a plantas de quinua, varias de las cuales son especies benéficas que brindan servicios ambientales, demostrando el potencial de su uso con fines biotecnológicos industriales en beneficio de la producción de quinua orgánica y sostenible.
- Se detectaron 31 bacterias fijadoras de nitrógeno, 72 como solubilizadoras de fósforo y 28 cepas generadoras de AIA, el hecho que se repitan algunas especies no significa que sean necesariamente la misma cepa. Existen asilados de los géneros *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Flavobacter* que son de vida libre y fijadores de nitrógeno, lo que aún requieren ser estudiados.
- En los granos de quinua se detectaron endófitos de las especies *Bacillus subtilis*, *B. pumilus* y *B. amiloliquefasciens* existiendo otros sin identificar.

- La detección de entomopatógenos como *Bacillus thuringiensis* para control de lepidópteros, es un recurso que se debe evaluar por representar un potencial para desarrollar bioinsecticidas para el manejo ecológico de plagas.
- *Bacillus cereus*, como entomopatógeno, representa a cepas que puedan ser utilizadas para el manejo de coleópteros y no solo para el cultivo de quinua sino de otros cultivos de la zona del altiplano.

Referencias citadas

- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E., Lipman, D. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Bécquer, C., Lazarovits, G., Lalin, I. 2013. Interacción *in vitro* entre *Trichoderma harzianum* y bacterias rizosféricas estimuladoras del crecimiento vegetal. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. Tomo 47, Número 1
- CIP. 2008. Protocolos de trabajo con bacterias PGPR. Lima Perú. pp. 47-50.
- Dion, P., Magallón, P. 2009. Manual de microbiología agrícola "Importancia de los microorganismos promotores de crecimiento vegetal para los pequeños productores de Boli-

- via. Université Laval. Québec, Canada. 90:31-32.
- Gordon, S., Weber, R. 1950. Colorimetric estimation of indole acetic acid. *Plant Physiol.* 26:192-195.
- Hall, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41:95-98.
- Harrison, M. 2005. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Ann. Rev. Microbiol.* 59:19-42.
- Kubicek, C., Harman, G. 2002. *Trichoderma & Gliocladium*. *Basic Biology, Taxonomy and Genetics.* 1:1-271.
- Krüger, M., Stockinger, H., Krüger C., Schüßler, A. 2009. DNA-based species-level detection of arbuscular mycorrhizal fungi: One PCR primer set for all AMF. *New Phytologist.* 183:212-223
- Lane, D. 1991. 16S/23S sequencing. In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (ed. Stackebrandt, E. & Goodfellow, M.), Chichester: John Wiley & Sons. pp. 115-175.
- Muñoz-Rojas, J., Caballero-Mellado, J. 2003. Population Dynamics Of *Gluconacetobacter diazotrophicus* In: *Sugarcane Cultivars and Its Effect on Plant Growth*. *Microbial Ecol.* 46(4):454-464.
- Reinhold-Hurek, B., Hurek, T. 1998. *Trends Microbiol. Apr;* 6(4):139-44. Review. Erratum in: 6(5):202
- Sanger, F, Nicklen, S, Coulson, A. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:5463-5467.
- Sturz, A., Christie, B., Nowak, J. 2000. *Bacterial Endophytes: Potential Role in Developing Sustainable Systems of Crop Production Critical Reviews in Plant Sciences Prince Edward Island. Canada.* 19(1):1-30.

Trabajo recibido el 23 de junio de 2014 - Trabajo aceptado el 2 de julio de 2014

Plagas y enfermedades en el cultivo de Quinoa

Editores:

Raúl Saravia, Giovanna Plata, Antonio Gandarillas

Año de publicación: 2014

La quinoa en los últimos años ha tomado un interés global, se la cultiva en más de 50 países en todos los continentes y en diferentes pisos y zonas agroecológicas. Sin embargo, la mayor producción es en la zona Andina de Bolivia y Perú donde ha sido domesticada, cubriendo actualmente cerca del 80% de la demanda internacional. Es en esta zona donde se ha generado la mayor información sobre el manejo del cultivo, su diversidad genética y sus problemas. Por ello, el presente documento hace referencia principalmente a las plagas y enfermedades, sus ciclos, comportamientos y los efectos causados en la productividad.



Mayores informes: Fundación PROINPA

Oficina Central Cochabamba

Av. Meneces s/n, Km. 4 (zona El Paso)

Tel.: (591-4) 4319595 • Fax: (591-4) 4319600

E-mail: proinpa@proinpa.org